

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Biochemie



Marek Drahokoupil

Proteázy folikulárních tekutin skotu
The protease of bovine follicular fluid

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jiří Liberda, PhD.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Jiřího Liberdy, Ph.D, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Že jsem si vědom 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.....

.....
podpis

Úvodem své bakalářské práce bych rád poděkoval všem, kteří mi při této práci byli nápomocní a vytvořili mi výborné podmínky pro její vypracování. Mé poděkování patří především mému školiteli a vedoucímu práce RNDr. Jiřímu Liberdovi, PhD., za jeho trpělivost a profesionální pomoc při práci v laboratoři.

Marek Drahokoupil

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá izolací a částečnou charakterizací proteáz folikulární tekutiny krávy. Folikulární tekutina byla nejprve rozdělena podle molekulových hmotností pomocí gelové chromatografie na Sephadexu G-100. Jako další metoda izolace byla zvolena ionexová chromatografie na Sephadexu DEAE. S výslednými frakcemi byla provedena SDS elektroforéza, stanovení proteolytické aktivity s proteolytickým substrátem azakaseinem; zymografie a diferenční SDS elektroforézy. Sebrané frakce folikulární tekutiny, stanovené metodou gelové chromatografie, měly relativní molekulové hmotnosti v rozmezí: 114 000 – 131 000 pro vzorek frakce I; 44 000 – 51 000 pro vzorek frakce II; 151 000 – 204 000 pro vzorek frakce III; 57 000 – 99 000 pro vzorek frakce IV; 14 000 – 38 000 pro vzorek frakce V; 180 – 500 pro vzorek frakce VI.

Z výsledků proteolytické aktivity bylo rozhodnuto, že se nadále bude pracovat jen se vzorky frakcí III, IV a V, sebraných z gelové chromatografie a se vzorkem opožděné frakce PBS II, sebrané z ionexové chromatografie. Tyto vzorky vykazovaly nejvyšší aktivitu.

Byly použity inhibitory, jimiž bylo možné určit, které typy proteáz se vyskytují ve vybraných frakcích. Ve frakci III, sebrané z gelové chromatografie, se vyskytovaly aspartátové proteázy, metalloproteázy a serinové proteázy, kdežto ve frakci IV, sebrané z gelové chromatografie, se vyskytovaly pouze serinové proteázy a ve frakci V, sebrané z gelové chromatografie, se vyskytovaly aspartátové a serinové proteázy. V opožděné frakci PBS II, sebrané z ionexové chromatografie, se vyskytovaly aspartátové proteázy, metalloproteázy a serinové proteázy.

Pomocí diferenční SDS elektroforézy, byla sledována autolýza proteinů kravské folikulární tekutiny. Z výsledků vyplývá, že kravská folikulární tekutina podléhá autolýze, která se projeví až po delší době a je i tak velmi pomalá.

Abstract

This bachelor thesis deals with isolation and partial characterisation of cow protease follicular fluids. At first, the follicular fluid was isolated according to molecular weights by means of gel chromatography on Sephadex G-100. As another method of separation there was selected the ion exchange chromatography on Sephadex DEAE. For the characterization of resulting fractions SDS electrophoresis, assessment of proteolytic activity of the proteolytic substrate azakasein, zymography and differential SDS electrophoresis were used. The collected fractions of the follicular fluid defined by the gel chromatography method had the relative molecular weights ranging 114 000 – 131 000 in fraction pattern I, 44 000 – 51 000 in fraction pattern II, 151 000 – 204 000 in fraction pattern III, 57 000 – 99 in fraction pattern IV, 14 000 – 38 000 in fraction pattern V and 180 – 500 in fraction pattern VI.

From the results of the proteolytic activity I decided to work further only with fraction patterns III, IV and V collected from the gel chromatography and with the pattern of the delayed fraction PBS II collected from the ion exchange chromatography. These patterns reported the highest specific activity.

Inhibitors were used to determine which type of protease occurs in the chosen fractions. In the fraction pattern III collected from the gel chromatography occurred aspartate proteases, metalloproteases and serine proteases; while the fraction IV contains serine proteases; fraction V contains aspartate and serine proteases. In the pattern of the delayed fraction PBS II collected from the ion exchange chromatography aspartate proteases, metalloproteases and serine proteases occurred.

By the means of the differential SDS electrophoresis there was observed the cow follicular fluid protein autolysis. The results show that the cow follicular fluid is subjected to autolysis, but autolysis needs a longer time to produce visible pattern.

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Obsah	5
Seznam zkratek	7
1. Úvod	10
1.1 Samičí pohlavní orgány - kráva	10
1.1.1 Vulva (pudendum feminium).....	10
1.1.2 Pochva (vagina)	11
1.1.3 Poševní předsíň (vestibulum vaginae)	11
1.1.4 Děloha (uterus)	11
1.1.5 Vejcovod (oviductus).....	11
1.1.1 Vaječník	12
1.2 Hormonální řízení samičích pohlavních funkcí	13
1.3 Folikulární tekutina	13
1.3.1 Složení folikulární tekutiny	14
1.4 Enzymy ve folikulární tekutině.....	14
1.5 Proteasy	15
1.5.1 Aspartátové proteázy	15
1.5.2 Serinové proteázy	15
1.5.3 Cysteinové proteázy.....	16
1.5.4 Metalloproteázy	16
1.6 Inhibitory proteáz	16
1.6.1 Proteinové inhibitory	17
1.6.2 Neproteinové inhibitory	18
2. Cíl práce.....	20
3. Metody.....	21
3.1 Použitý materiál	21
3.1.1 Chemikálie	21
3.1.2 Biologický materiál.....	23
3.2 Chromatografické metody.....	24
3.2.1 Gelová chromatografie	24
3.2.2 Ionexová chromatografie	26
3.2.2.1 Příprava a aktivace ionexu	26

3.3	Stanovení aktivity enzymů frakcí z gelové a ionexové chromatografie	28
3.3.1	Použitý materiál	28
3.4	Elektroforetické metody	28
3.4.1	SDS elektroforéza	29
3.4.2	Zymografie.....	32
3.5	Diferenční gelová elektroforéza	34
3.5.1	Příprava vzorků.....	34
3.5.2	Diferenční SDS gelová elektroforéza	35
3.5.3	Diferenční SDS elektroforéza pro zobrazení na UV	35
4.	Výsledky.....	36
4.1	Gelová chromatografie folikulární tekutiny krávy.....	36
4.1.1	Výsledky SDS elektroforézy s frakcemi z gelové chromatografie.....	37
4.1.2	Stanovení proteolytické aktivity frakcí kravské folikulární tekutiny po gelové chromatografii	40
4.1.3	Zymografie s frakcemi z gelové chromatografie.....	41
4.2	Ionexová chromatografie kravské folikulární tekutiny	43
4.2.1	Výsledky SDS elektroforézy s frakcemi z ionexové chromatografie.....	44
4.2.2	Stanovení proteolytické aktivity frakcí kravské folikulární tekutiny po ionexové chromatografii.....	46
4.2.3	Zymografie s frakcemi z ionexové chromatografie.....	47
4.3	Vyhodnocení inhibice proteáz jednotlivými inhibitory pro frakce z gelové a ionexové chromatografie.....	48
4.4	Výsledky sledování autolýzy kravské folikulární tekutiny proteázami v ní přítomných	49
5.	Diskuze	51
6.	Závěr.....	53
7.	Seznam použité literatury	54

Seznam zkratek

AA	- Akrylamid
ACE	- Angiotensin – convertig enzyme
Ala	- Aminokyselina alanin
APS	- Persíran amonný
Asp	- Aminokyselina asparagin
BIS	- N,N'-methylen-bisakrylamid
DEAE	- Diethylaminoethyl
dH ₂ O	- Destilovaná voda
DNA	- 2-deoxyribonukleová kyselina
EDTA	- Ethylendiaminotetraoctová kyselina
ES	- Enzymový komplex enzym-substrát
FF	- Folikulární tekutina
FITC	- Flurescein-isothiokyanát
FSH	- Folikulostimulační hormon

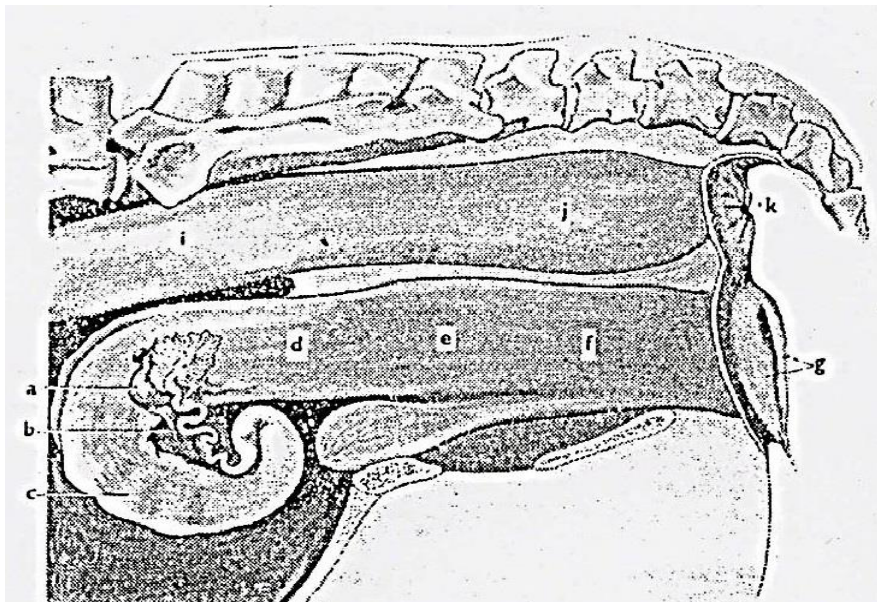
Gln	- Aminokyselina glutamin
Glu	- Kyselina glutamová
Gly	- Aminokyselina glycin
GnRH	- Gonádotropní hormon hypofýzy
HCV protease	- Proteáza viru hepatitidy typu C
IAP	- Inhibitor of apoptosis
IgA	- Imunoglobuliny třídy A
IgG	- Imunoglobuliny třídy B
LH	- Luteinizační hormon
Met	- Aminokyselina methionin
PBS	- Fosfátem tlumený fyziologický roztok (z angl. Phosphate-Buffered Saline)
RITC	- Rodamin B-isothiokyanát
SDS	- Dodecylsulfát sodný
Sta	- Aminokyselina statin
TBS	- Tris-pufr
TEMED	- N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin

Thr	- Aminokyselina threonin
TIMP	- Inhibitory proteáz
Tris	- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton	- Polyethylene glykol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-fenyl etheru
Val	- Aminokyselina valin
ϵ -AHX	- Epsilon aminokapronová kyselina

1. Úvod

1.1 Samičí pohlavní orgány - kráva

Samičí pohlavní orgány se skládají z klitorisu, vulvy, pochvy s poševní předsíní, dělohy, z párových vaječnicků a vejcovodů (viz obr. 1).



Obrázek 1 – Uložení pohlavních orgánů krávy a – vaječník; b – vejcovod; c – děložní roh; d – děložní tělo; e – děložní krček; f – pochva; g – stydké pysky ohraničující stydkou štěrbinu; i – konečník; j – konečnicková ampula; k - řiť

http://ksz.zf.jcu.cz/studium_vzdelavani/studijni_materialy_informace/Reprodukce%20hospodarskych%20zvirat/prednasky/2-anatomie-pohlavnich-organu

1.1.1 Vulva (pudendum feminium)

Vulva je vstupem do pohlavních orgánů. Obsahuje stydké pysky, které se spojují ve ventrální a dorzální komisuře, stydkou kost a klitoris.^{1,2}(viz obr. 1)

1.1.2 Pochva (vagina)

Velikost kravské pochvy je kolem 20cm. Kraniálně přechází v děložní krček, kaudálně v poševní předsíň – stydká štěrbina. ^{1,2}(viz obr. 1)

1.1.3 Poševní předsíň (vestibulum vaginae)

Kravská poševní předsíň je veliká 8 – 10cm a je společnou cestu pro pohlavní a močové ústrojí. Na dně předsíně se nachází subuterální výduť a vyústění močové trubice. V poševní předsíni se nachází velké vestibulární žlázy. ^{1,2}(viz obr. 1)

1.1.4 Děloha (uterus)

Děloha je složena z děložních rohů, děložního těla a děložního krčku (cervixu). V děložních rozích dochází k vývoji plodu. Děložní krček ústí plynule nebo formou čípku do pochvy. Děloha je držena širokými děložními svaly. ^{1,2}

Kravská děloha je tzv. dvourohá s přepážkou v děložním těle. Je složena ze dvou děložních rohů (viz obr. 1). Dutina děložního těla je částečně přepažena vazivovým septem a v krčku se nachází jeden kanál. Děložní stěna je složena z vnitřní slizniční vrstvy (endometrium), střední vrstvy (myometrium) a povrchové vrstvy (perimetrium). Sliznice kanálu děložního krčku je tvořena čtyřmi kruhovitými záhyby s podélnými řasami.

Děložní cyklus probíhá synchronně s ovariálním cyklem. ^{1,2}

1.1.5 Vejcovod (oviductus)

Vejcovod je tenká trubice zavěšená na vejcovodém okruží spojující vaječník s dělohou. Kravský vejcovod je dlouhý kolem 30cm. V těsné blízkosti vaječníku se nachází nálevka vejcovodu.

Ve špičce děložního rohu se nachází ústí vejcovodu takzvané děložní ústí (viz obr. 1). Stěna vejcovodu je tvořena sliznicí, svalovinou a serózou. ^{1,2}

1.1.1 Vaječník

Vaječníky zprostředkovávají produkci oocytů a pohlavních hormonů – estrogeneru a progesteronu.

Nachází se v kaudodorsální oblasti dutiny břišní, před vstupem do pánevní dutiny (viz obr. 1). Vaječníky jsou zavěšeny na vaječnickovém okruží, které pokrývá jejich povrch. Plocha nepokrytá vaječnickovým okružím se nazývá ovulační plocha.

