

13. GYAKORLAT

BIOTRANSZFORMÁCIÓS ENZIMEK VIZSGÁLATA

1. Anilin hidroxiláz aktivitásának mérése

Végpontos kolor-teszt

Bevezetés

A citokróm P450 hem-proteinek, kivéve a vörös vérszöveteket és az izomszöveteket, minden emlős sejttypusban megtalálhatók. A citokróm P450 izoenzimek prokariotákban is előfordulnak. Szubsztrát-specifitásuk igen széles tartományban van, a legkülönbözőbb szerkezetű vegyületek oxidációját katalizálják. Szubsztrátjaik között szerepelnek: a szervezetben szintetizált vegyületek (endogén), mint pl. szteroidok, zsírsavak, prosztaglandinok és leukotriének, valamint vegyületek mint a gyógyszerek, élelmiszer adalékok vagy ipari melléktermékek, amelyek a táplálékkal, injekcióval, belélegzéssel, bőrön keresztül felszívódva kerülhetnek a szervezetbe (exogén vegyületek, xenobiotikumok).

A lipofil vegyületek lebontása, szervezetből való kiürítése két lépésben történik. A vízdékonyság növelésére pl. az aromás vegyületek hidroxilálódnak, vagy más reaktív, hidrofilebb csoportok alakulnak ki (I. fázis reakciói). Az új hidroxilcsoportra további szubsztituensek (glükuronsav, glicin, szulfát, stb.) kapcsolódhatnak, növelve a vízdékonyságot és ezzel gyorsítva a szervezetből való kiürülést (II. fázis reakciói).

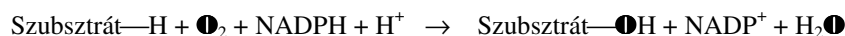
A citokróm P450 rendszer részt vesz:

- a szteroid hormonok bioszintézisének néhány lépésében
- zsírsavak és néhány származékuk metabolizmusában
- gyógyszerek inaktiválásában vagy aktiválásában
- vegyületek átalakításában, aminek során reaktív molekulák is képződhetnek

A citokróm P450 elnevezés a molekula spektrális tulajdonságaiból származik. Az endoplazmatikus retikulum preparátumot (mikroszóma frakció), vagy mitokondrium belső falából származó készítményt Na-ditionittal ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) redukálva, majd szénmonoxidot vezetve a szuszpenzióba, a CO megkötése után egy 450 nm hullámhosszon abszorpciós maximumot mutató pigment (P450) keletkezik.

A citokróm P450-ek aminosav szekvenciájuk hasonlósága alapján különböző gén-családokba sorolhatók (izoenzimek). Jelenleg az ismert izoenzimek száma 150 körül van.

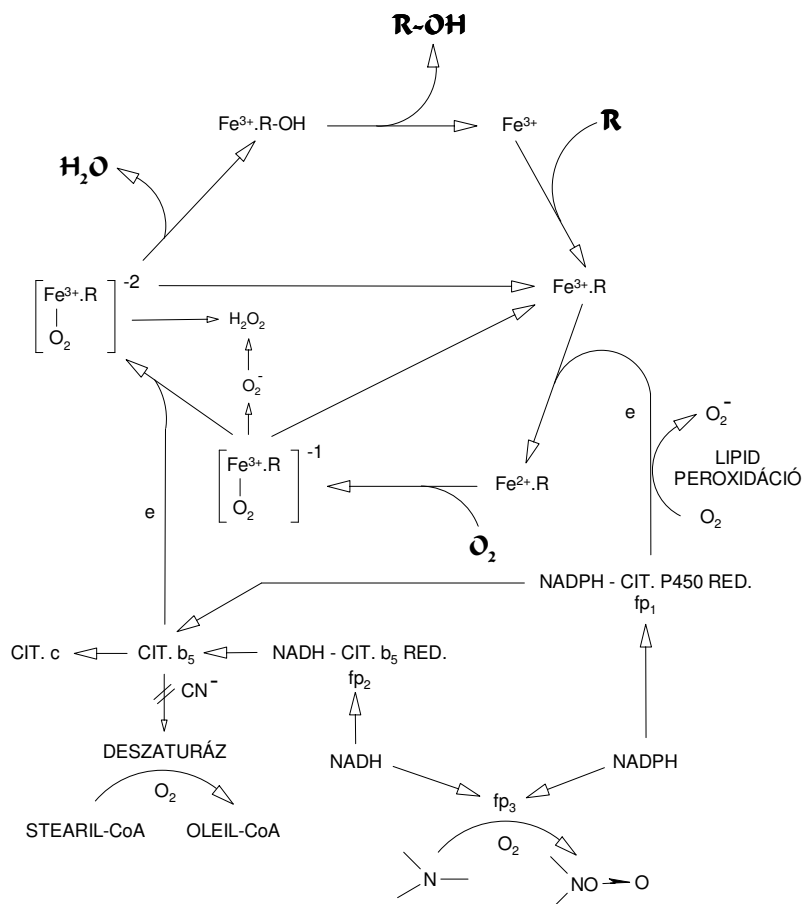
A citokróm P450 katalizált reakció általános alakja:



