

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium interakce Na^+/K^+ -ATPasy s cisplatinou

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Daniel Karas
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Termín odevzdání práce:	23.04.2012

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Daniel Karas

Děkuji školiteli, prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za odborné vedení, veškeré rady a za vždy vstřícný přístup. Mé poděkování patří také kolegům a pracovníkům Katedry biochemie UP za poskytnuté rady a příjemnou atmosféru. Dále bych chtěl také poděkovat pracovníkům Katedry biofyziky Univerzity Palackého, jmenovitě RNDr. Marice Havlíkové, Ph.D. a doc. RNDr. Martinu Kubalovi, Ph.D. za pomoc při izolaci proteinu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Daniel Karas
Název práce	Studium interakce Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy s cisplatinou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Cisplatina (<i>cis</i>-diaminodichloroplatina(II), CDDP), je antineoplastické léčivo používané při léčbě mnoha typů rakovin, zahrnující rakoviny hlavy, krku, plic, varlat, vaječníků a rakovinu prsu. Hlavním vedlejším efektem závislým na dávce u cisplatiny je nefrotoxicita. Cisplatina je schopna vázat se na DNA, ale také na různé proteiny. V experimentech byla sledována vazba cisplatiny nejprve na ubikvitin, cytochrom <i>c</i> a myoglobin a po zjištění interakcí s těmito proteiny byla studována podrobněji vazba cisplatiny k velké cytoplazmatické kličce Na⁺/K⁺-ATPasy. Na⁺/K⁺-ATPasa (E.C.3.6.1.37) je největší proteinový komplex P-typu ATPas zajišťující transport 3 Na⁺ iontů ven a 2 K⁺ iontů dovnitř buňky a je esenciální pro savčí buňky. Byla objevena dánským vědcem J.C. Skouem, který za tento objev v roce 1997 získal Nobelovu cenu. Při studiu vazby cisplatiny bylo použito rekombinantní cytoplazmatické kličky Na⁺/K⁺-ATPasy z myši <i>/mus musculus/</i> z toho důvodu, že se cisplatina díky snížené koncentraci Cl⁻ v cytoplazmě aktivuje. Tato klička je z cytoplazmatických segmentů Na⁺/K⁺-ATPasy nejprostornější a tudíž vazba cisplatiny k ní je nejpravděpodobnější. Během experimentů bylo ověřeno jedno vazebné místo cisplatiny k proteinu a to na cysteinu 367 (pozice pro celou sekvenci Na⁺/K⁺-ATPasy)</p>
Klíčová slova	Cisplatina, Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa, cystein, MALDI-TOF MS
Počet stran	93
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Daniel Karas
Title	Studies of the Na ⁺ /K ⁺ -ATPase interactions with cisplatin
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2012
Abstract	<p>Cisplatin (<i>cis</i>-diamminedichloroplatinum(II), CDDP) is an antineoplastic drug used in the treatment of many solid-organs cancers, including those of the head, neck, lung, testis, ovary, and breast. The main dose-limiting side effect of cisplatin is nephrotoxicity. Cisplatin is capable binds to DNA and variety of proteins. In experimental section was monitored a binding site of cisplatin to ubiquitin, cytochrome <i>c</i> and myoglobine and after finding of interactions with this proteins was in more detail studied how cisplatin binds to large cytoplasmic loop of Na⁺/K⁺-ATPase. Na⁺/K⁺-ATPase (E.C.3.6.1.37) is the biggest protein complex of P-type of APTases handling transport of 3 Na⁺ ions out and 2 K⁺ ions inside the cell and is essential for mammalian cells. Na⁺/K⁺-ATPase was discovered by danish scientist J.C.Skou, who obtained for this discovery the Nobel prize in 1997. During study of cisplatin binding was used recombinant cytoplasmic loop of murine <i>/mus musculus/</i> Na⁺/K⁺-ATPase, because is cisplatin in cytoplasm activated though decrease of Cl⁻ ions. This loop is the largest of cytoplasmic segments of Na⁺/K⁺-ATPase and the binding of cisplatin to her is likeliest. During experiments was verified one binding site of cisplatin to protein in cysteine 367 (position for whole Na⁺/K⁺-ATPase)</p>
Keywords	Cisplatin, Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, cysteine, MALDI-TOF MS
Number of pages	93
Number of appendices	0
Language	Czech