Tvar vaječník je oválný s hladkým povrchem s prominujícími folikuly, žlutými tělísky, či případně prohlubní po čerstvě prasklém folikulu.^{1,2}

1.1.5.1 Histologická stavba vaječníku

Část povrchu vaječníku je kryta vaječnickovým okružím, které se nazývá pobřišnice. Vaječník je složen z kubického epitelu, vazivové blány, korové vrstvy a dřene. Korová vrstva je složena z folikulů a vazivové tkáně. Dřeň se skládá z vaziva, svalových buněk, cév a nervových tkání.³

Ve fetální fázi dochází ke vzniku primárních oocytů I. řádu. Oocyty I. řádu s vrstvou folikulárních buněk pak tvoří tzv. primární folikuly. Po nástupu pohlavní dospělosti dochází ke vzniku sekundárních folikulů. Folikulární buňky tvoří tzv. zonu pellucidu, což je vrstva kolem ovocya.³

Vnitřní vrstva vaječníku (corona radiata) je vyplněna tekutinou. Terciární folikul (Graafův) je dutinka vyplněná tekutinou, která je ohraničena vrstvou granulárních buněk – granulární vrstva obsahující lipidy a produkující estrogény. Pokud je oocyt na hrbolku z granulárních buněk, probíhá první zrací dělení.³

Na periferii granulární vrstvy se nachází obal folikulu (theca follikuli). Vnitřní vrstva (theca follikuli interna) je složena lipidy a dochází zde k produkci estrogeneru. Vnější vrstva (theca follikuli externa) produkuje zralý folikul o velikosti 15 – 20mm.³

Spontánní reakcí dochází k prasknutí stěny folikulu a vyplavení oocytu. Tento proces se nazývá ovulace. V místě prasklého folikulu se nachází dutinka, která se zaplňuje granulárními buňkami. Tato buňka se nazývá červené tělísko. Luteinizací tohoto tělíška vzniká žluté tělísko (corpus luteum), které produkuje progesteron. Existují tři druhy žlutého tělíška – žluté tělísko gravidity (dojde-li k oplození), žluté tělísko periodické

(dozrívání dalšího folikulu, po určité době zaniká), žluté tělísko perzistující (patologické, luteální cysta).³

1.2 Hormonální řízení samičích pohlavních funkcí

Gonádotropní hormony hypofýzy (GnRH) – zrání a uvolňování samičích pohlavních buněk, stimulace sekrece pohlavních steroidních hormonů ve vaječniku (FSH – Folikulostimulační hormon; LH – Luteinizační hormon).⁴

Steroidní hormony vaječniku – vývoj sekundárních pohlavních znaků, sexuální chování, regulace estrálního cyklu a březosti (Estrogeny; Progesteron; Inhibin).⁴

1.3 Folikulární tekutina

Folikulární tekutina je viskózní tekutina nažloutlé barvy, která se akumuluje v extracelulárním prostoru ovariálních folikulů. V prvotních fázích růstu folikulu se nejprve vytváří tekutina mezi granulárními buňkami. S dělením granulárních buněk se také zvyšuje produkce a akumulace tekutiny. Tímto procesem se vytváří folikulární dutina neboli antrum. Celý proces proliferace granulárních buněk a akumulace folikulární tekutiny v antru je řízen FSH hormonem a estrogeny. V této vývojové fázi folikulu je znatelný mezidruhový rozdíl ve velikosti folikulární dutiny^{5,6}. Složení folikulární tekutiny ovlivňuje folikulární steroidogenezi, maturaci oocyty, ovulaci a transport oocyty do oviduktu⁶. Folikulární tekutině je také připisována funkce chemoatraktantu pro spermie⁷. Jednou z molekul, které jsou přítomny ve folikulární tekutině a mohou jako chemoatraktant sloužit, je progesteron⁸.

Folikulární tekutina obsahuje především proteiny, aminokyseliny, cukry, enzymy, mukopolysacharidy, gonadotropiny, steroidy, soli atd.⁹

1.3.1 Složení folikulární tekutiny

Proteinové složení folikulární tekutiny je obdobné plazmě. Proteiny folikulární tekutiny jsou převážně nízkomolekulární, původem z cévního systému a do folikulární tekutiny se dostávají přes folikulární laminu. Některé látky jsou do folikulární tekutiny transportovány z lokálních buněk. Granulární buňky do folikulární tekutiny sekretují enzymy, proteiny a mukopolysacharidy⁹. Koncentrace proteinů se ve folikulární tekutině pohybuje okolo 58 mg/ml. V závislosti na mnoha faktorech může koncentrace proteinů dosahovat i vyšších hodnot (jedním z faktorů mohou být rozdíly složení folikulární tekutiny samic jiného živočišného druhu). Při zrání a růstu folikulu dochází k poklesu koncentrace proteinů¹⁰. Koncentrace albuminu a β -globulinů bývají oproti plazmě vyšší, kdežto naopak IgA, IgG, fibrinogen a α -globuliny a γ -globuliny mají vyšší koncentraci v plazmě, než ve folikulární tekutině¹¹. Ve folikulární tekutině se nachází různé druhy aminokyselin, především však Asp, Thr, Glu, Gln, Gly, Ala a Met, a to v koncentracích podobných plazmě¹⁰. Folikulární tekutina obsahuje velké množství enzymů jako, jsou proteasy, peptidasy a hydrolasy, jejichž koncentrace se může měnit v průběhu zrání folikulu⁹. Byla zjištěna přítomnost pouze několika sacharidů, sialové kyseliny a fukosa¹¹. Dále byla ještě zjištěna přítomnost těchto látek: kyselina mléčná, kyselina citrónová, cholesterol¹².

1.4 Enzymy ve folikulární tekutině

Ve folikulární tekutině bylo nalezeno několik druhů enzymů. Například lysozomální enzymy (hyaluronidasa, kolagenasa, endopeptidasy), které napomáhají ovulaci a prasknutí stěny folikulu¹⁰.

Ve folikulární a oviduktální tekutině byly nalezeny metalloproteázy a jejich inhibitory. Pravděpodobně hrají důležitou roli v přípravě prostředí během fertilizace a embryonálního vývoje v oviduktu¹³. Aktivita proteáz a peptidáz ve folikulární tekutině zdravých folikulů je vyšší než folikulů s cystickou fibrosou¹⁰.

1.5 Proteázy

Jsou enzymy ze skupiny hydroláz, které štěpí peptidové vazby v bílkovinách. Hydrolyzují peptidické vazby aminokyselin, pomocí kterých jsou aminokyseliny vázány v peptidickém řetězci. Neexistuje jasné rozhraní mezi proteázami a peptidázami. Podle místa působení se proteázy dělí na endopeptidázy (proteínázy) a exopeptidázy¹⁴.

Endopeptidázy katalyzují hydrolýzu vazby uvnitř řetězce za vzniku peptidů různé velikosti. Exopeptidázy katalyzují odštěpování pouze koncových aminokyselin z polypeptidového řetězce¹⁴.

Podle katalytických skupin v aktivním místě proteázy dělíme na **serinové** (rozhodující je -OH skupina serinu, např. trypsin, thrombin), **aspartátové** (skupina -COO⁻, např. pepsin), **cysteinové** (-SH, papain) a **metalloproteázy** (často Zn²⁺, karboxypeptidasa).

V roce 2004 byl objeven zcela nový katalytický typ proteas **glutamátové peptidázy** - původně známý jako „aspartátové proteázy necitlivé k pepstatinu“¹⁵.

1.5.1 Aspartátové proteázy

Evolučně nejmladší a nejméně četná skupina proteáz (4%). Mají velkou vazebnou dutinu a širokou substrátovou specifitu. Aspartátové neboli kyselé proteázy nejlépe štěpí při kyselém pH¹⁶.

Příklady: pepsin, renin, cathepsin D, virové a mikrobiální proteázy. Specifická inhibice pepstatinem (pseudopeptid izolovaný ze *Streptomyces*)

1.5.2 Serinové proteázy

Vývojově neúspěšnější skupina proteáz – tvoří 35% všech proteáz. Serinové proteázy mají širokou substrátovou specifitu. Serinové proteázy nejlépe katalyzují v bazickém pH¹⁶.

Příklady: subtilisin, trypsin, plasmin, thrombin, HCV protease

1.5.3 Cysteinové proteázy

Cysteinové proteázy nejlépe katalyzují v neutrálním pH ¹⁶.

Příklady: papain, cathepsiny, calpains, virové proteasy z Polioviru

1.5.4 Metalloproteázy

Metalloproteázy jsou evolučně stará, početná třída proteáz (34%). Optimální pH pro tuto skupinu proteáz je pH neutrální ¹⁶. Metalloproteázám ve folikulární tekutině je připisována aktivita při remodelaci tkáně ¹⁷.

Inhibitorem metalloproteáz je EDTA ¹⁶.

Příklady: kolagenasa, membránové peptidasy, angiotensin-converting enzyme (ACE)

1.6 Inhibitory proteáz

Inhibice je biochemický proces, kdy vazba určité látky způsobí snížení aktivity enzymu ¹⁸. Snížení aktivity enzymu způsobuje odlišný průběh enzymatické reakce ¹⁹. Látky, které takto účinkují, se označují jako enzymové inhibitory ¹⁸. Interakce inhibitoru s enzymem může být:

a) reverzibilní, kdy se inhibitor velmi pevně váže na enzym slabými interakcemi. Reverzibilní inhibitory poskytují cenné údaje o substrátové specifitě i struktuře aktivního centra enzymu. Reverzibilní inhibice enzymů specifickými metabolity je důležitým nástrojem regulace intermediárního metabolismu i podstatou působení některých léků.

b) ireverzibilní, kdy se inhibitor váže velmi pevně, většinou kovalentně, na enzym, modifikuje jeho funkční skupiny a tím jej inaktivuje. Ireverzibilní inhibice se využívá ke studiu struktury enzymu ¹⁴.

Inhibice může probíhat několika způsoby. Někdy se inhibitor váže na enzym a zamezuje mu navázat substrát (inhibice kompetitivní), jindy sice umožní navázání substrátu, ale nemůže dojít k enzymatické reakci (inhibice akompetitivní). V dalších

případech se váže inhibitor až na komplex enzym-substrát (ES) a zamezuje přeměně substrátu (nekompetitivní inhibice)¹⁴.

1.6.1 Proteinové inhibitory

1.6.1.1 IAP

IAP nebo-li *inhibitor of apoptosis*, jsou proteiny které blokují apoptózu vazbou a následnou inhibicí kaspáz. Apoptózu-stimulující protein Smac má antagonistický efekt k IAP na kaspázy²⁰.

1.6.1.2 TIMP

TIMP jsou inhibitory metaloproteáz, které jsou produkovány v buňkách. Jejich inhibiční domény interagují přímo s katalytickým Zn^{2+} ²⁰.

1.6.1.3 Cystatiny

Cystatiny jsou inhibitory lysosomálních katepsinů. Některé z nich (též nazývané stefiny) se nacházejí v cytosolu, jiné zase v mezibuněčném prostoru. Cystatiny chrání buňky proti katepsinům, které by mohly uniknout z lysozomů²⁰.

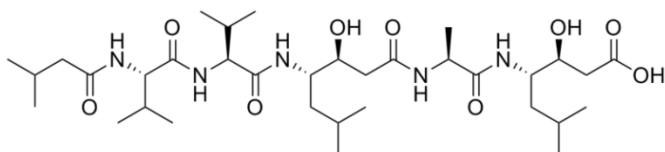
1.6.1.4 Serpiny

Serpiny jsou velmi rozšířené proteiny, které používají specifický sebevražedný mechanismus k inhibici serinových nebo cysteinových proteáz.

Zásadní změna konformace serpinů je způsobena odštěpením substrátové smyčky. Toto vede k „zmatení“ aktivního centra proteázy a brání dokončení reakce. Serpin zůstává kovalentně vázán na proteázu a tvoří acyl-enzymový meziprodukt²⁰.

1.6.1.5 Pepstatin

Pepstatin je silný inhibitor aspartátových proteáz. Jedná se o hexa-peptid, který obsahuje zvláštní aminokyselinu statin (Sta, (3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid), mající sekvenci Isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta. Původně byl izolován z kultur různých druhů Actinomyces, vzhledem ke své schopnosti inhibovat pepsin v pikomolárních koncentracích. Pepstatin A je dobře známý inhibitor aspartátových proteináz jako je pepsin, catepsin D a E ²¹.



Obrázek 2 - Strukturální vzorec Pepstatinu

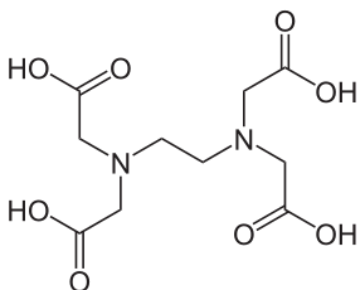
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Pepstatin.png>

1.6.2 Nепroteinové inhibitory

1.6.2.1 EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina)

V biochemii a molekulární biologii, se EDTA běžně používá k deaktivaci enzymů závislých na iontech kovů, a to buď jako test jejich reaktivity nebo test potlačení poškození DNA či proteinů ²².

EDTA a její soli jsou významné chelátory. EDTA je inhibitor řady metalloproteáz. Inhibice se provádí pomocí chelatace kovových iontů potřebných pro katalytickou aktivitu ²³.

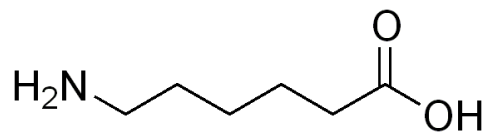


Obrázek 3 - strukturální vzorec EDTA

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:EDTA.svg>

1.6.2.2 ϵ -aminokapronová kyselina

Aminokapronová kyselina (také známa jako Amicar, ϵ -AHX, ϵ -aminokapronová kyselina nebo 6-aminohexanová kyselina) je derivát a analog aminokyseliny lysin, což je účinný inhibitor pro enzymy, které se váží na konkrétní zbytky. Tyto enzymy jsou proteolytické enzymy, jako plazmin, enzym zodpovědný za fibrinolýzy. Specificky inhibuje konverzi plasminogenu na plasmin ²⁴.