A molekuláris oxigén a levegőből származik. A reakció befejeztével az egyik oxigén atom az átalakított szubsztrát hidroxilcsoportjában, a másik oxigén atom a keletkező vízben található. A reakciót **monooxigenáz reakciónak**, a citokróm P450 izoenzimeket **monooxigenázoknak** is nevezik.

A citokróm P450 fehérjében hem protoporfirin IX prosztetikus csoport van. A hem – protein szubsztrátkötő és molekuláris oxigénköti helyet rendelkezik. A vas atom a porfirin-gyűrű négy pirrol nitrogénjéhez kötődik. A két axiális ligand közül az egyikhez a fehérjelánc egyik cisztein szulfhidril csoportja kapcsolódik. A szubsztrát az oxidált vasat tartalmazó (Fe^{3+}) enzimhez kapcsolódik. A reakciók során a vas a Fe^{3+} és Fe^{2+} állapot között változik.

Az egész folyamatot a következő egyenletek írják le:



A citokróm P450 monooxygenáz egyes reakciólépéseinek folyamatábrája

A monooxygenálás egyes lépései

1. a szubsztrát megkötése
2. egy elektron felvétele a *NADPH – citokróm P450 reduktáz* segítségével. A háromértékű vas kétértékűvé alakul
3. a molekuláris oxigén megkötése
4. elektron áthelyeződése
5. második elektron felvétele a citokróm b_5 segítségével (a citokróm b_5 -öt a *NADH – citokróm b_5 reduktáz* redukálja)
6. hidroxilált szubsztrát és víz képződése, citokróm P450 (Fe^{3+}) visszanyerése

A citokróm P450 rendszert elektronokkal (redukált ekvivalensekkel) a *NADPH – citokróm P450 reduktáz* és a *NADH – citokróm b_5 reduktáz* enzimek látják el. A *NADPH – citokróm P450 reduktáz* és a *NADH – citokróm b_5 reduktáz* flavoproteinek (FAD, ill. FMN). Az egyelektronos elektronátvitel e kofermentek (prosztetikus csoportok) segítségével valósul meg.

A monooxygenáz reakcióban a szubsztráton első lépésben hidroxilcsoport alakul ki. A hidroxilcsoport különböző atomcsoportokon is kialakulhat, ami által ezek instabilissá válnak és kémiai, nem enzimkatalizált, reakcióban továbbalakulnak. A funkciós csoportok leválnak, ezzel a molekula stabilizálódik. Így végeredményben az átalakított molekulán hidroxilcsoport nem található, de így nyílik lehetőség pl. demetilálásra (formaldehid a melléktermék), deetilálásra (acetaldehid a melléktermék), általában dealkilálásra, vagy dehalogénezésre (HCl , HBr melléktermékkel), stb.