1	Cíle práce	- 8 -
2	Teoretická část.....	- 9 -
2.1	Úvod	- 9 -
2.1.1	Membrány	- 9 -
2.1.2	Kanály	- 10 -
2.1.3	Přenašeče.....	- 11 -
2.2	ATPsynthasa.....	- 12 -
2.2.1	Obecné vlastnosti ATPsynthasy	- 12 -
2.2.2	Struktura F ₁ -ATPasy – rentgenostrukturní analýza a související strukturální próby -	13 -
2.2.3	P-typ ATPasové superrodiny	- 14 -
2.3	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa.....	- 15 -
2.3.1	Obecné vlastnosti Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy.....	- 15 -
2.3.2	Strukturální rysy Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy	- 17 -
2.3.3	Aktivní transport a hydrolýza ATP	- 23 -
2.3.4	Velký cytoplazmatický segment C45.....	- 24 -
2.3.5	Fyzilogická role Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy	- 25 -
2.4	Cisplatina	- 27 -
2.4.1	Obecné informace o cisplatině	- 27 -
2.4.2	Klinická charakteristika nefrotoxicity cisplatiny	- 28 -
2.4.3	Mechanismus nefrotoxicity cisplatiny	- 29 -
2.4.4	Cisplatina a zkoumání její interakce	- 33 -
2.4.5	Reakce platinových komplexů s ubikvitinem	- 35 -
3	Experimentální část.....	- 37 -
3.1	Materiál a metody.....	- 37 -
3.2	Metody.....	- 42 -
3.2.1	Složení kultivačního LB média	- 42 -
3.2.2	Kultivační podmínky a exprese rekombinantní C45 kličky	- 42 -
3.2.3	Purifikace rekombinantní C45 kličky	- 42 -
3.2.4	Stanovení koncentrace rekombinantní C45 kličky.....	- 43 -
3.2.5	SDS – PAGE vyzolovaného proteinu	- 44 -
3.2.6	SDS – PAGE ostatních vzorků.....	- 45 -
3.2.7	Štěpení proteinu v gelu.....	- 47 -
3.2.8	Extrakce peptidů z gelových kousků.....	- 48 -
3.2.9	Metoda zip/tip	- 48 -
3.2.10	MALDI-TOF MS – peptidové mapování	- 49 -
3.2.11	MALDI-TOF MS – měření intaktní hmoty	- 50 -

3.2.12	Stanovení –SH skupin v proteinu	- 51 -
4	Výsledky	- 53 -
4.1	Kontrola čistoty připraveného proteinu SDS-PAGE	- 53 -
4.1.1	Vyřezání a zpracování gelových pásů	- 53 -
4.1.2	Výsledky stanovení nečistot v elucích 1, 2 a 3 po dialýze	- 54 -
4.2	Ubikvitin, myoglobin a cytochrom <i>c</i>	- 55 -
4.2.1	Výsledky interakce ubikvitinu s cisplatinou	- 55 -
4.2.2	Výsledky interakce myoglobinu a cytochromu <i>c</i> s cisplatinou	- 59 -
4.3	Cytoplazmatická klička	- 61 -
4.3.1	Stanovení intaktní hmoty	- 62 -
4.3.2	Peptidy po reakci s cisplatinou	- 63 -
4.3.3	Stanovení sulfhydrylových skupin u C45 kličky	- 66 -
4.3.4	ATPasa po reakci s NEM	- 68 -
5	Diskuze	- 70 -
6	Závěr	- 74 -
7	Seznam použité literatury	- 75 -
8	Seznam použitých zkratk	- 92 -

1 Cíle práce

- Seznámení se s fungováním Na^+/K^+ -ATPasy a její role v metabolismu
- Seznámení se s terapeutickými účinky cisplatiny
- Sledování interakce cisplatiny se Na^+/K^+ -ATPasou metodami hmotnostní spektrometrie