Obrázek 4 - Strukturální vzorec aminokapronové kyseliny

http://en.wikipedia.org/wiki/File:6-Aminocaproic_acid.png

2. Cíl práce

Cílem této práce byla izolace a částečná charakterizace proteáz kravské folikulární tekutiny pomocí:

1. Rozdělení proteinů folikulární tekutiny podle molekulových hmotností pomocí gelové chromatografie.
2. Separace proteinů folikulární tekutiny pomocí ionexové chromatografie
3. Stanovení relativních molekulových hmotností proteinů frakcí gelové a ionexové chromatografie pomocí SDS elektroforézy
4. Zymografické stanovení relativních molekulových hmotností proteáz
5. Stanovení proteolytické aktivity proteinů separovaných ionexovou a gelovou chromatografií a inhibice jednotlivých proteolytických aktivit ve frakcích a na zymografiích
6. Sledování autolýzy folikulární tekutiny proteázami přítomnými ve folikulární tekutině metodou diferenční gelovou elektroforézou

3. Metody

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Chemikálie

Akrylamid	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Azid sodný	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bis – akrylamid	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromfenolová modř	- Lachema, Brno, ČR
Coomassein Brilliant Blue R-250	- Serva, Heidelberg, Německo
Dihydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Dodecylsulfát sodný	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylenglykol	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluorescein-thioisokyanát (FITC)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	- Lachema, Brno, ČR
Glycin	- Reanal, Budapešť, Maďarsko

Hydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno, ČR
Hydroxid sodný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid sodný	- Lachema, Brno, ČR
Chlorid vápenatý	- Fluka, Buchs, Švýcarsko
Kyselina citronová	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina ethylendiaminotetraoctová(EDTA)	- Serva, Heidelberg, Německo
Kyselina chlorovodíková	- Lachema, Brno, ČR
Kyselina octová	- Lachema, Brno, ČR
Merkaptoethanol	- Loba Chemie, Fishamend, Rakousko
Methanol	- Lachema, Brno, ČR
N,N,N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	- Serva, Heidelberg, Německo
N,N-dimethylformamid (DMF)	- Lachema, Brno, ČR
Pepstatin	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Persíran amonný (APS)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rhodamin B-thioisokyanát (RITC)	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sephadex – DEAE	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sephadex G-100	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Toulen	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	- Serva, Heidelberg, Německo
ϵ -aminokapronová kyselina	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Azakasein	- Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Čistota uvedených komerčně dodaných chemikálií byla P.A. nebo vyšší.

3.1.2 Biologický materiál

Kravské reprodukční trakty - Jatka Český Brod, Kouřim

3.1.2.1 Isolace kravské folikulární tekutiny

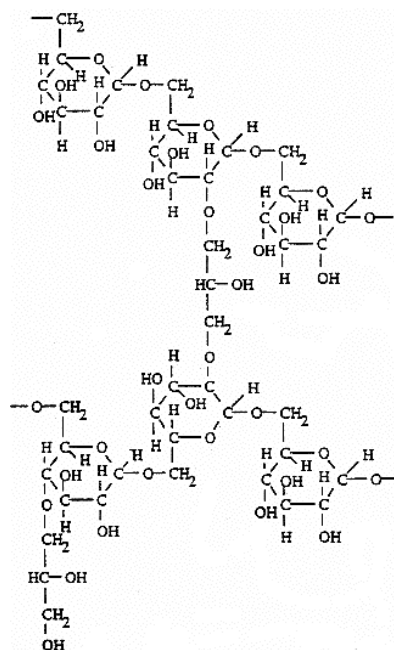
Z urogenitálního traktu krávy byly nůžkami odděleny ovidukty od rohu dělohy a vaječníku. Pomocí injekční stříkačky byla folikulární tekutina odsáta z vaječnicků (FF) a jímána do značených mikrozkušavek a rozdělena podle velikosti folikulu. Zralé kravské folikuly mají průměr 3 – 5 mm.

3.2 Chromatografické metody

3.2.1 Gelová chromatografie

Metoda, která slouží k dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Po kalibraci může sloužit i ke stanovení M_r , popřípadě i ke změně pufru, ve kterém je rozpuštěný protein. Metoda funguje na principu molekulového síta, velké molekuly se nezadržují a protékají dříve než malé. Důvodem jsou kuličky gelu (zrna) s póry o definované velikosti. Do pórů se vejdou molekuly jen do určité velikosti. Molekuly větší protékají pouze prostorem mezi kuličkami. Zatímco malé molekuly pronikají do póru gelu a jsou tím zbrzdovány (viz obrázek).

Jako nosič se nejčastěji používá Sephadex G, upřesněný dále číslem (25, 50, 75, 100, 150, 200), které přibližně udává dělicí schopnost (velikost pórů) a pak hrubost kuliček (coarse, medium, fine, superfine).



Obrázek 5 - Strukturální vzorec Sephadexu

<http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/6CoursDEUST/CHROMATOGRAPHIE/2FIGURES/2GelFiltration/3SEPHADEX/1GelSephadex.htm>

3.2.1.1 Příprava gelu

Na předvážkách bylo naváženo potřebné množství gelu Sephadex G-100 ($m = 16\text{g}$) a poté rozpuštěno v pufru PBS o $\text{pH} = 7,4$ a objemu $V = 600\text{ml}$. Dále se roztok gelu nechal hodinu mírně třepat na třepačce. Po jedné hodině bylo třepání zastaveno a posečkáno, dokud se roztok gelu nerozdělil na dvě fáze. Poté byl gel dekantován (oddělení vodné fáze od pevné fáze gelu). Po odlití cca 200ml vodné fáze, bylo ke gelu opět přidáno 200ml pufru PBS a proces byl opakován.

3.2.1.2 Nalévání kolony

Nejprve bylo zastaveno třepání a roztok gelu byl rozdělen na dvě zřetelné fáze. Dále se odlila část vodné fáze roztoku (jen část, aby se gel mohl přelit do kolony) a roztok byl řádně promíchán. Rozmíchaný gel byl pomocí skleněné tyčinky nalit do předem připravené kolony (na dno kolony byla umístěna skelná vata, aby kolona neprotekla) a poté bylo počkáno do usazení hladiny. Proces byl několikrát opakován, dokud se hladina gelu neusadila do požadované výšky kolony.

Gel byl převrstven pufrům PBS ($\text{pH} = 7,4$) a poté připojen k zásobnímu roztoku pufru PBS, aby gel nevyschl.

3.2.1.3 Příprava a nanesení vzorku na kolonu a sběr frakcí

Kolona byla připojena ke sběrači frakcí, nastaveným na objem $2,8\text{ml}$ s celkovým počtem 60 zkumavek a pufr PBS, kterým byla kolona převrstvena, byl vsáknut do gelu. Ze vzorku rozmražené a centrifugované (4min. při $14\,000 \times g$) folikulární tekutiny byl odebrán vzorek o objemu $V = 1\text{ml}$, který byl poté opatrně nanesen na kolonu. Po vsáknutí vzorku do gelu byl gel převrstven pufrům PBS ($\text{pH} = 7,4$) o objemu $V = 1\text{ml}$ a ponechán též vsáknout. Poté byla kolona doplněna a připojena k zásobníku pufru PBS ($\text{pH} = 7,4$). Sběr frakcí trval přibližně 24hodin.

U sebraných frakcí byla změřena absorbance při vlnové délce 280nm. U frakcí s hodnotou absorbance vyšší než $A = 0,1$ byl změřen jejich eluční objem. Poté byly frakce uskladněny do lednice.

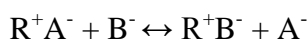
U jednotlivých frakcí byla určena aktivita. Z grafu závislosti absorbance na elučním objemu byly podle píků slity jednotlivé frakce odpovídající danému elučnímu objemu.

Slité frakce byly zamrazeny a dále používány pro jiné metody.

3.2.2 Ionexová chromatografie

Chromatografie na měničích iontů neboli ionexová chromatografie je určena pro separaci látek nesoucích náboj.

Při výměně iontů se ionty, které jsou elektrostaticky vázány k pevnému a chemicky inertnímu podkladu reverzibilně vyměňují za ionty z roztoku:



R^+A^- je iontový měnič s navázaným aniontem s navázaným aniontem A^- (anex) a B^- odpovídá aniontům v roztoku. Měníč kationtů (katex) obsahuje záporně nabitě skupiny, které reversibilně vážou kationty. Afinity iontů k ionexu není stejná, ale závisí na velikosti náboje a na poloměru hydratovaného iontu. Tento fakt je základem separace látek ionexovou chromatografií. Rozdíly v nábojových vlastnostech, jichž ionexová chromatografie využívá, jsou u biologických látek značné, proto lze tímto způsobem oddělit i látky jinak velmi podobných vlastností.

3.2.2.1 Příprava a aktivace ionexu

Gel DEAE – Sephadex ($m = 20g$) byl rozpuštěn ve 100ml destilované vody. Poté byl gel cca 10min. promýván. v 1 % roztoku kyseliny octové o objemu $V = 150ml$ pro aktivaci H^+ iontů.

Po promytí byl gel přelit pomocí skleněné tyčinky do kolony do požadované výšky sloupce.

Dále byl gel promýván roztokem pufru PBS ($pH = 6,05$) a pomocí pH papírků bylo kontrolováno pH roztoku. Poté co bylo pH neutrální a gel byl promyt od kyseliny octové (přibližně čtyřnásobným objemem pufru PBS), byl gel opět převrstven roztokem pufru PBS ($pH = 6,05$) a kolona byla připojena k zásobnímu roztoku použitého pufru PBS.

3.2.2.2 Příprava a nanesení vzorku

Ze vzorku rozmražené a centrifugované (4min. při 14 000 x g) kravské folikulární tekutiny byl odebrán vzorek o objemu $V = 1\text{ml}$ a smíchán s roztokem pufru PBS o $\text{pH} = 6,05$ o stejném objemu. Kolona byla připojena ke sběrači frakcí a nechala se protékat, dokud neprotekl veškerý pufr, jímž byl gel převrstvený. Dále bylo na kolonu opatrně nanášeno 2ml připraveného vzorku folikulární tekutiny smíchaného v poměru 1:1 s roztokem pufru PBS ($\text{pH} = 7,4$) a spuštěn sběrač frakcí nastavený na sběr frakcí o objemu $V = 3,2\text{ml}$. Vzorek se nechal vsáknout a poté převrstven stejným množstvím pufru PBS, který se též nechal vsáknout. Eluce byla prováděna pufrům PBS a připojena k zásobníku se stejným pufrům. Frakce byly průběžně proměřovány na spektrometru při vlnové délce 280nm. Po poklesu absorbance pod hodnotu $A = 0,1$ byl sběr frakcí zastaven a roztok PBS vyměněn za 3M NaCl.

3.2.2.3 Výměna roztoku pufru PBS za 3M NaCl

Kolona se nechala protékat, dokud neprotekl veškerý pufr PBS, kterým byl gel převrstven, a poté bylo opatrně nanášeno 2ml 3M roztoku NaCl a spuštěn sběrač frakcí se stejným nastavením jako pro vzorek folikulární tekutiny (viz kapitola 3.2.2.2.). NaCl byl ponechán vsáknout a převrstven stejným množstvím téhož roztoku. Eluce byla prováděna k zásobnímu roztoku 3M NaCl. Sebrané frakce byly proměřeny na spektrometru při vlnové délce 280nm dokud absorbance neklesla pod hodnotu $A = 0,1$.

Získané frakce z ionexové chromatografie s hodnotou absorbance vyšší než $A = 0,1$ byly slity dohromady a rozděleny na frakci, která protekla gelem v prostředí PBS o $\text{pH} = 6,05$; opožděnou frakci proteklou gelem v prostředí PBS o $\text{pH} = 6,05$ a frakci proteklou gelem v prostředí 3M NaCl.

Frakce byly dále používány při jiných metodách.

3.3 Stanovení aktivity enzymů frakcí z gelové a ionexové chromatografie

Azakasein patří do skupiny nescifických proteázových substrátů a pomocí něj se ve vzorku stanovuje celková proteolytická aktivita. Proteázy hydrolyzují kasein, ze kterého se uvolní fotometricky detekovatelné azo- barvivo s absorpčním maximem 442 nm.

3.3.1 Použitý materiál

- **Použitý vzorek:** Vzorek frakce III, IV, V sebrané z gelové chromatografie; vzorek opožděné frakce PBS II sebrána z ionexové chromatografie

Do všech jamek mikrotitrační destičky byl nejprve postupně napipetován 2,5% roztok azakaseinu o objemu $V = 50\mu\text{l}$. Poté bylo do první části 12 jamek přidáno 40 μl destilované vody. Tyto jamky byly použity jako blank. Do dalších tří částí byly přidány čisté frakce. Do zbylých částí byly přidány vždy příslušné frakce s příslušným inhibitorem. Složení jednotlivých částí je uvedeno v tabulce č. 2. Poté byla destička s jednotlivými vzorky vložena do inkubátoru, nastaveném na 37°C, a ponechána cca 12hodin. Po vyjmutí destičky z inkubátoru bylo do každé jamky přidáno 100 μl 0,1M HCl a centrifugováno 600g 5min. Nakonec bylo do další mikrotitrační destičky přepipetováno 100 μl čistého roztoku a proměřena absorbance při vlnové délce 450nm.

Naměřené hodnoty byly následně vyhodnoceny.

3.4 Elektroforetické metody

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu patří mezi nejvyužívanější metody pro separaci proteinů. Mezi největší výhody tohoto gelu patří, že je inertní, pevný, bezbarvý a lze snadno ovlivnit jeho vlastnosti. Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu a N, N'-metylenbisakrylamidu (BIS) za přítomnosti iniciátoru (APS, riboflavin), který je zdrojem volných radikálů. Další důležitou složkou je stabilizátor těchto radikálů, nejčastěji se používá TEMED.

Molekuly proteinů během elektroforézy procházejí skrze zesítený polymer akrylamidu a dochází k separaci v závislosti na jejich velikosti. Proteiny o větší velikosti jsou zadržovány, zatímco proteiny o menší velikosti snadno procházejí – princip „molekulového síta“.

3.4.1 SDS elektroforéza

Jedná se o typickou diskontinuální elektroforézu na polyakrylamidovém gelu s gradientem koncentrace gelu i pH.