A gyakorlaton az enzimaktivitás mérésénél szubsztrátként anilint használunk. Az oxigenálás során az aminocsoporthoz képest para helyzetben OH-csoport alakul ki, 4-aminofenol képződik. Lúgos közegben a 4-aminofenol a reakcióelegybe bevitt fenollal kék színű terméké oxidálódik.

A monooxygenáz reakcióhoz NADPH szolgáltatja a redukált ekvivalenseket. A NADPH-t magas ára miatt a lehető legkisebb koncentrációban alkalmazzuk, ugyanakkor gondoskodunk regenerálásáról. A regenerálást a glükóz-6-foszfát – glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz NADPH generáló rendszerrel biztosítjuk.

Anyagok, eszközök

Szubsztrát oldat (62.5 mmol/l HEPES puffer, KCl 187.5 mmol/l, anilin.HCl 6.2 mmol/l, albumin 0.025 %, glükóz-6-P.Na 6.25 mmol/l, dithiothreitol 0.125 mmol/l, G-6-P-dehidrogenáz 1.25 U/ml)

Triklórecetsav oldat (15.0 %)

Mikroszóma frakció. Két, 150-200 g-os, éjszakán át éheztetett, patkány máját, a máj súlyának megfelelően 10-szeres térfogatú, jéghideg, 0.15 mol/l KCl-oldatban Elvehjem-Potter üveg – teflon homogenizátorral homogenizáljuk (10-12 g májat, 100-120 ml pufferben). A homogenizátumot 20 percig 9000 g-vel, 4 °C -on centrifugáljuk. A szupernatánst szintén 4 °C -on, 100 000 g-vel 45 percig centrifugáljuk. Az üledéket a máj súlyával megegyező térfogatú 0.15 mol/l KCl-oldatban a homogenizátorral szuszpendáljuk. A szuszpenzióban fehérjét határozunk meg. A preparátum fehérje koncentrációja ilyenkor kb. 15-20 mg/ml. A mikroszóma szuszpenziót a felhasználásig lefagyasztva tároljuk (-70 °C).

NADPH.Na₄-oldat (10.0 mmol/l, 1 %-os NaHCO₃ oldatban)

Nátriumkarbonát oldat (10.0 %)

Lúgos fenol oldat (2.0 %)

Standard oldat (4-Aminofenol.HCl, 0.5 mmol/l)

37 °C -os vízfürdő

Centrifuga, centrifugacsövek, kémcsövek

Pipetták

Fotométer, szűkített küvetták

Mérés

Műanyag centrifugacsöbe mérni	PRÓBA Ml	VAK ml
SZUBSZTRÁT OLDAT	0.80	0.80
TCA oldat	—	0.25
Mikroszóma szuszpenzió	0.10	0.10
NADPH.Na ₄ oldat	0.10	0.10
Inkubálás gyakori rázogatóssal 37°C-on, 30 percig		
TCA oldat	0.25	—
Centrifugálás kb. 2000 g-vel, 10 percig		
TCA felülúszóból új kémcsöbe	0.75	0.75
Nátriumkarbonát oldat	0.25	0.25
Lúgos fenol oldat	0.75	0.75
Szobahőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk az oldatot, majd mérjük az oldat abszorbanciáját 620 nm-en		
A(620)		

Standard egyenes készítése

Üvegekémcsöbe mérni	1.	2.	3.	4.	Vak
---------------------	----	----	----	----	-----

Deszillált víz (ml)	0.95	0.90	0.85	0.80	1.00
4-Aminofenol oldat (ml)	0.05	0.10	0.15	0.20	—
TCA oldat (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Az elegyből új kémcsőbe kimérni (ml)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Nátriumkarbonát oldat (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Lúgos fenol oldat (ml)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Szobahőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk az oldatot, majd mérjük az oldat abszorbanciáját 620 nm-en					
A(620)					

Számítások, feladatok, kérdések

Adatok a számításokhoz	1.	2.	3.	4.	Vak
Bemért 4-Aminofenol (μmol)	0.025	0.050	0.075	0.100	0.000
Koncentráció a fotometrálnál ($\mu\text{mol/l}$)	8.57	17.14	25.71	34.29	0.00

A standard egyenesből számítsuk ki a 4-aminofenol moláris abszorpciós koefficiensét (Ms.: 145.6).