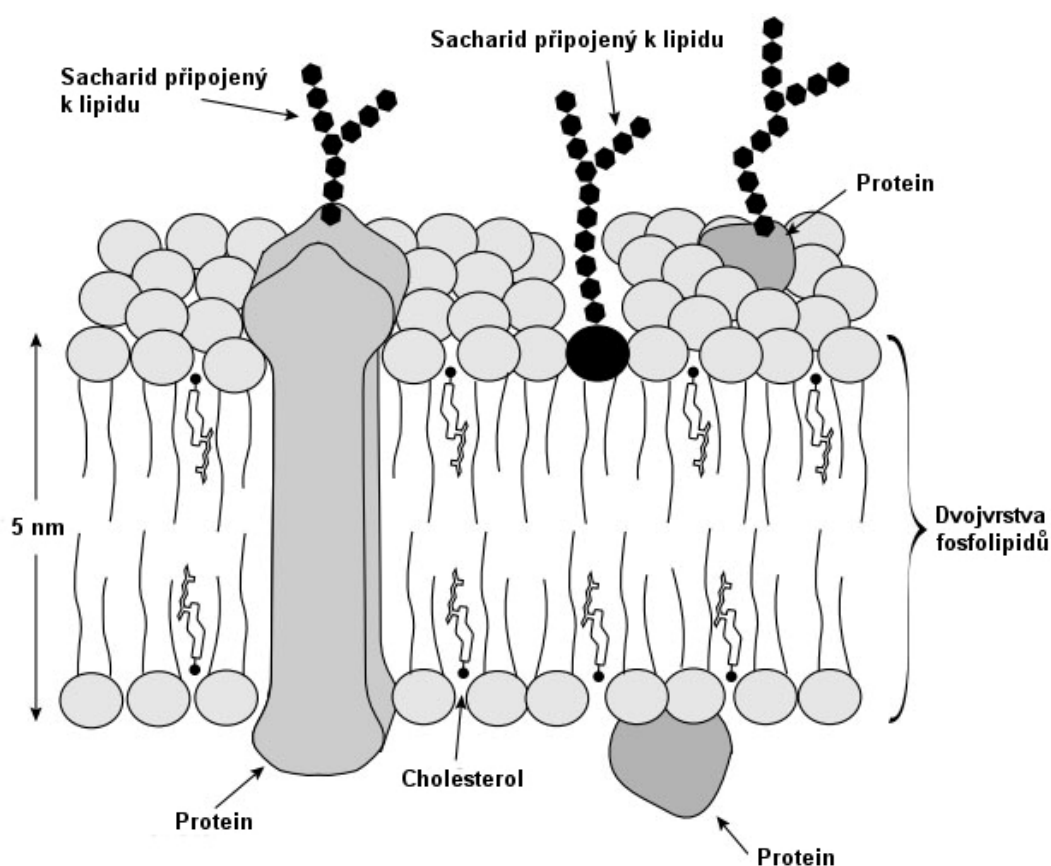
2 Teoretická část

2.1 Úvod

Pro funkci živých organismů je velmi důležitá přítomnost biologických membrán. V podobě buňčné membrány ohraničují tyto membrány buňku a oddělují tak vnitřní prostor buňky od vnějšího prostředí. Membrány také ohraničují vnitřní orgány buňky, jsou selektivně permeabilní a kontrolují díky tomu pohyb látek mezi vnějším a vnitřním prostředím. Řídí tok informací mezi buňkami reorganizací signálních molekul přijatých od dalších buněk, nebo používají mechanismus posílání chemických či elektrických signálů směrem k ostatním buňkám. Membrány také hrají roli v zachytávání a uvolňování energie – na membráně se odehrává fotosyntéza a oxidativní fosforylace (Brown, 1996).

2.1.1 Membrány

Membrány se skládají ze tří hlavních součástí: lipidů, proteinů a sacharidů a všechny mají obecně podobnou strukturu (Obr.1) (Brown, 1996).



Obrázek 1 – Obecný vzhled biologické membrány (Brown, 1996; upraveno).

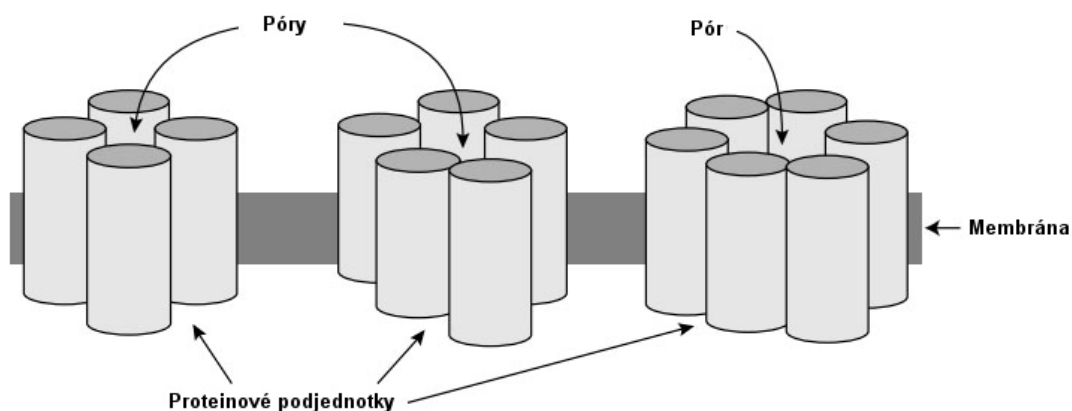
Mnoho specifických funkcí membrán je uskutečňováno prostřednictvím proteinů. Množství a typ proteinů u membrán se může značně lišit (Brown, 1996).

Syntéza membránových proteinů začíná na ribozomech v cytosolu, ovšem první část proteinu při syntéze (N-konec) obsahuje signál, který nasměruje ribozom k endoplazmatickému retikulu (ER). Tento signál je tvořen sekvencí 15-20 aminokyselin, z nichž zhruba polovina bývá hydrofobních. Tento signál je rozpoznáván pomocí tzv. „signal recognition particle (SRP)“, což je komplex proteinu s RNA nesoucí rostoucí proteinový řetězec, připojuje ribozom k endoplazmatickému retikulu a váže jej k SRP receptoru v membráně endoplazmatického retikula. SRP je uvolněna a růst proteinového řetězce je řízen do „protein-conducting“ kanálu, který prostupuje membránu endoplazmatického retikula tak, že jakmile je protein nasyntetizován, vstupuje do lumen ER (Brown, 1996).

Pro některé látky, jako jsou ionty, sacharidy nebo aminokyseliny je důležitá přítomnost tzv. transportních proteinů, jelikož nemohou procházet membránou prostou difúzí. Takovéto integrované membránové proteiny zajišťují tzv. zprostředkovaný transport a dělí se na dva základních typy - kanály a přenašeče (Brown, 1996).

2.1.2 Kanály

Kanály tvoří napříč fosfolipidovou vrstvou vodou vyplněné póry, skrze které se v řadě za sebou pohybují anorganické ionty. Ionty proudí po jejich elektrochemickém gradientu a rychlost průchodu těmito póry je asi 10^8 iontů za sekundu. Kanály jsou obecně tvořeny ze čtyř, pěti nebo šesti proteinových podjednotek uspořádaných do podoby póru (Obr.2) (Brown, 1996).



Obrázek 2 – Diagram znázorňující membránové kanály (Brown, 1996; upraveno).