Zaostřovací gel o nízké koncentraci AA má pH ~ 6,8. Při tomto pH je nejpohyblivější chloridový ion a nejméně pohyblivým je glycin (Gly). Proteiny se seřadí dle svých pohyblivostí mezi Cl^- a Gly a utvoří ostře ohraničené, těsně za sebou následující zóny, které se seřadí na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu.

Separací gel má vyšší koncentraci AA, kterou lze přizpůsobit velikosti separovaných látek, a pH ~ 8,3. Při tomto pH se glycin stává druhým nejpohyblivějším iontem po chloridovém iontu. Zvýšením napětí se utvořené zóny dělených složek začnou pohybovat separačním gelem a oddělovat dle svých pohyblivostí.

Vzorky jsou považeny ve vzorkovém pufru s přídavkem SDS. Tím dochází k narušení jejich terciálních struktur a v případě použití redukujícího prostředí (merkapt ethanol, dithiotreitol) i redukci disulfidových můstků. Pokud se protein skládá z více podjednotek, může dojít k jejich oddělení.

SDS patří mezi anionaktivní tenzidy, které ve vodě disociují na kationt a aniont obsahující hydrofilní a hydrofobní část. Jak již bylo uvedeno, SDS se váže na proteiny v poměru 1,4 g SDS na 1 g proteinu. Proteiny tedy získávají záporný náboj úměrný jejich M_r a podobný válcovitý tvar. Díky tomu se proteiny dělí hlavně v závislosti na svých M_r . SDS se přidává jak do vzorkového, tak do elektrodového pufru.

3.4.1.1 Použitý materiál

- **Složení pufru B:** 1,5M Tris.HCl (pH = 8,3)
18,5g Tris + 80ml dH₂O, upravit pH, dolít do 100ml dH₂O

- **Složení pufu C:** 0,5M Tris.HCl (pH = 6,8)
6g Tris + 60ml dH₂O, upravit pH, dolít do 100ml dH₂O
- **Složení 30 % roztoku AA:** 29,2 g akrylamidu + 0,8g bis-akrylamidu + 70ml dH₂O
Roztok zahřát, dokud se všechny akrylamid nerozpustí, přefiltrovat
- **Složení elektrodového pufu:** pH = 8,3; 4x koncentrovaný
15g Tris + 72g glycinu + 5g SDS, doplnit do 1000ml dH₂O

3.4.1.2 Příprava vzorků

Jako vzorky na SDS elektroforézu byly použity rozmražené frakce z gelové a inové chromatografie. Podle jednotlivých píků z grafu závislosti absorbance na elučním objemu pro gelovou chromatografii, byly smíchány jednotlivé sebrané frakce odpovídající danému píku, viz tabulka č. 2 kapitola 4. V každé jamce elektroforetického gelu by mělo být 2 μ g vzorku z dané frakce nebo z dané směsi frakcí. Při absorbanci $A = 1$ je koncentrace vzorku rovna přibližně $c = 1\text{mg/ml}$. S touto znalostí se podle naměřených absorbancí příslušných frakcí odebralo vždy potřebné množství dané frakce, které bylo následně rozpuštěno v potřebném množství vzorkového redukujícího pufu.

Jako další vzorek byla použita čistá folikulární tekutina (2 μ l folikulární tekutiny + 100 μ l vzorkového redukujícího pufu) a proteinový standard.

3.4.1.3 Příprava a nalévání gelu na SDS elektroforézu

Nejprve byla elektroforetická skla očištěna pomocí ethanolu. Poté byl do lékovky připraven separační (malopórový) 12% gel, jehož složení je uvedeno v tabulce 1, a těsně před nalitím bylo do gelu přidáno 40 μ l 10% roztoku APS a 4,5 μ l TEMEDu. Gel byl mírně promíchán a okamžitě nanesen mezi skla. Mezi skla bylo nanášeno cca 3,5ml gelu a poté opatrně převrstveno destilovanou vodou až po okraj skel. Čas polymerace se pokaždé lišil. Polymerizace byla rozpoznána dle zřetelného rozhraní mezi gelem a vodou.

Poté byl připraven roztok na zaostřovací (velkopórový) 4% gel, jehož složení je uvedeno v tabulce 2. Těsně před nanesením zaostřovacího gelu, byla ze skel s připraveným separačním gelem vylita voda, kterou byl separační gel převrstven a do roztoku zaostřovacího gelu přidáno 35 μ l 10% roztoku APS a 3,8 μ l TEMEDu. Roztok byl poté mírně promíchán a ihned nanesen cca 2 – 3mm pod okraj skel. Do roztoku byl poté rychle zanořen hřeben.

Po polymerizaci horního zaostřovacího gelu byl hřeben opatrně vyndán a skla vložena do aparatury na elektroforézu.

Tabulka 1 - Složení 12% a 10% separačního gelu

Roztoky	12% gel V[ml]	10% gel V[ml]
Pufř B (pH = 8,3)	2,5	2,5
Roztok A	4	3,3
dH ₂ O	3,5	4,1
10% SDS	0,1	0,1

Kde:

V → objem přidané látky v ml

Roztok A → 30% roztok akrylamidu

Tabulka 2 - Složení 4% zaostřovacího gelu

Složení gelu	V[μ l]
dH ₂ O	1500
Pufř C (pH = 6,8)	625
10% SDS	25
Roztok A	325
Bromfenolová modř	40

Kde:

V → objem přidané látky v μ l

Roztok A → 30% roztok akrylamidu

3.4.1.4 Nános vzorků a celkový průběh elektroforézy

Do elektroforetické vany s vloženými skly obsahující připravené gely, byl nalit zředěný elektrodový pufř. Pufř byl nalit jak do anodového (horního), tak i do katodového (spodního) prostoru. Horní prostor byl potřeba naplnit úplně, aby se pufř přelil do jamek

vytvořených hřebenem. Spodní prostor byl potřeba naplnit tak, aby byly spodky skel minimálně 2cm pod povrchem.

Poté byly rozmrazeny předem připravené vzorky z gelové a ionexové chromatografie včetně standardu a folikulární tekutiny rozpuštěné ve vzorkovém redukujícím pufru a povařeny cca 10min. Dále byly vzorky opatrně nanесeny do jamek gelu. Objemy vzorků byly v rozmezích 5 - 10 μ l.

Horní anodový prostor byl elektrodovým pufrem doplněn po okraj a elektroforetická vana připojena ke zdroji napětí.

Počáteční napětí bylo nastaveno na $U = 60V$. Toto napětí bylo ponecháno až do té doby, dokud proteiny neprošly zaostřovacím gelem (cca 20min.). Po projití bylo napětí zvýšeno na $U = 130V$. Elektroforéza byla ponechána probíhat do doby, dokud nezačala ze spodního okraje gelu vytékat bromfenolová modř. Délka elektroforézy trvala přibližně 1,5 až 2 hodin.

Po skončení elektroforézy byla skla opatrně oddělena od sebe a odříznut horní zaostřovací gel. Spodní separační gel byl vložen do Petriho misky a obarven v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250.

Po obarvení byl gel odbarven odbarvovacím roztokem a poté vyhodnocen.

3.4.2 Zymografie

Patří též mezi elektroforetické metody. Funguje na principu SDS elektroforézy, kdy se do gelu přidá inkorporační substrát enzymu – želatina.

Výsledné viditelné zóny na gelu jsou důkazem přítomnosti proteáz.

- **Složení inkubačního roztoku s $CaCl_2$**
0,0711g $CaCl_2$ + 100ml pufru TBS (pH = 8,4)
- **Složení inkubačního roztoku s Pepstatinem**
50 μ l 2mM roztoku pepstatinu + 100ml pufru TBS (pH = 8,4)
- **Složení inkubačního roztoku s kyselinou ϵ -aminokapronovou**
0,0665g kyseliny ϵ -aminokapronové + 100ml pufru TBS (pH = 8,4)
- **Složení inkubačního roztoku s EDTA**

0,0744g EDTA + 100ml pufru TBS (pH = 8,4)

3.4.2.1 Příprava gelů, nános vzorků a vlastní průběh zymografie

Gely na zymografii byly připraveny stejným způsobem jako pro SDS elektroforézu (viz kapitola 3.4.1.3). Nejprve byl připraven roztok pro 12% separační (malopórový) gel. Poté bylo do gelu přidáno potřebné množství želatiny, aby výsledná koncentrace želatiny v roztoku byla $c = 0,20\%$ (do 10ml 12% separačního gelu bylo přidáno 0,0200g želatiny), která byla stálým mícháním pomocí skleněné tyčinky za varu rozpuštěna. Poté bylo do gelu opět přidáno 40 μ l 10% roztoku APS a 4,5 μ l TEMEDu. Roztok byl mírně promíchán a nanesen mezi skla. Stejným způsobem se postupovalo i u 4% zaostřovacího (velkopórového) gelu (složení separačního a zaostřovacího gelu je uvedeno v tabulce 1 a 2 viz kapitola 3.4.1.3). Skla s gely byla vložena do elektroforetické vany. Do elektroforetické vany byl nalit zředěný elektrodový pufr a do jamek gelu nanášeny vzorky příslušném objemu. Soustavu byla připojena ke zdroji a poté byla spuštěna elektroforéza (viz kapitola 3.4.1.4).

Po ukončení elektroforézy, byly gely rozříznuty na půl (dohromady byly tedy 4 půlky gelu). Gely byly 3x po 20s promyty destilovanou vodou, a poté hodinu promývány v 2,5% roztoku Tritonu X-100 (roztok Tritonu byl během hodiny 4x vyměněn). Poté byly gely opět promyty destilovanou vodou 3x po dobu 20s. Po promytí byla každá část gelu vložena do Petriho misky. Každá miska byla naplněna jiným inkubačním roztokem pufru. Nakonec byly Petriho misky, s částí gelu a příslušným inkubačním pufrem, vloženy do inkubátoru nastaveného na 37°C po dobu přibližně 18hodin. Během inkubace byl inkubační roztok u všech gelů jedenkrát vyměněn.

Po 18 hodinách byly gely z inkubátoru vyjmuty a opět promyty destilovanou vodou 3x po 20s. Gely byly obarveny cca 2hodiny v roztoku Coomassein Brilliant Blue R-250. Po obarvení byly gely odbarveny v odbarvovacím roztoku (délka odbarvování závisela na době barvení).

Nakonec byly gely vloženy do dH₂O a vyhodnoceny.

3.5 Diferenční gelová elektroforéza

3.5.1 Příprava vzorků

3.5.1.1 Příprava vzorku A

Vzorek rozmražené centrifugované (4min. při 14 000 x g) folikulární tekutiny o objemu $V = 0,7\text{ml}$ byl rozpuštěn v bikarbonátovém pufru (pH = 8,5) o objemu $V = 2\text{ml}$. Poté bylo k roztoku folikulární tekutiny rozpuštěné v bikarbonátovém pufru přidáno 200 μl roztoku RITC a celá směs byla hodinu mírně třepána v lednici. Po jedné hodině bylo ke směsi přidáno dalších 200 μl roztoku RITC a směs byla opět mírně třepána po dobu jedné hodiny v lednici. Tento postup byl ještě dvakrát opakován. Celkový objem přidaného roztoku RITC činil $V = 0,800\mu\text{l}$. Poté bylo ke směsi folikulární tekutiny rozpuštěné v bikarbonátovém pufru s příměsí roztoku RITC přidán dvojnásobný objem vzorkového redukujícího pufru a směs byla zamrazena.

3.5.1.2 Příprava vzorku B

Byl odebrán vzorek rozmražené centrifugované (4min. při 14 000 x g) folikulární tekutiny o objemu $V = 1\text{ml}$ a v něm byl poté rozpuštěn 1mg azidu sodného ($m = 0,0010\text{g}$). Roztok byl poté převrstven roztokem toulenu o objemu $V = 1\text{ml}$ a vložen do inkubátoru nastaveného na 37°C. V intervalech po 1; 2; 4; 8; 24; 72hod, 8 a 14dnech byl odebrán vzorek autolyzované folikulární tekutiny o objemu $V = 100\mu\text{l}$ a rozpuštěn ve 100 μl bikarbonátového pufru (pH = 8,5). Poté byl ke směsi přidán roztok FITC o objemu $V = 20\mu\text{l}$ a směs byla po dobu jedné hodiny mírně třepána v lednici. Po jedné hodině bylo ke směsi přidáno dalších 20 μl roztoku FITC a vzorek byl opět po dobu jedné hodiny mírně třepán v lednici. Tento postup byl opakován ještě dvakrát. Celkový objem přidaného roztoku FITC činil $V = 80\mu\text{l}$. Poté bylo ke směsi folikulární tekutiny s azidem sodným rozpuštěné v bikarbonátovém pufru s příměsí roztoku FITC přidán dvojnásobný objem vzorkového redukujícího pufru a vzorek byl zamražen. Celkem bylo připraveno osm vzorků.

3.5.2 Diferenční SDS gelová elektroforéza

Postupovalo se stejně jako při SDS gelové elektroforéze (viz kapitola 3.4.1).

Do každé jamky bylo nanášeno 5 μ l vzorku A a 5 μ l příslušných časových intervalů vzorku B. Do poslední jamky bylo nanášeno 2 μ l proteinového standardu.

Poté byla horní anodová část doplněna elektrodoým puřrem a aparatura připojena ke zdroji. Následoval vlastní průběh elektroforézy (viz kapitola 3.4.1.4).

Po skončení elektroforézy byl z elektroforetických skel opatřně vyjmut gel a z gelu odříznutý horní zaostřovací gel. Poté byl gel vložen do Petriho misky a obarven v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-450. Po obarvení byl gel odbarven v odbarvovacím roztoku a vyhodnocen.

3.5.3 Diferenční SDS elektroforéza pro zobrazení na UV

Mezi elektroforetická skla byl nanášen připravený 10% (malopórový) separační gel, na který byl po polymeraci nanášeno 4% (velkopórový) gel, do kterého byl poté vložen hřeben pro vytvoření jamek (viz kapitola 3.4.1.3). Skla s gely byla vložena do aparatury na elektroforézu a do elektroforetické vany nalit zředěný elektrodoým puřr (viz kapitola 3.4.1.3).