A standard bemérések segítségével, a mikroszóma frakció fehérjetartalmának ismeretében, számítsuk ki a mikroszóma minta fajlagos enzimaktivitását (mU / mg protein). A mikroszóma szuszpenzió fehérjetartalma: 17.5 mg / ml.

Magyarázza meg a szubsztrát-oldatban levő anyagok szerepét az enzimreakcióban: HEPES puffer, albumin, KCl, G-6-P.Na, G-6-P-dehidrogenáz, ditiotritol, anilin.

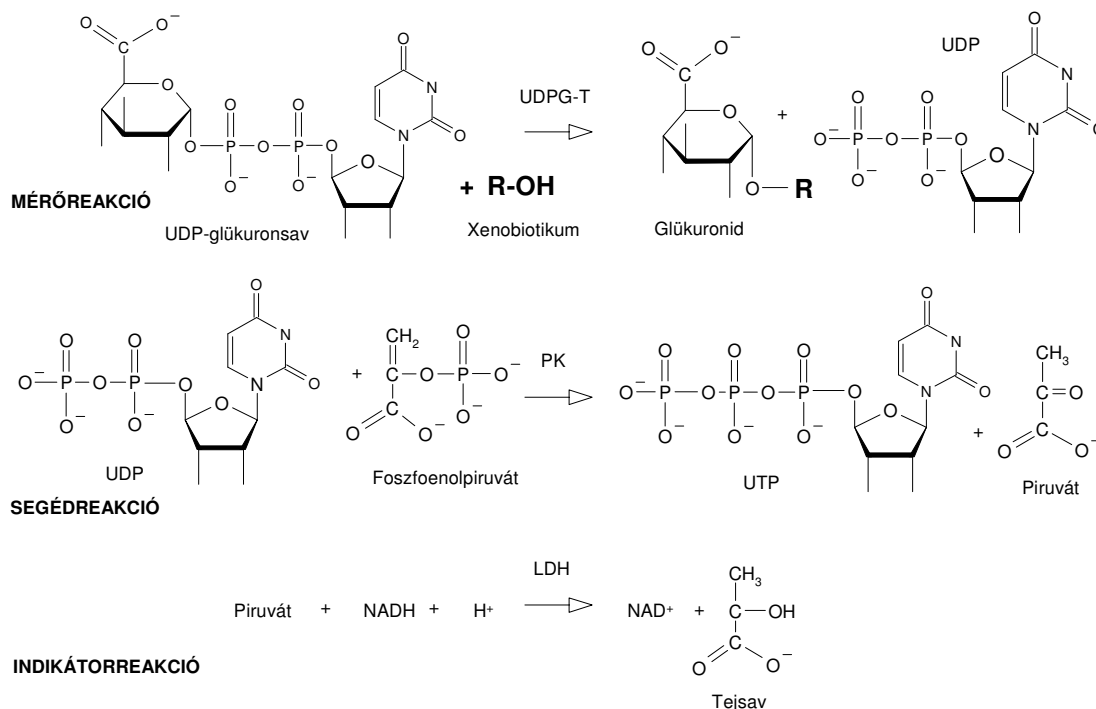
2. UDP-glükuronil transzferáz aktivitásának mérése

Összetett kinetikus UV teszt

Bevezetés

UDP-glükuronil-transzferáz (EC 2.4.1.17)

UDP-glükuronát + akceptor = UDP + akceptor-β-D-glükuronid



A méregtelenítési reakciót az első sor írja le. Az UDP-glükuronsav (“aktív glükuronsav”) szolgáltatja a glükozidos kötést a xenobiotikumhoz kapcsolódó hidrofíl molekularészt, a glükuronsavat. A reakciót az UDP-glükuronil transzferáz (UDPG-T) katalizálja. Esetünkben ez a mérőreakció. A második egyenletsorban a segédreakció, a harmadik sorban a meghatározást lehetővé tevő indikátorreakció található. Az első lépésben keletkezett UDP-t egy segédreakcióval, a piruvát kináz (PK) és foszfoenolpiruvát segítségével UTP-vé alakítjuk, majd a foszfoenolpiruvátból keletkező piruvátot az indikátorreakcióban laktátdehidrogenáz (LDH) és NADH-val tejsavvá és NAD-dá alakítjuk. A 340 vagy 365 nm-nél mérhető abszorbanciacsökkenés a NADH oxidációját jelzi.