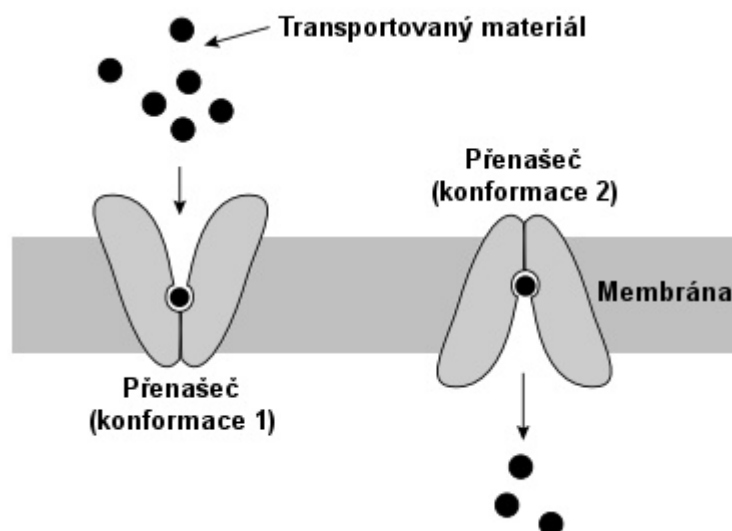
Postranní řetězce aminokyselin, které lemují pór určují jeho selektivitu: póry, které propouští kladně nabitě ionty jsou lemovány záporně nabitými postranními řetězci aminokyselin, zatímco póry propouštějící ionty nabitě záporně jsou naopak lemovány postranními řetězci nabitými kladně. Velikost propouštěného iontu je určena průměrem nejužší části póru – například sodný

kanál má průměr 0.5 nm (5 Å), takže ionty s průměrem nad 0.5 nm nepropustí. Rozpuštěné ionty jsou obklopeny hydratačním obalem, který musí být před vstupem iontu do kanálu odstraněn (Brown, 1996).

Tvar proteinových podjednotek, a tudíž, zda je kanál otevřeném či zavřen je ovlivněn vazbou signálních molekul k podjednotkám, nebo dokonce změnou membránového potenciálu. Existují různé typy kanálů, jako příklad lze uvést vrátkové kánaly řízené mechanicky (pokud jsou otvírány vazbou signální molekuly), nebo vrátkové kanály řízené napětím (pokud jsou otvírány změnami membránového potenciálu) (Brown, 1996).

2.1.3 Přenašeče

Přenašeče neboli transportérové proteiny váží specifické molekuly nebo ionty a přenáší je přes membránu. Každý přenašeč obvykle váže jeden typ molekuly (např. cukry, aminokyseliny, ionty) a často pouze jednu specifickou molekulu z těchto tříd (např. glukosový přenašeč transportuje glukosu, nikoliv však ostatní sacharidy). Vazba látky, která má být transportována způsobí změnu tvaru přenašeče, tudíž je vázaná látka nejdříve vystavena na jedné straně membrány a poté na druhé. Kromě toho, afinita vazebné strany pro vázanou látku postupně klesá, takže transportovaná molekula může být uvolněna na opačné straně membrány (Obr.3) (Brown, 1996).

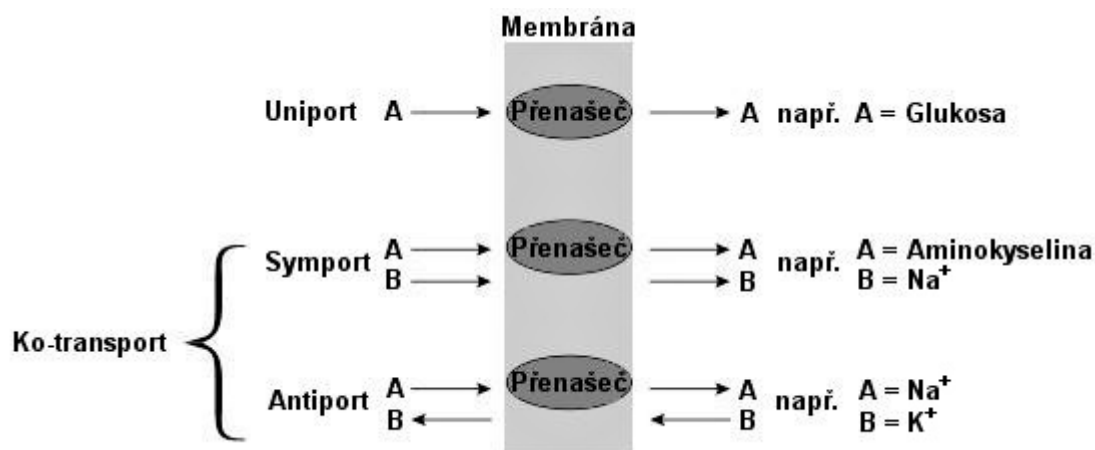


Obrázek 3 – Přenašeče mění jejich konformaci (tvar) během transportu látky přes membránu (Brown, 1996; upraveno).

Maximální rychlost transportu pomocí přenašeče je okolo 10^4 molekul za sekundu: jsou tudíž mnohem pomalejší než kanály (Brown, 1996).

Některé přenašeče transportují pouze jednu rozpuštěnou látku skrze membránu – tzv. uniporty (např. glukosový transportér v membráně červených krvinek). Ostatní transportují dva

soluty najednou a jsou nazývány ko-transportéry. Pokud jsou oba soluty transportovány jedním směrem, nazýváme je symporty; pokud směrem opačným, jedná se o antiporty. Příkladem symportu je ko-transport aminokyselin a Na^+ do buněk. Příkladem antiportu je například Na^+/K^+ -ATPasová pumpa, která současně pumpuje ven z buňky Na^+ a dovnitř buňky K^+ ionty (Obr.4) (Brown, 1996).