Do jamek byl nanášeno 1 μ l roztoku A a k němu byl přidán 1 μ l vzorku B příslušného časového intervalu. Do jedné jamky bylo nanášeno 2 μ l proteinového standardu.

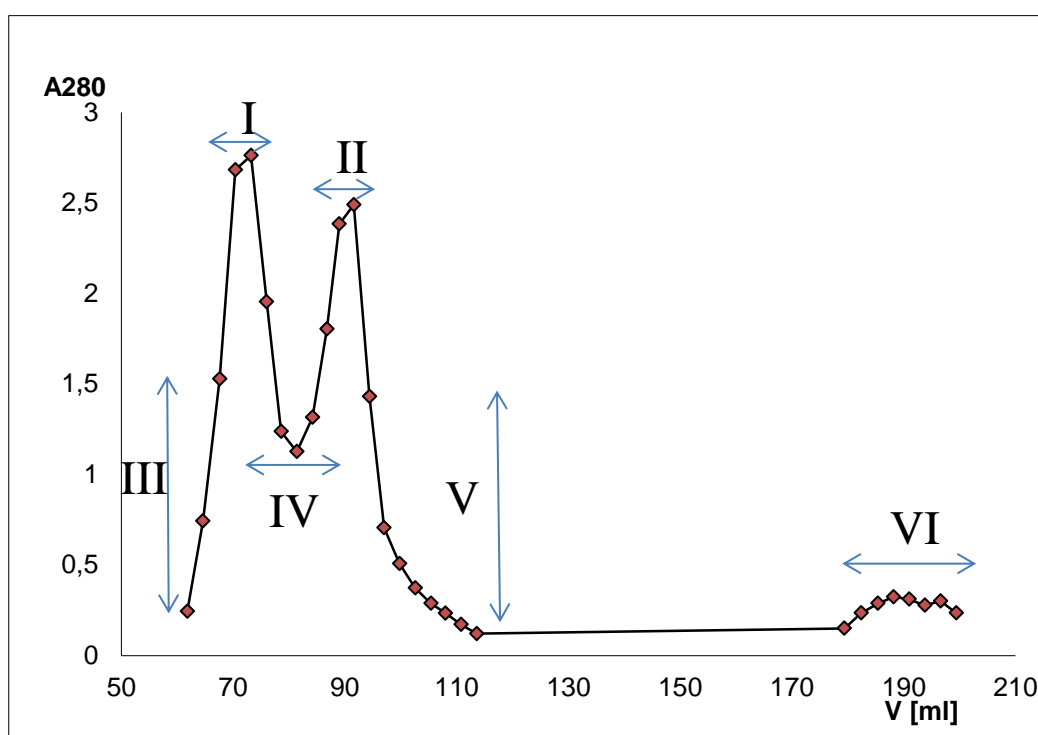
Poté byla horní anodová část doplněna elektrodoým puřrem a aparatura připojena ke zdroji. Dále následoval vlastní průběh elektroforézy (viz kapitola 3.4.1.4).

Po skončení elektroforézy byl z elektroforetických skel opatřně vyjmut gel a následně z něj odříznut vrchní zaostřovací gel. Následně byl gel vložen do Petriho misky a sražen v odbarvovacím roztoku. Gel byl poté vyhodnocen pomocí prosvicovačky s excitační vlnovou délkou $\lambda = 350\text{nm}$. Zelené skvrny odpovídaly vzorku A, červené vzorku B.

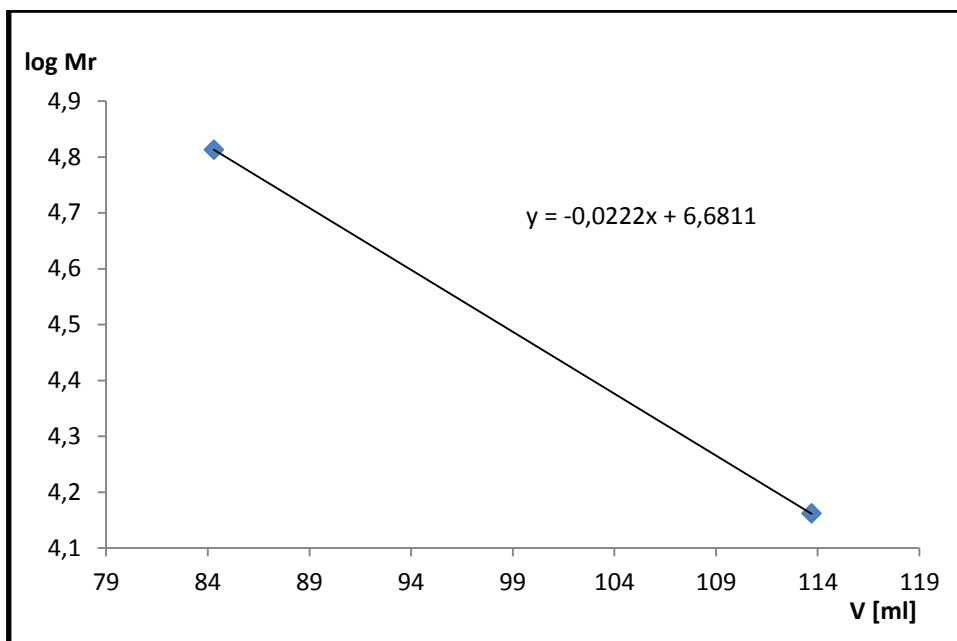
4. Výsledky

4.1 Gelová chromatografie folikulární tekutiny krávy

Gelová chromatografie folikulární tekutiny byla prováděna v prostředí pufru PBS o $\text{pH} = 7,4$ na Sephadexu G-100. Výsledky gelové chromatografie jsou zobrazeny v grafu (viz obrázek 6). Získané frakce byly spojeny podle brázku 7. Rozmezí molekulových hmotností získaných frakcí jsou zobrazeny v tabulce. U proteinových frakcí získaných z gelové chromatografie byla stanovena proteolytická aktivita. Dále s nimi byla provedena SDS elektroforéza a proteolytická aktivita byla sledována i zymograficky.



Obrázek 6 - Graf zobrazující rozdělení proteinů folikulární tekutiny krávy. Folikulární tekutina byla rozdělena na frakce I – VI. Frakce I obsahuje proteinové molekuly o elučním objemu v rozmezí $V = 70 - 73$ a relativní molekulové hmotnosti v rozmezí $M_r = 114\ 000 - 131\ 000$; Frakce II obsahuje proteiny o elučním objemu v rozmezí $V = 89 - 92$ a relativní molekulové hmotnosti v rozmezí $M_r = 44\ 000 - 51\ 000$; Frakce III obsahuje proteiny o elučním oejmu v rozmezí $V = 62 - 68$ a relativní molekulové hmotnosti v rozmezí $M_r = 151\ 000 - 204\ 000$; Frakce IV obsahuje proteiny o elučním objemu v rozmezí $V = 76 - 87$ a relativní molekulové hmotnosti v rozmezí $M_r = 57\ 000 - 99\ 000$; Frakce V obsahuje proteiny o elučním objemu v rozmezí $V = 94 - 114$ a relativní molekulové hmotnosti v rozmezí $M_r = 14\ 000 - 38\ 000$; Frakce VI obsahuje molekuly o elučním objemu v rozmezí $V = 179 - 199$ a relativní molekulové hmotnosti v rozmezí $M_r = 180 - 500$.



Obrázek 7 - Kalibrační křivka pro stanovení relativních molekulových hmotností sebraných frakcí

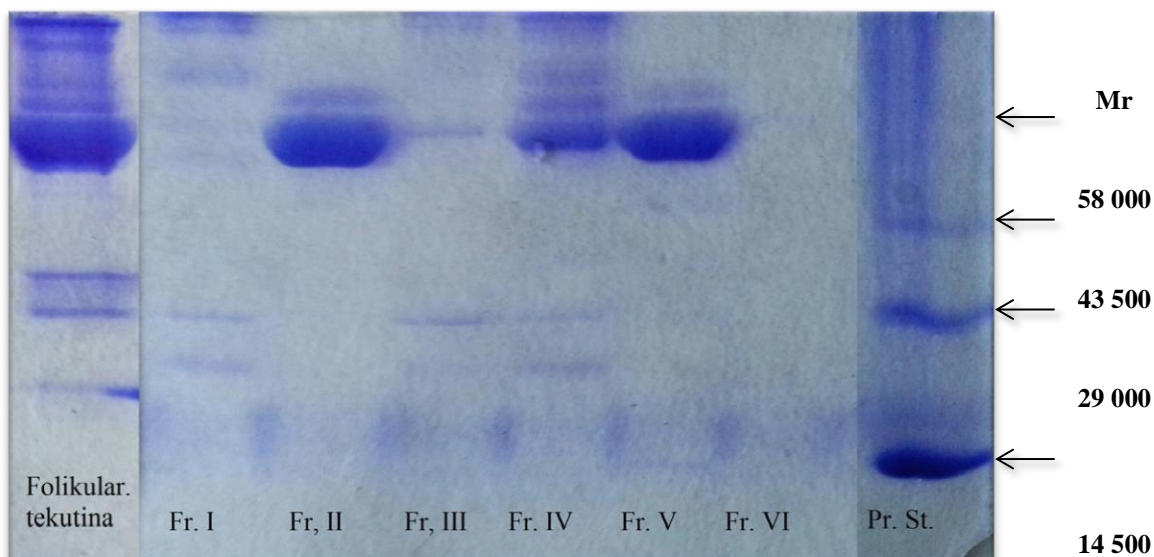
Byla provedena kalibrace kolony pro gelovou chromatografií a byl sestaven kalibrační graf pro stanovení relativních molekulových hmotností vzorků frakcí I – VI (viz obrázek 7). Jednotlivé molekulové hmotnosti pro dané vzorky frakcí jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 - Tabulka zobrazující relativní molekulové hmotnosti jednotlivých vzorků frakcí

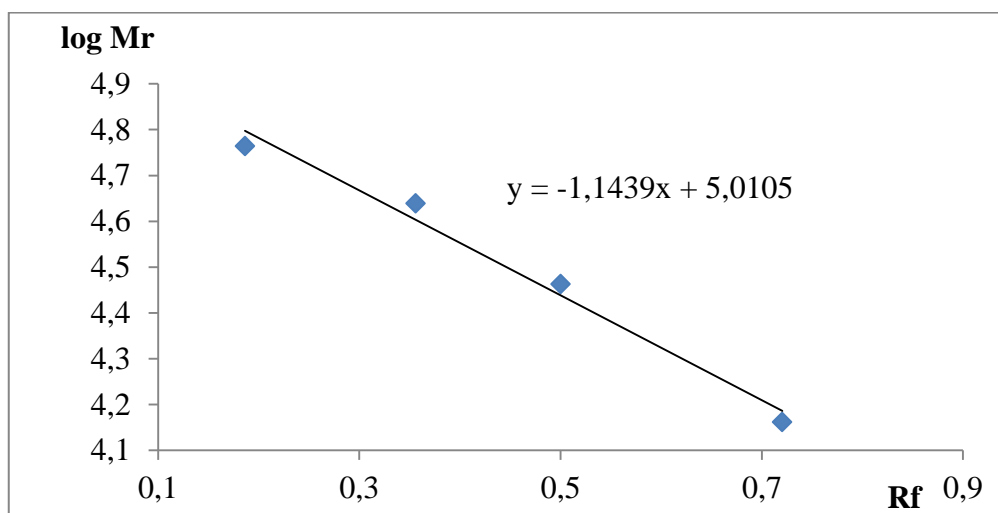
Vzorek Frakce	Mr
I	114 000 – 131 000
II	44 000 – 51 000
III	151 000 – 204 000
IV	57 000 – 99 000
V	14 000 – 38 000
VI	180 - 500

4.1.1 Výsledky SDS elektroforézy s frakcemi z gelové chromatografie

Frakce z gelové chromatografie byly dále použity jako vzorky pro SDS elektroforézu v redukujícím prostředí (viz obr. 8 strana 38). Frakce VI obsahuje nízkomolekulární látky neproteinové povahy, byla proto dalších experimentů vyloučena. Pro další metody se již používaly jen vzorky frakcí I – V.



Obrázek 8 – Výsledky SDS elektroforézy s použitými vzorky směsí frakcí I – VI z gelové chromatografie v redukujícím prostředí.



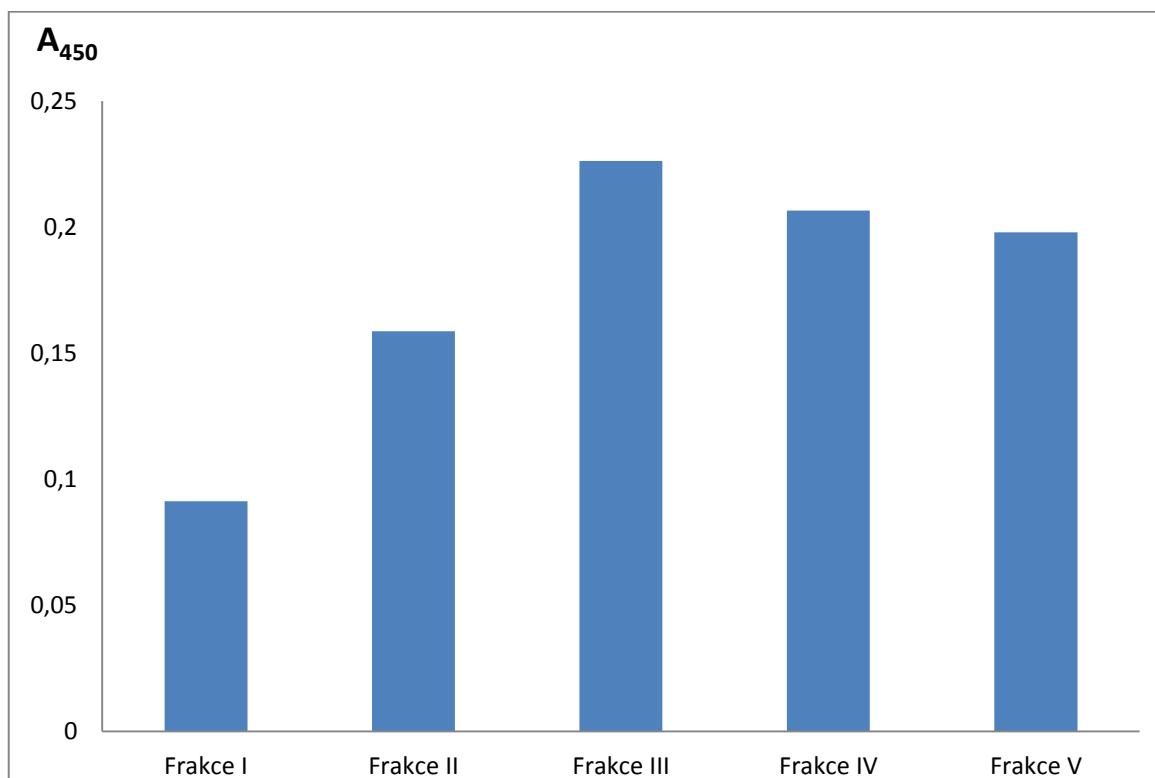
Obrázek 9 – Kalibrační křivka pro určení relativních molekulových hmotností proteinů vzorků frakcí z gelové chromatografie, zobrazených na SDS elektroforéze (viz obrázek 8).