A biotranszformáció (méregtelenítési funkció) második fázisában legnagyobb jelentősége a glükuronil-transzferáznak van. A glükuronil-transzferáz az UDP-glükuronsavból glükuronsavat visz át a biotranszformáció első fázisában előkészített xenobiotikumra. Glükozidos kötés jön létre. Az így kialakuló molekula a glükuronsav hidroxilcsoportjai és a disszociálisan karboxilcsoportja révén jelentős mértékben vízoldékonyvá válik. A konjugátum pK_a értéke 4-nél kisebb, ezért fiziológiai körülmények között a molekula teljesen disszociált állapotban van. A vesén át történő kiválasztásnál, ellentétben a lipofil anyagokkal, a glomeruláris filtráció után már nem szívódik vissza.

Esetenként a méregtelenítésben résztvevő molekulán több hidroxilcsoport is glükuronidálható. A képződő termék molekulatömege ilyenkor meghaladja a 400-500 Dalton értéket. Ilyen nagy molekulát a vese már nem képes kiválasztani és a méregtelenített xenobiotikum az epefolyadékkal ürül. A glükuronidált metabolit egy részéről a bélben található glükuronidáz a glükuronsavat hidrolitikusan lehasítja. Az így lipofilebbé vált metabolit újra felszívódik, majd glükuronidálódik és az epével ismét kiválasztásra kerül. Ezt nevezik a méregtelenítés folyamatában a metabolitok enterohepatikus körforgásának.

Az enzim főleg a májban (endoplazmatikus reticulum), a citokróm P-450 közvetlen közelében fordul elő, így a biotranszformáció két fázisa könnyen összekapcsolódhat. Az enzim szubsztrátspecifitása csekély, szubsztrátjai között fenolok, alkoholok, aminok és zsírsavak szerepelnek.

A glükuronidálás mellett a méregtelenítésben szerepe van még a szulfátképzésnek, metilezésnek, acetilálásnak vagy a glicinnel, taurinnal, glutaminnal, glutationnal való konjugálásnak.

Anyagok, eszközök

Mikroszóma frakció. Két, 150-200 g-os, éjszakán át éheztetett, patkány máját, a máj súlyának megfelelően 10-szeres térfogatú, jéghideg, 0.15 mol/l KCl-oldatban Elvehjem-Potter üveg – teflon homogenizátorral homogenizáljuk (10-12 g májat, 100-120 ml pufferben). A homogenizátumot 20 percig 9000 g-vel, 4 °C -on centrifugáljuk. A szupernatánst szintén 4 °C -on, 100 000 g-vel 45 percig centrifugáljuk. Az üledéket a máj súlyával megegyező térfogatú 0.15 mol/l KCl-oldatban a homogenizátorral szuszpendáljuk. A szuszpenzióban fehérjét határozzuk meg. A preparátum fehérje koncentrációja ilyenkor kb. 15-20 mg/ml. A mikroszóma szuszpenziót a felhasználásig lefagyasztva tároljuk (-70 °C).

Munkaoldat (125 mmol/l HEPES puffer, MgCl₂·6H₂O 8.25 mmol/l, Foszfoenolpiruvát.3CHA 0.35 mmol/l, UDP-glükuronsav.Na₃ 2.5 mmol/l, Piruvátkináz 8 U/ml, Laktátdehidrogenáz 1.0 U/ml)

Szubsztrát-oldat (3-Metil-2-nitrofenol 3.0 mmol/l)

NADH-oldat (1.5 mmol/l, 1 %-os NaHCO₃ oldatban)

TRITON X-100 oldat (0.5 %)

Pipetták, kémcsövek

Fotométer, szűkített küvetták

Mérés

Mikroszóma szuszpenzió előkészítése méréshez

A glükuronil-transzferáz enzim a mikroszóma lipidrétegeibe van ágyazva. A lipid kettősréteg megbontására a szuszpenzióhoz nem-ionos detergenst (TRITON X-100) adunk.