Obrázek 4 – Typy přenašeči zprostředkovaného transportu (Brown, 1996; upraveno).

2.2 ATPsynthasa

2.2.1 Obecné vlastnosti ATPsynthasy

Všechny enzymy jsou obdivuhodné, ovšem ATPsynthasa je jedním z nejobdivuhodnějších, stejně jako jedním z nejneobvyklejších a nejdůležitějších. Její krása a význam se odráží ve trojrozměrné struktuře F_1 -ATPasové součásti, největší doposud rozluštěné asymetrické struktuře. Je neobvyklá z pohledu její strukturní spletnosti a reakčního mechanismu (Boyer, 1997).

Pod elektronovým mikroskopem můžeme pozorovat k membráně vázanou část připojenou relativně úzkou přibližně 4.5 nm (45 Å) stopkou ke kulovité části o průměru 9-10 nm (90-100 Å). Pokud je enzym vystaven médiu o nízké iontové síle, oddělí se část F_0 vázaná k membráně a zajišťující translokaci protonů a rozpustná část F_1 , která katalyzuje hydrolyzu ATP. F_1 -ATPasa je složena z pěti podjednotek, označených podle klesající velikosti a počtu podjednotek jako α_3 , β_3 , γ , δ a ϵ pro enzym z *Escherichia coli* s molekulovými hmotnostmi okolo 55, 50, 31, 19 a 14 kDa, v tomto pořadí. Nejjednodušší F_0 podjednotku nalezneme u enzymu z *E. coli*, oligomerizační stechiometrií určenou jako a , b_2 a c_{9-12} , s molekulovými hmotnostmi okolo 30, 17 a 8 kDa, v tomto pořadí. Oblast stopky je složena z podjednotek F_1 i F_0 . Část F_1 u vyšších organismů je podstatně komplikovanější. Všeobecně má enzym mnohonásobné kopie podjednotky jako malé c-podjednotky u části F_0 z *E. coli* a translokace

protonu tímto hydrofobním proteinem je blokována velmi snadnou reakcí intramembránové karboxylové skupiny s dicyklokarbodiimidem (DCCD) (Boyer, 1997).

ATP syntasa podobné struktury se nalézá u všech organismů a tvoří nebo štěpí ATP, což je spojeno s translokací protonů. Je známa aminokyselinová sekvence podjednotek z široké škály „zdrojů“. Podjednotky mají značnou homologii – okolo jedné pětiny identických aminokyselinových zbytků. Podjednotka β z různých zdrojů ukazuje výjimečně silnou sekvenci homologii. Minoritní podjednotky F_1 -ATPasy vykazují více variací co do sekvence i velikosti α - a β -podjednotek (Boyer, 1997).

Isolované α - a β -podjednotky mají jedno relativně nápadné vazebné místo pro nukleotidy, ale žádné nekatalyzuje důležitou hydrolýzu. Hydrolýza ATP může být katalyzována kombinací α - a β -podjednotek, ovšem syntéza ATP u enzymu z *E. coli* vyžaduje všechny F_1 a F_0 podjednotky (Boyer, 1997).

F_1 -ATPasa, jako izolovaná, často váže ATP nebo ADP do dvou až tří nekatalytických míst a váže ADP do jednoho katalytického místa. U F_1 -ATPasy je šest potenciálních nukleotidových vazebných míst: tři místa nekatalytická, primárně na α -podjednotce a tři katalytická místa primárně na β -podjednotce. Nukleotidy vázané v nekatalytických místech jsou nahrazovány pomalu různými rychlostmi během katalýzy (Boyer, 1997).

2.2.2 Struktura F_1 -ATPasy – rentgenostrukturní analýza a související strukturální próby

Pokrokem překvapujícího významu je dosažení struktury F_1 -ATPasy z mitochondrií hovězích srdečních buněk, poprvé v rozlišení 6.5 Å (Abrahams et al., 1993), poté v rozlišení 2.8 Å (Abrahams et al., 1994). Tento úspěch reprezentuje vrchol mnoha let úsilí a chvályhodné metodiky (Boyer, 1997).

Hlavní část MF_1 (MF_1 odkazuje na F_1 -ATPasu z mitochondrií) je zploštělá koule se střídajícími se α - a β -podjednotkami sahajícími od shora do spodní části koule jako dílky pomeranče. Asymetrie α - a β -podjednotek je naprosto zřejmá a potvrzující důkaz asymetrie z dřívějších objevů pomocí elektronové mikroskopie, studií katalýzy a chemické derivatizace. Krystalizace byla provedena v přítomnosti Mg^{2+} iontů, 5 μ M ADP a 250 μ M AMP-PNP. Jedno katalytické místo je obsazeno molekulou ADP, další AMP-PNP a třetí místo je prázdné. Všechna tři nekatalytická místa váží AMP-PNP. Pod centrální jamkou („central dimple“) o rozměru okolo 15 Å je jádro naplněno helixy utvořenými z C-terminálních a N-terminálních částí γ -podjednotky. Další části γ -podjednotky a podjednotek δ a ϵ nejsou dostatečně seřazeny v krystalech pro strukturální popis (Boyer, 1997).