Pomocí kalibrační přímky z grafu závislosti dekadického logaritmu relativní molekulové hmotnosti na retenčním faktoru (viz obrázek 9), byly určeny relativní molekulové hmotnosti proteinů ve vzorku frakcí I – V. Relativní molekulové hmotnosti pro dané vzorky frakcí jsou zobrazeny v tabulce 4.

Tabulka 4 - Tabulka zobrazující relativní molekulové hmotnosti jednotlivých vzorků frakcí

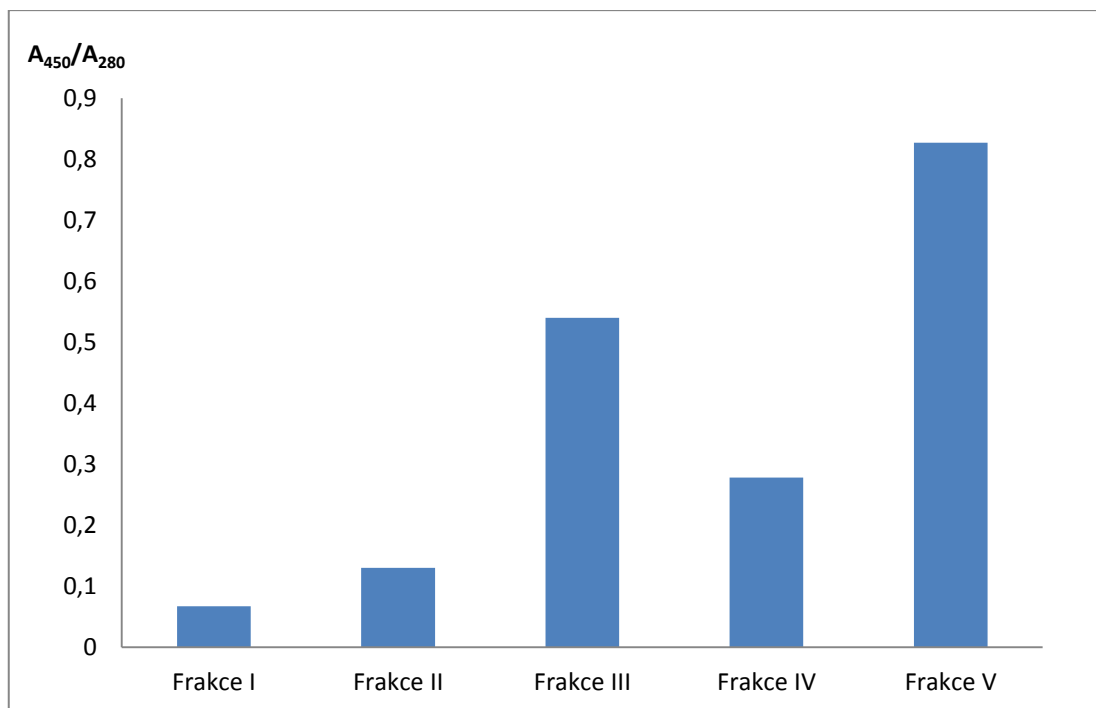
Vzorek frakce	Mr získané z SDS elektroforézy s frakcemi z gelové chromatografie (viz kapitola 3.4.1)	Mr získané ze zymografie s frakcemi z gelové chromatografie (viz kapitola 3.4.2)
I	94 000 77 000 66 000 56 000 29 000 24 000	X
II	70 000 55 000	82 000
III	94 000 60 000 28 000	82 000
IV	96 000 90 000 75 000 67 000 56 000 29 000 23 000	82 000
V	69 000 54 000	78 000 75 000 63 000
Folikulární tekutina	95 000 78 000 67 000 51 000 30 000 25 000 17 000	X

4.1.2 Stanovení proteolytické aktivity frakcí kravské folikulární tekutiny po gelové chromatografii



Obrázek 10 - Graf zobrazující aktivitu směsi frakcí I – V sebraných z gelové chromatografie s nespecifickým proteázovým substrátem azakaseinem, při absorbanzi měřené při vlnové délce 450nm v prostředí pufru PBS o pH = 7,4.

Z obrázku 10 můžeme vidět, že proteolytická aktivita byla přítomna ve všech frakcích a s těžší můžeme odhadnout ve které frakci je aktivita nejvyšší. Pro lepší určení jsme proteolytickou aktivitu, měřenou při 450nm, která je typická pro štěpení proteolytického substrátu azakaseinu, podělili absorbanzí měřenou při 280nm, která se používá pro stanovení množství proteinů (viz obrázek 11 strana 41).



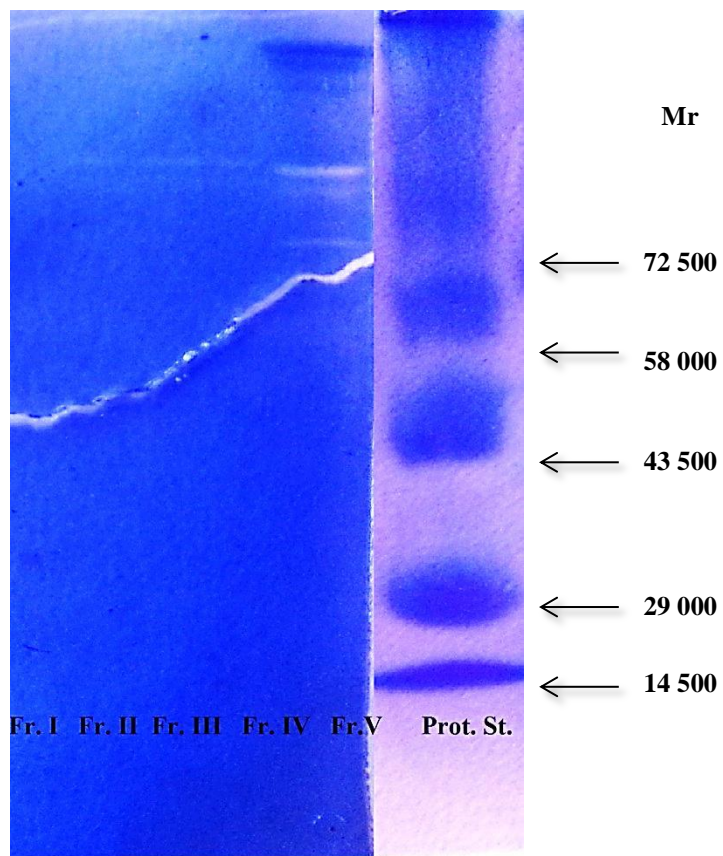
Obrázek 11 - Graf zobrazující specifickou aktivitu směsí frakcí I – V sebraných z gelové chromatografie v prostředí PBS o pH = 7,4 při absorbanční o vlnové délce 450nm podělenou absorbančí při vlnové délce 280nm.

Z grafu zobrazujícího specifickou proteolytickou aktivitu vzorků frakcí I – V (viz obrázek 11) můžeme určit, že specifická proteolytická aktivita se opět vyskytuje u všech frakcí, ale nejvyšší specifickou aktivitu vykazují vzorek frakce III a V.

Frakce z gelové chromatografie byly dále použity k zymografickému stanovení relativní molekulové hmotnosti proteinů.

4.1.3 Zymografie s frakcemi z gelové chromatografie.

Frakce z gelové chromatografie byly dále použity pro zymografii (viz obrázek 12 strana 42). Z výsledků zymografie byly všechny vzorky hůře čitelné, nejčitelnější byl vzorek frakce V. Vzorek frakce I nebyl čitelný vůbec.

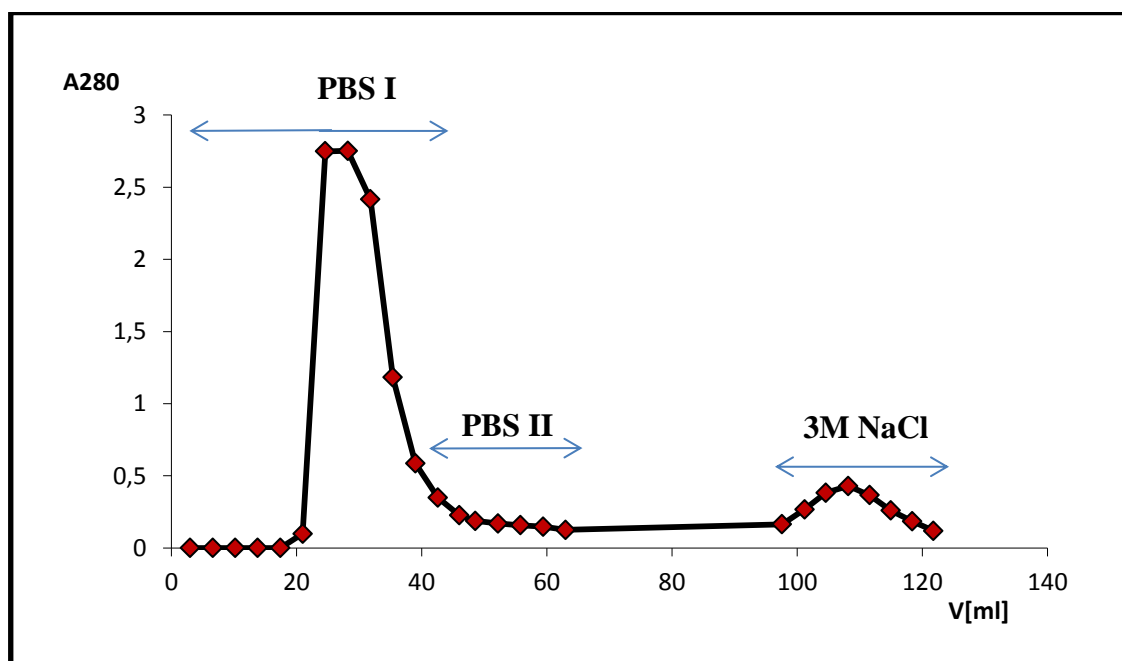


Obrázek 12 - Výsledky zymografie v redukujícím prostředí se vzorky z gelové chromatografie.

Vypočítané relativní molekulové hmotnosti frakcí ze zymografie jsou uvedeny v tabulce 4 na straně 39.

4.2 Ionexová chromatografie kravské folikulární tekutiny

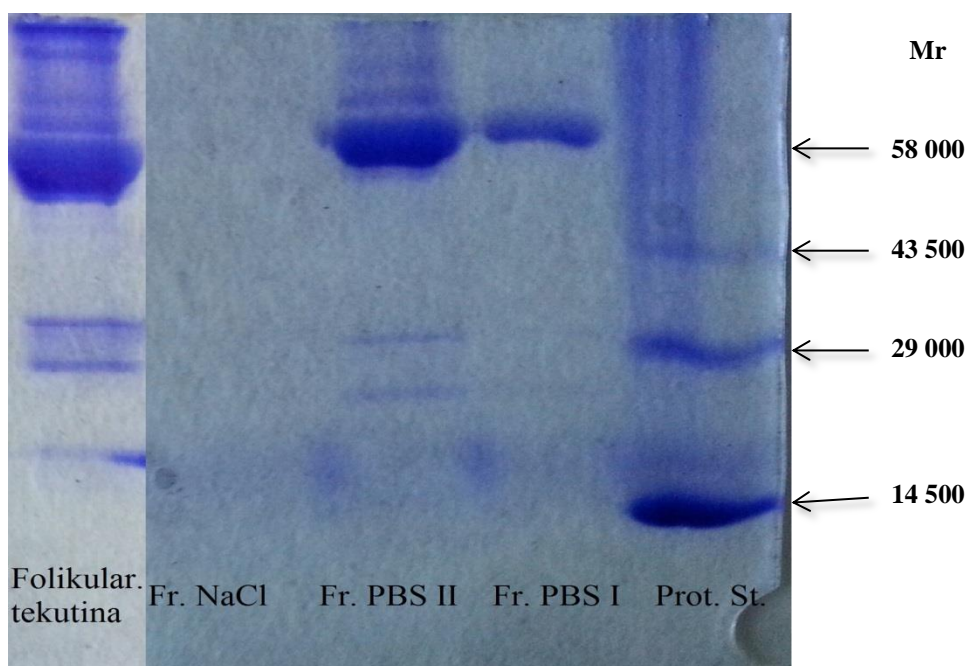
Ionexová chromatografie folikulární tekutiny byla prováděna v prostředí pufru PBS o $\text{pH} = 6,05$ a v prostředí 3M roztoku NaCl na Sephadexu DEAE. Výsledky gelové chromatografie jsou zobrazeny v grafu (viz obrázek 13). Získané frakce byly spojeny podle obrázku 11. Rozmezí molekulových hmotností získaných frakcí jsou zobrazeny v tabulce 5 na straně 45. U proteinových frakcí získaných z ionexové chromatografie byla spektrofotometricky stanovena proteolytická aktivita. Dále s nimi byla provedena SDS elektroforéza v redukujícím prostředí a proteolytická aktivita byla sledována i zymograficky.