A gyakorlat megkezdése előtt a jól szuszpendált mikroszóma preparátum 0.5 ml-éhez 0.4 ml HEPES puffert és 0.1 ml 0.5 %-os TRITON X-100 oldatot adunk. Az elegyet 5 percig 37 °C -on inkubáljuk, majd 125.0 mmol/l, pH 7.2 HEPES-pufferrel 5 ml-re hígítjuk. A meghatározáshoz a TRITON X-100-zal aktivált, hígított mintából mérünk be. A reakcióelegybe kb. 150-200 µg mikroszóma-fehérje kerül.

Közvetlenül szűkített küvettába mérni	PRÓBA ml
MUNKAOLDAT	0.6
Szubsztrát oldat	0.1
a fotométer nullázása 365 nm-en	
NADH oldat	0.2
Mikroszóma szuszpenzió	0.1
mérés 365 nm-en, percenként leolvasással	

Az aktivitásmérést szobahőmérsékleten végezzük. Az oldatokat az adott sorrendben mérjük a szűkített küvettába. A szubsztrát oldat bemérése után a fotométert nullázzuk. A NADH-oldat hozzáadása után a reakciót a detergenssel kezelt mikroszóma szuszpenzió hozzáadásával indítjuk. Azonnal, majd percenként, 5 percig, mérjük az oldat abszorbanciáját 365 nm-en.

Számítás

A percenként mért értékek átlagával ($\Delta A_{365}/\text{min}$) számoljuk a mikroszóma preparátum fajlagos aktivitását.

$$\frac{V \times 10^6 \times h}{\epsilon \times d \times v} \times \frac{(\Delta A_{365}/\text{min})}{\text{prot}} = \text{nmol/min/mg}$$

$$\frac{V \times 10^6 \times h}{\epsilon \times d \times v} \quad \text{-t kiemelve, értéke külön számolva: 30303-nak adódik.}$$

A vizsgált minta specifikus aktivitása (nmol/min/mg) = 30303 × (ΔA₃₆₅/min) / prot

az egyenletekben:

V	a reakcióelegy összterfogata (1.0 ml)
10 ⁶	átszámítási faktor
ΔA/min	az 1 perc alatt mért abszorbancia változás
ε	a NADH moláris abszorpciós koefficiense (365 nm-nél 3300 mol ⁻¹ .ℓ.cm ⁻¹)
d	a fényút hossza a küvettában (1 cm)
v	a bemért vizsgálandó minta térfogata (0.1 ml)
prot	a mikroszómaminta fehérjetartalma (mg/ml)
h	a mikroszóma szuszpenzió hígítása (10 ×)

A fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó aromás vegyületek glükuronidálásának sebessége az OH-csoport disszociációjának is függvénye. A kísérletben használt 3-metil-2-nitrofenol a legtöbb szubsztituált fenol-származék közül a legkönnyebben glükuronidálható. A fenolos OH-csoport pK_a értéke 6.9, így fiziológias pH-nál a molekula kb. 75 %-ban disszociálva van.

Feladatok, kérdések

Számítsuk ki mikroszóma készítményünk fajlagos aktivitását (számoljunk 17.5 mg/ml proteintartalommal).

Milyen része a sejtnek a mikroszóma?

Milyen más, a biotranszformáció szempontjából lényeges enzimeket tartalmaznak a mikroszómák?

Mi az enzimaktivitás egysége?

Mi a térfogataktivitás, mi a fajlagos enzimaktivitás?

Mi a különbség a kinetikus és a végpontos aktivitásmérés között?

Mi a Warburg-féle optikai teszt lényege?

Ismertessen néhány összetett Warburg-féle optikai tesztet