Rysy asymetrie vyvstávají hlavně z doménových posunů. S výjimkou domény vázající nukleotidy prázdného katalytického místa, domény všech α - a β -podjednotek superponují

s efektivními odchylkami menšími než 1 Å mezi C_{α} atomy. Značná asymetrie v celkové struktuře vyvstává z rozdílů v relativních orientacích domén a v jejich interakcích s jedinečnou γ -podjednotkou. Hydrofobní obal s nízkým povrchovým potenciálem formovaný vnitřními povrchy α - a β -podjednotek obklopuje C-terminální část stočené γ -podjednotky. Interakce s γ -podjednotkou je zodpovědná za klíčové doménové posuny, která značně snižuje vazbu ATP na jedné straně (Bragg and Hou, 1990).

2.2.3 P-tyt ATPasové superrodiny

Všeobecně, Na^+/K^+ -ATPasa, rovněž nazývána sodnou pumpou, patří do skupiny ATPas přenášejících ionty. ATPasy přenášející ionty můžeme rozdělit obecně do třech různých rodin – V-, F- a P-tytu ATPas (Pedersen and Carafoli, 1987a in Janovská, 2010).

V-tyt (vakuolární typ) ATPas představuje multipodjednotkové elektrogenní protonové pumpy. Zahrnují u eukaryot úzce související rodinu, která pobývá v membránách organel kyselého charakteru. Jsou důležité pro receptorové recirkulační dráhy okyselením endocytotických vesikulů a podporováním oddělování vazby receptor-ligand (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010). V-tyt ATPas se také nachází v epitelu ledvin obratlovců, střevním epitelu motýlů a u hmyzích malpigických tubulů (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010).

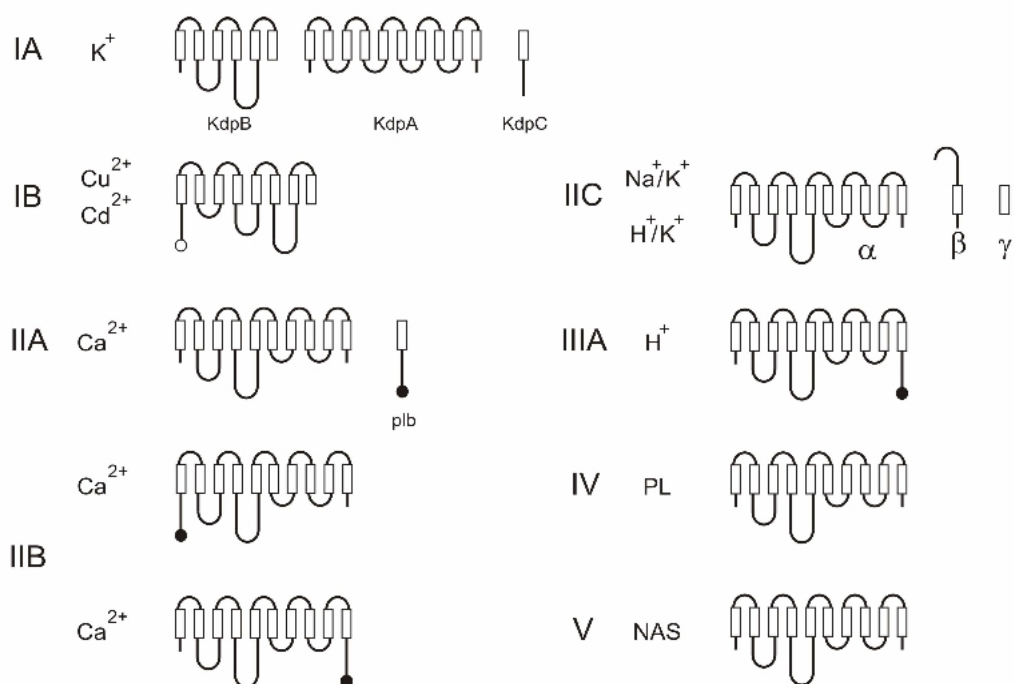
F-ATPasy se řadí mezi protonové ATPasy nacházející se ve vnitřní mitochondriální membráně, tylakoidní membráně chloroplastů a bakteriální plazmatické membráně (Pedersen and Carafoli, 1987b in Janovská, 2010). V mitochondriích a chloroplastech pod fyziologickými podmínkami pracují enzymy výhradně jako ATPsynthasy, řízené elektrochemickým H^+ gradientem. Bakteriální F-ATPasy také hydrolyzují ATP a vypuzují H^+ ionty z buňky (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010).

Transportní ATPasy P-tytu představují významnou rodinu homologních enzymů eukaryotického a prokaryotického původu umožňující aktivní pumpování kationtů skrze buněčné membrány. Genová rodina P-tytu ATPasových iontových pump je široce distribuována u hub, prvoků, rostlin a živočichů. ATPasy P-tytu (nebo také E_1E_2 -ATPasy) jsou takto nazývány, jelikož enzym pracuje skrze kovalentní, fosforylované intermediáty, tudíž utváření acyl fosfátových intermediátů je známkou členů P-tytu ATPasové rodiny. Motiv sedmi aminokyselin začínající aspartátem může být zapsán jako D-K-T-G-T-[LIVM]-[TIS] a vymezuje členství do P-tytu ATPasové rodiny (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010).