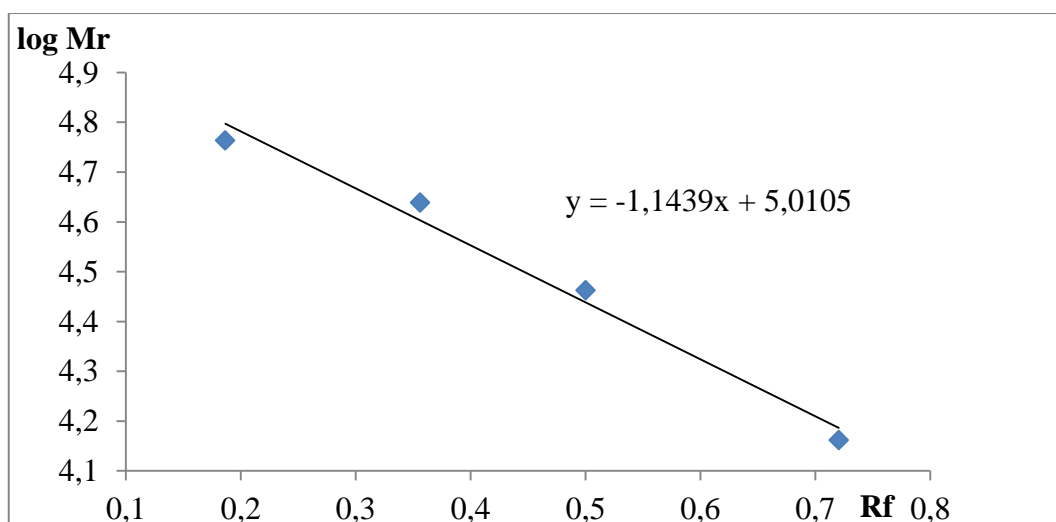
Obrázek 13 – Graf zobrazující závislost absorbance jednotlivých frakcí ionexové chromatografie v prostředí pufru PBS o $\text{pH} = 6,05$ a v prostředí 3M roztoku NaCl, měřené při vlnové délce 280nm na elučním objemu uváděném v ml. Byly získány frakce PBS I, PBS II a 3M NaCl. Frakce PBS I byla připravena slíáním elučních objemů $V = 25 + 28 + 32 + 35$; Frakce PBS II byla připravena slíáním elučních objemů $V = 39 + 43 + 46 + 49 + 52 + 56 + 59 + 63$; Frakce 3M NaCl byla připravena slíáním elučních objemů $V = 98 + 101 + 105 + 108 + 112 + 115 + 118 + 122$.

4.2.1 Výsledky SDS elektroforézy s frakcemi z ionexové chromatografie

Frakce z ionexové chromatografie byly dále použity jako vzorky pro SDS elektroforézu (viz obr. 14 a tabulka 5 strana 45).



Obrázek 14 - Výsledky SDS elektroforézy v redukcujícím prostředí s použitými vzorky z ionexové chromatografie.



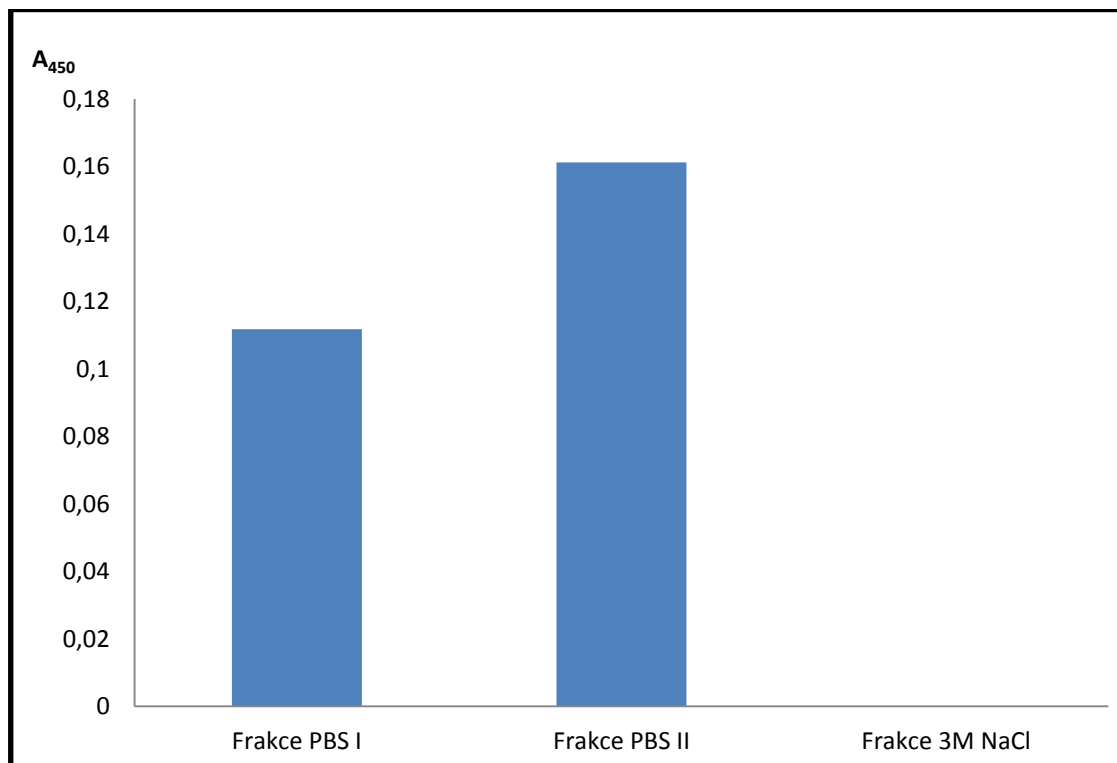
Obrázek 15 - Kalibrační křivka pro určení relativních molekulových hmotností proteinů vzorků frakcí z ionexové chromatografie, odečtených z SDS elektroforézy (viz obrázek 14).

Pomocí kalibrační přímky z grafu závislosti dekadického logaritmu relativní molekulové hmotnosti na retenčním faktoru (viz obrázek 15 strana 44), byly určeny relativní molekulové hmotnosti proteinů ve vzorku frakcí PBS I a PBS II. Relativní molekulové hmotnosti pro dané vzorky frakcí jsou zobrazeny v tabulce 5.

Tabulka 5 - Tabulka zobrazující relativní molekulové hmotnosti proteinů pro jednotlivé vzorky frakcí

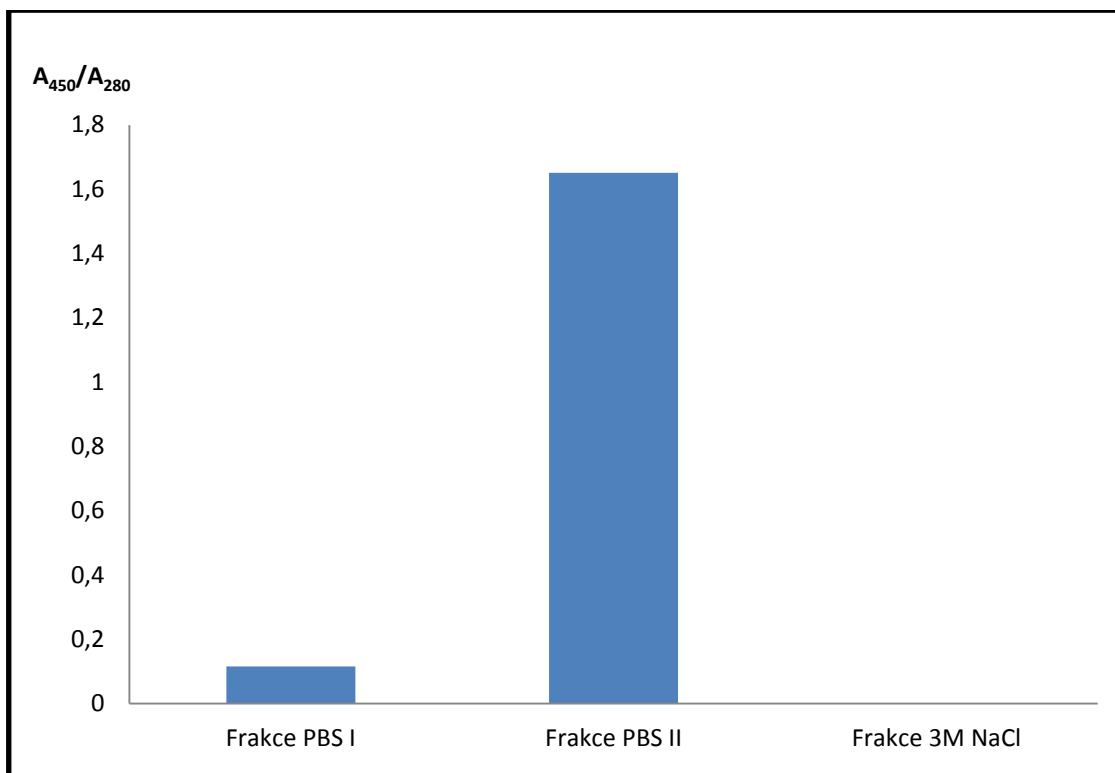
Vzorek frakce	Mr získané z SDS elektroforézy s frakcemi z ionexové chromatografie (viz kapitola 3.4.1)	Mr získané ze zymografie s frakcemi z ionexové chromatografie (viz kapitola 3.4.2)
PBS I	64 000	85 000
PBS II	86 000	83 000 78 000 69 000
	75 000	
	60 000	
	31 000	
Folikulární tekutina	25 000	X
	95 000	
	78 000	
	67 000	
	51 000	
	30 000	
	25 000	
	17 000	

4.2.2 Stanovení proteolytické aktivity frakcí kravské folikulární tekutiny po ionexové chromatografii



Obrázek 16 – Graf zobrazující specifickou aktivitu směsí z ionexové chromatografie v prostředí pufru PBS o pH = 6,05 a 3M roztoku NaCl, s použitým proteázovým substrátem azakaseinem, měřené při absorbanční o vlnové délce 450nm.

Z grafu na obrázku 16 můžeme vidět, že proteolytická aktivita se vyskytuje ve všech frakcích, až na frakci sebranou z prostředí 3M roztoku NaCl. Mezi aktivitami vzorku frakce PBS I a zpožděné frakce PBS II je jen nepatrný rozdíl, a proto jsme pro lepší určení proteolytickou aktivitu, měřenou při 450nm, která je typická pro proteolytické štěpení substrátu azakaseinu, podělili absorbanční měřenou při 280nm, která se používá pro stanovení množství proteinů (viz obrázek 17 strana 47).



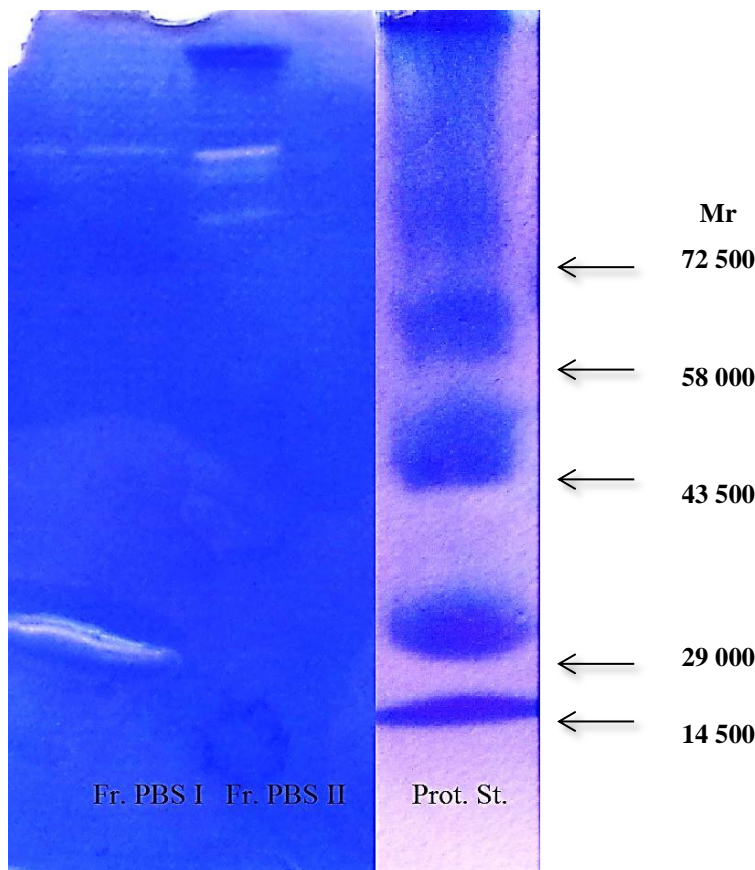
Obrázek 17 – Graf zobrazující specifickou aktivitu vzorků frakcí z ionexové chromatografie v prostředí pufru PBS o pH = 6,05 a 3M roztoku NaCl s použitým proteázovým substrátem azakaseinem, měřených při absorbanci o vlnové délce 450nm podělené absorbancí o vlnové délce 280nm.

Z grafu zobrazujícího proteolytickou aktivitu při absorbanci 450nm, podělenou absorbancí při vlnové délce 280nm, zobrazeného na obrázku 17, je již zřejmé, že nejvyšší specifickou aktivitu vykazuje vzorek opožděné frakce PBS II.

Vzorky frakce PBS I a opožděné frakce PBS II byly dále použity k zymografickému stanovení relativní molekulové hmotnosti proteinů.

4.2.3 Zymografie s frakcemi z ionexové chromatografie

Frakce z ionexové chromatografie byly dále použity na zymografii (viz obrázek 18 strana 48). Z výsledků zymografie byly oba dva vzorky hůře čitelné, vzorek PBS I je téměř nečitelný.



Obrázek 18 - Výsledky zymografie v redukujícím prostředí se vzorky z ionexové chromatografie.

Vypočítané relativní molekulové hmotnosti frakcí ze zymografie jsou uvedeny v tabulce 5 na straně 45.

4.3 Vyhodnocení inhibice proteáz jednotlivými inhibitory pro frakce z gelové a ionexové chromatografie

Z výsledků získaných vyhodnocením proteolytické aktivity jednotlivých vzorků frakcí z gelové a ionexové chromatografie, bylo rozhodnuto, že pro další vyhodnocení budou použity vzorky frakcí III, IV a V z gelové chromatografie a vzorek opožděné frakce PBS II z ionexové chromatografie, protože právě tyto vzorky vykazovaly nejvyšší specifickou aktivitu.