P-ATPasy pumpují nejrůznější nabitě substráty jako K^+ , Na^+ , H^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} ionty a fosfolipidy. Ve všech ATPasach P-tytu bylo identifikováno osm konzervovaných segmentů obsahujících celkem 265 aminokyselin (Palmgren and Axelsen, 1998b in Janovská, 2010).

Konzervované domény jsou umístěny v malé cytoplazmatické kličce mezi

transmembránovými segmenty 2 a 3 (4 a 5 u typu IB ATPas; Obr.5), čtvrtý transmembránový segment (6 u typu IB, a velká cytoplazmatická klička mezi transmembránovými segmenty 4 a 5 (6 a 7 u typu IB; Obr.5). Tyto části polypeptidu jsou pravděpodobně zahrnuty ve spojení mezi hydrolýzou ATP a konformačními změnami (doména transdukce energie – „the energy transduction domain“), ve vazby iontů a vazbě ATP, v tomto pořadí, což jsou rysy běžné mezi všemi ATPasami P-typu (Møller et al., 1996 in Janovská, 2010). U Na^+/K^+ - a H^+/K^+ -ATPas, čtvrtý transmembránový segment nadto obsahuje specifickou informaci pro cílení (Palmgren and Axelsen, 1998a in Janovská, 2010).



Obrázek 5 – Celkový pohled na P-ATPasovou superrodinu. Rodiny jsou pojmenovány římskými číslicemi vlevo, což je následováno popisem transportovaného iontu. Boxy označují transmembránové segmenty; vyplněná kolečka označují sekvence pro vazbu inhibitorů; otevřená kolečka místa pro vazbu těžkých kovů. Zkratky: PL - fosfolipidy; NAS – nepřipsaná specifita; plb – fosfolamban. Na každé struktuře je extracelulární prostor ukázán nahoře a oblast cytoplazmy dole (Janovská, 2010)

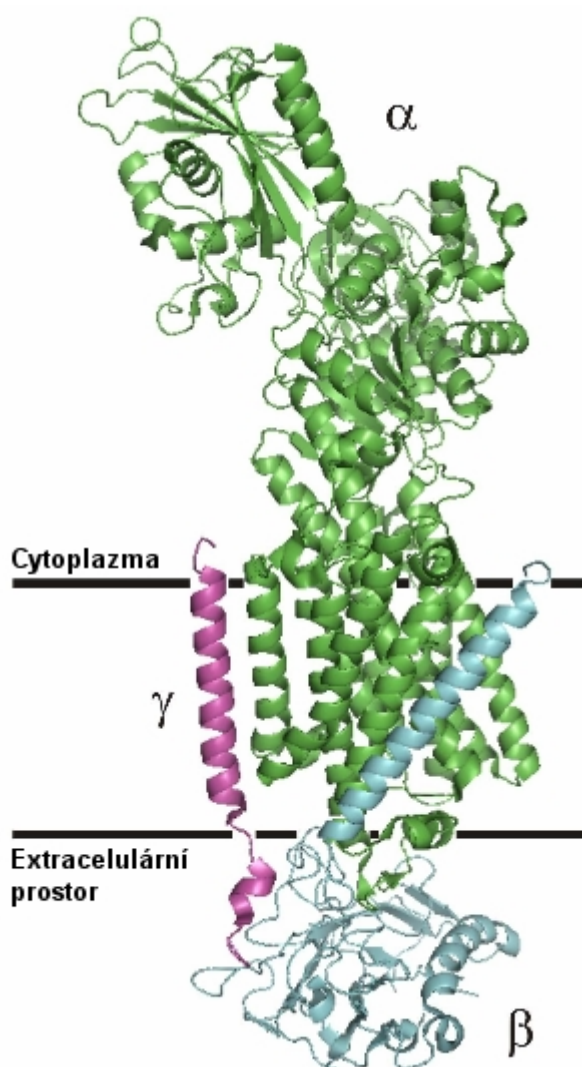
2.3 Na^+/K^+ -ATPasa

2.3.1 Obecné vlastnosti Na^+/K^+ -ATPasy

Na^+/K^+ -ATPasa je největší proteinový komplex v rodině pump P-typu. Na^+/K^+ -ATPasa nebo také sodná pumpa je protein odpovědný za aktivní transport neboli pumpování Na^+ a K^+ iontů přes plazmatickou membránu mnoha vyšších eukaryot. Přítomnost buněčných membrán s ATPasovou aktivitou, které byly stimulovány simultánní přítomností Na^+ a K^+ iontů a byly

specificky inhibovány srdečními glykosidy byla objevena před více než 40 lety a rozpoznána v roce 1997 Jensem C. Skouem, který za tento objev održel Nobelovu cenu (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010).

Na^+/K^+ -ATPasa (Obr.6) je esenciální pro všechny savčí buňky. V klidovém stavu buňky potřebuje 20-30 % produkce ATP k aktivnímu transportu Na^+ a K^+ iontů. Celková stechiometrie reakce odpovídá třem Na^+ iontům transportovaným ven z buňky a dvěma K^+ iontům transportovaným do buňky pro každou hydrolyzovanou molekulu ATP (Xu, 2005 in Janovská, 2010). Gradient, který je vytvářen Na^+ a K^+ ionty je vyžadován pro udržování membránového potenciálu, buněčného objemu a k sekundárnímu aktivnímu transportu dalších solutů, jako například transcelulární transportní procesy ve střevě, žlázách a ledvinách (Jørgensen et al. 2003 in Janovská, 2010).