S použitím inhibitorů Pepstatinu, EDTA a ϵ -aminokapronové kyseliny, jsme mohli určit, které typy proteáz se v daných vzorcích nachází. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6 na straně 49.

Tabulka 6 - Tabulka shrnující pozitivní, či negativní inhibici pro jednotlivé vzorky frakcí z gelové a ionexové chromatografie

Frakce z gelové a ionexové chromatografie	Inhibice		
	Pepstatin (aspartátové proteázy)	EDTA (metalloproteázy)	ϵ -aminokapronová kyselina (serinové proteázy)
III	+	+	+
IV	-	-	+
V	+	-	+
PBS II	+	+	+

Kde:

+ → inhibuje

- → neinhibuje

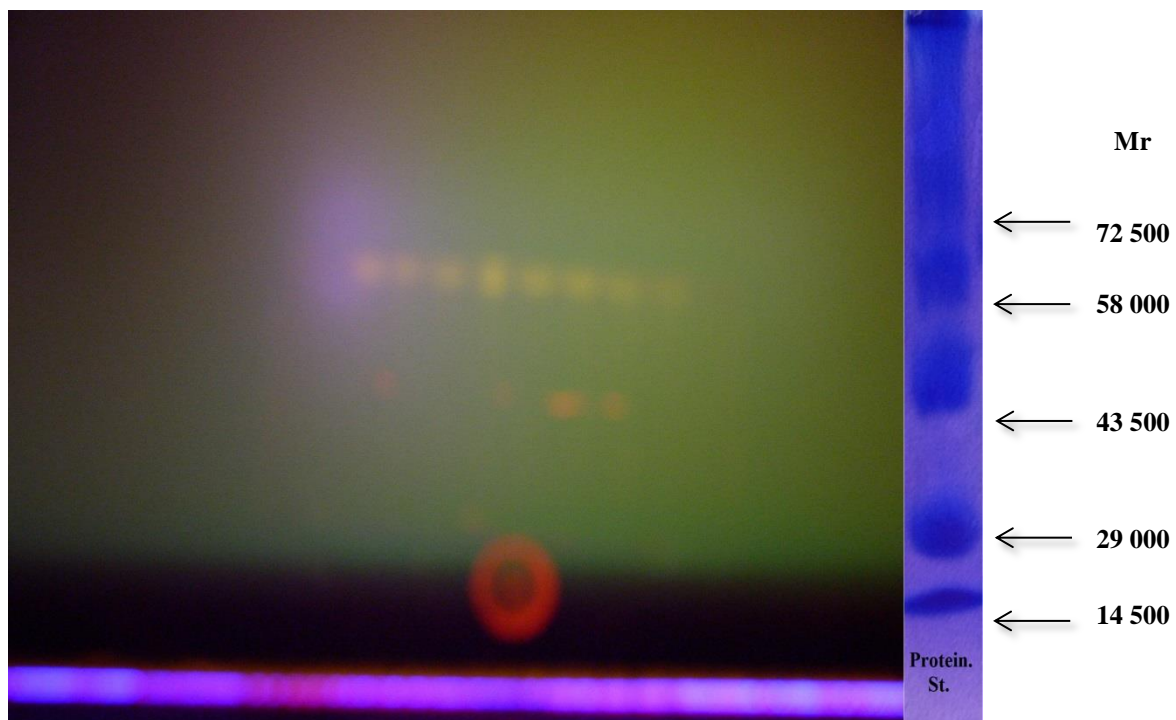
Pepstatin je silný inhibitor aspartátových proteáz (viz kapitola 1.6.1.5), a proto je zřejmé, že frakce III a IV z gelové chromatografie a frakce PBS II z ionexové chromatografie obsahují aspartátové proteázy.

EDTA je známý inhibitor metalloproteáz (viz kapitola 1.6.2.1), a proto je zřejmé, že frakce III z gelové chromatografie a frakce PBS II z ionexové chromatografie obsahují metalloproteázy.

E – aminokapronová kyselina inhibuje serinové proteázy (viz kapitola 1.6.2.2). Serinové proteázy jsou tedy obsaženy ve všech frakcích.

4.4 Výsledky sledování autolýzy kravské folikulární tekutiny proteázami v ní přítomných

Pro sledování autolýzy proteinů folikulární tekutiny jsme použili metodu diferenční SDS elektroforézy. Původní vzorky byly obarveny Flurescein-isothiokyanátem a autolyzované vzorky byly obarveny Rodamin B-isothiokyanátem (viz obrázek 19 strana 50). Z obrázku 19 na straně 50 můžeme vidět, že k autolýze proteinů folikulární tekutiny opravdu dochází, ale až po delší době (v řádu dní) a je velmi slabá.



Obrázek 19 – Prosvícený gel z diferenční gelové elektroforézy s výslednými drahami proteinů. Zeleně svítí vzorek A označený FITC, červeně autolyzovaný vzorek B označený RITC.

5. Diskuze

Reprodukce, respektive fertilizace je velmi komplexní proces, v němž se setkávají gamety na místě, v prostředí a v čase k tomuto setkání optimálním.

Ke zdárnému průběhu tohoto rendez-vous je zapotřebí, aby gamety vyslaly celou řadu signálů a ty byly zpracovány a správně interpretovány hostitelským prostředím ⁴.

Folikulární tekutina je v současné době považována za dobrý potencionální zdroj signálu o začátku sestupu ovaria do vejcovodu. Je to dáno několika významnými faktory:

1. objem folikulární tekutiny zralého folikulu (2-10 ml) ztelně převyšuje objem oviduktu, kde dochází k fertilizaci ^{5,6}.
2. složení folikulární tekutiny se mění v závislosti na zrání folikulu a to zvláště v okamžiku před prasknutím folikulu ¹⁰.
3. folikulární tekutina je chemoatraktant pro spermie ⁷.

Vzhledem k objemu folikulární tekutiny mají enzymové aktivity v ní přítomné značný potenciál moderovat prostředí oviduktu v němž dochází k fertilizaci. Kromě aktivit glykosidáz, esteráz jsou ve folikulární tekutině přítomné i aktivity proteolytické. Role proteolytických aktivit, jimiž se zabývá předkládaná studie, v reprodukčním traktu, je různými autory vnímána různě. Od pouhého pasivního přestupu proteáz z krve, přes modulaci prostředí reprodukce štěpením povrchových antigenů a odhalováním nových epitopů až po studie zabývající se proteolýzou jakožto součástí nespecifických imunitních procesů ^{10,13}.

V předkládané studii jsme se zabývali metodikami izolace proteáz z folikulární tekutiny. Pro studie byly vybrány zralé folikuly o velikosti 3-5mm, z nichž byla odsáta folikulární tekutina. Byla změřena proteolytická aktivita folikulární tekutiny a folikulární tekutina byla dále separována 2 postupy:

1. gelovou chromatografií – za účelem zjištění nativní Mr proteáz a dále proto, abychom se zbavili majoritního proteinu folikulárních tekutin - sérového albuminu. S proteiny získaných frakcí byla provedena SDS elektroforéza a zymografie, která ukázala, že z hlediska proteáz je pro další studie nejvhodnější frakce V (s proteiny v rozmezí Mr 14 000 – 38 000) v níž jsou obsaženy všechny proteázy folikulárních

tekutin, jedná se taktéž o frakci s nejvyšší specifickou aktivitou. U této frakce byla taktéž zymograficky i spektrofotometricky pomocí štěpení chromogenního substrátu azakaseinu sledována inhibice proteolytické aktivity pomocí specifických inhibitorů proteáz. Bylo zjištěno, že folikulární tekutina resp. její proteázy jsou částečně inhibovány EDTOU, pepstatinem i ϵ -aminokapronovou kyselinou a že tedy obsahuje jak metalloproteázy, tak proteázy serinové i aspartátové. Poměry obsahu jednotlivých typů proteáz se mírně liší u gelové chromatografie v jednotlivých frakcích, metoda gelové chromatografie je tedy vhodnou k částečnému oddělení jednotlivých typů proteáz.

2. ionexovou chromatografií – kdy dojde při pH 6,8 na DEAE sephadexu k nabohacení proteolytické aktivity do frakce zpožděné při promývání PBS. Tato frakce vykazuje obdobné spektrum proteáz jako frakce V z gelové chromatografie.

Kombinace obou metod se tedy jeví jako perspektivní pro finální purifikaci proteáz folikulárních tekutin, která však nebyla z časových důvodů provedena.

K identifikaci potenciálních nativních substrátů proteáz v reprodukčních traktech byla zavedena metoda DIGE (Diferential gel electrophoresis). Tato metoda ukázala, že v případě folikulárních tekutin je autolýza relativně pomalým jevem, kdy až v řádu dní jsou pozorovatelné autodegradační produkty. Taktéž se ukázaly nevýhody metodiky DIGE, kdy dochází k barvení některých, zvláště albuminových proteinů a bohužel v našem případě i majoritního sérového albuminu, lépe než proteinů jiných typů. Pro další práci tedy bude nutné provést depleci (reprodukčně nepodstatného) albuminu ze vzorku.

Přestože je role proteáz v reprodukčním traktu stále otázkou, jejich přítomnost ve všech kompartmentech tohoto traktu a ve všech tekutinách reprodukčních traktů, v hladinách aktivit značně převyšujících hladiny v krevním séru, stejně jako schopnost modulovat prostředí reprodukčního procesu interakcí s fertilizačně důležitými proteinovými komponentami podle autora naznačuje potenciálně důležitou úlohu proteáz při reprodukci. Izolace a charakterizace proteáz folikulární tekutiny je tedy prvním krokem v poznání funkce těchto proteinů v komplexním procesu fertilizace.

6. Závěr

- Izolace folikulární tekutiny byla provedena dvěma metodami – gelovou a ionexovou chromatografií
- Z gelové chromatografie byly sebrány frakce I – VI v rozmezí $M_r = 180 - 204\ 000$
- U sebraných frakcí z gelové i ionexové chromatografie byla proměřena proteolytická aktivita
- Nejvyšší proteolytickou aktivitu z frakcí z gelové chromatografie vykazoval vzorek frakce V a z ionexové chromatografie vzorek zpožděné frakce VI
- Proteolytická aktivita frakcí z gelové a ionexové chromatografie byla sledována též pomocí metody SDS elektroforézy a zymografie
- U vybraných frakcí (III, IV a V z gelové chromatografie a PBS II z ionexové chromatografie) byly určeny typy proteáz v nich se vyskytujících
- Metodou DIGE byla sledována autolýza folikulární tekutiny

7. Seznam použité literatury

1. Romanovský, A. a kol.: Obecná biologie, SPN, Praha (1988)
2. Knoz, J.: Obecná zoologie II, SPN, Praha (1990)
3. http://ksz.zf.jcu.cz/studium_vzdelavani/studijni_materialy_informace/Reprodukce%20hospodarskych%20zvirat/prednasky/2-anatomie-pohlavnich-organu; staženo dne 9. 5. 2013
4. <http://ksz.af.czu.cz/reprodprezvyk/text.pdf>; staženo dne 9. 5. 2013
5. Mossman, H.W., Duke, K.L.: Comparative morphology of the mammalian ovary, Univ Wisconsin Press, Madison, (1973)
6. Mc Natty, K.P., Jones, R.E.: The vertebrate ovary, Plenum Press, New York, 215 – 259, (1978)
7. Eisenbach, M., Giojalas, L.C.: Nat Rev Mol Cell Biol. 7, 276-85 (2006)
8. Teves, M.E., Barbano, F., Guidobaldi, H.A., Sanchez, R., Miska, W., Giojalas, L.C.: Fertil Steril 86, 745-9 (2006)
9. Lipner, H. Estwood, E.B., Greep, R.: Handbook of physiology-endocrinology, vol II, sect. 7, Am Physiol Soc, Washington DC, 409 – 437 (1973)
10. Gwatkin, R.B.L., Motta, P.M., Hafez, E.S.E.: Biology of the ovary, Nijhoff, The Hague, 209 – 214, (1980)
11. Mc Natty, K.P., Makris, A., Osathanondh, R., Ryan, K.J.: J Clin Endocrinol Metab, 49, 851, (1980)
12. Edwards, R.G.: J Reprod Fertil 37, 189 (1974)
13. Gabler, C., Killian, G.J., Einspanier, R.: Reproduction 122, 121–130 (2001)
14. Kolektiv autorů: BIOHEMIE Základní kurz, Nakladatelství Karolinum 59, 116 – 117 Praha (2009)
15. KODÍČEK, M. proteasy. From Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2013-04-08]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=proteasy>
16. Osobní sdělení doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc.: přednáška Biochemie II
17. Duncan, W.C., McNeilly, A.S., Illingworth, P.J.: J Clin Endocrinol Metab 83, 2470–8 (1998)
18. VOET, Donald; VOET, Judith. Biochemie 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-44-9.

19. Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology; revised edition. Příprava vydání R. Cammack et al. New York: Oxford university press, 2006. ISBN 0-19-852917-1
20. <https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fbiochemie.lf2.cuni.cz%2Fcesky%2Fbio%2Fzimni%2Fprednasky%2FBiosynt%25C3%25A9za%2520a%2520degradace%2520protein%25C5%25AF.pptx&ei=WriUUueFD4imtAbYh4DwDA&usg=AFQjCN GmXcoqBNTRB6D1-A6JU6ij-ITlhA&sig2=XoLkXDCAXAdrudjfWg91SA&bvm=bv.50952593,d.YmsPrezentace> : staženo dne 20. 5. 2013
21. Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M (1970). "Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes" J Antibiot 23 (5): 259–62. doi:10.7164/antibiotics.23.259.PMID 4912600
22. Dominguez, K; Ward, WS (December 2009). "A novel nuclease activity that is activated by Ca(2+) chelated to EGTA". Systems Biology in Reproductive Medicine 55 (5-6): 193-99. doi:10.3109/19396360903234052
23. Auld D.S "Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases " Methods Enzymol (1995) 248, 228-242
24. http://en.wikipedia.org/wiki/Aminocaproic_acid; staženo dne 15. 5. 2013

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------