Obrázek 6 – Složení Na^+/K^+ -ATPasy jako $\alpha\beta\gamma$ komplexu (PDB vstup 2ZXE). Podjednotky α -, β - a γ - jsou znázorněny zeleně, modře a fialově, v tomto pořadí. Helixy jsou znázorněny spirálami a β -řetězce pomocí šipek (Janovská 2010; upraveno)

Na⁺/K⁺-ATPasa a její blízký příbuzný, žaludeční H⁺/K⁺-ATPasa, jsou jedinými členy ATPasové rodiny P-typu složené z více než jedné podjednotky. Tyto dva zmíněné proteiny jsou heterodimery složené z α - a β -podjednotky se stechiometrií 1:1 (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010). Byly identifikovány čtyři α - a tři β -isoformy Na⁺/K⁺-ATPasové podjednotky, což ukazuje na tkáňově specifickou expresi a může se potencionálně tvořit 12 různých Na⁺/K⁺-isozymů s odlišnými transportními a farmakologickými vlastnostmi (Blanco a Mercer, 1998 in Janovská, 2010, Geering, 2006 in Janovská, 2010). Podjednotka α a β Na⁺/K⁺-ATPasy může být také koexprimována s malými iontovými transportními regulátory FXVD rodiny (Sweadner a Rael, 2000 in Janovská, 2010).

První krystalová struktura (získaná rentgenostrukturní analýzou) $\alpha\beta\gamma$ komplexu Na⁺/K⁺-ATPasy z prasečích ledvin (Obr.6), s vázanými K⁺/Rb⁺ párovými ionty, v rozlišení 3.5 Å byla prezentována Morthem et al. (2007). O dva roky později, Shinoda et al. (2009) publikoval krystalovou strukturu Na⁺/K⁺-ATPasy izolované z řitní žlázy žraloka v rozlišení 2.5 Å (Janovská, 2010).

2.3.2 Strukturní rysy Na⁺/K⁺-ATPasy

2.3.2.1 Aminokyselinová sekvence a transmembránová topologie

U α -podjednotky je ke kation-vázajícím místům umístěn také receptor pro srdeční glykosidy (Price & Lingrel, 1988 a Price et al., 1990). Méně významná je glykosylovaná β -podjednotka s molekulovou hmotností kolem 55 tisíc daltonů. U této podjednotky se po dlouhou dobu věřilo, že se přímo neúčastní katalytického cyklu nebo vazby srdečních glykosidů. V 90. letech bylo zjištěno, že uspořádání heterodimeru $\alpha\beta$ je nezbytně nutné pro stabilní a funkční konfiguraci pumpy; obzvláště je β -podjednotka potřebná pro odchod z α -podjednotky z endoplazmatického retikula a k dosažení správné konfigurace (Geering et al., 1989; Kawamura & Noguchi, 1991 a McDonough et al., 1990). Třetí podjednotka s molekulovou hmotností kolem 12 kDa byla objevena jako část nativního enzymového uspořádání (Collins & Leszyk, 1987 a Harris & Stahl, 1998). Nicméně, důležitost této takzvané γ -podjednotky pro ATPasovou nebo fosfatasovou aktivitu, ani pro transport iontů nebyla zatím demonstrována (Mercer et al., 1991). Všechny podjednotky byly klonovány a sekvencovány z různých tkání a zvířecích druhů (Horisberger et al., 1991; Jørgensen & Andersen, 1988; Lingrel et al., 1990 a Takeyasu et al., 1990).

V polovině 80. let molekulárně genetický přístup v kombinaci se sekvencováním proteolytických fragmentů Na⁺/K⁺-ATPasy umožnil objasnit kompletní sekvenci aminokyselin nejdůležitější α podjednotky nejprve pro ovčí ledvinu (Shull et al., 1985), elektrický orgán z rejnoka elektrického (*Torpedo californica*) (Kawakami et al., 1985) a prasečí ledvinu (Ovchinnikov et al., 1986). Na začátku 90. let byla známa struktura α -podjednotek pro různé bezobratlé i obratlovce, jako je například *Artemia* (kreveta) (Baxter-Lowe et al., 1989),

Drosophila (Lebovitz et al., 1989), *Xenopus laevis* (drápatka vodní) (Verrey et al., 1989), *Bufo marinus* (ropucha obrovská) (Jaisser et al., 1992), ryba *Castostomus commersoni* (Schönrock et al., 1991), kuře (Takeyasu et al., 1990), krysa (Herrera et al., 1987 a Shull et al., 1986), kůň (Kano et al., 1989) a člověk (Kawakami et al., 1986).

Šest až deset transmembránových segmentů peptidového řetězce bylo odvozeno z grafů hydropatie aminokyselin („hydropathy plots“) a navrženo pro model dvoudimenzionální transmembránové topologie Na⁺/K⁺-ATPasy (Jørgensen & Andersen, 1988; Kawakami et al., 1985; Modyanov et al., 1992; Ovchinnikov et al., 1988; Shull & Greeb, 1988; Shull et al., 1985 a Takeyasu et al., 1990). Transmembránové domény tvořící 40 – 50% celkové hmoty proteinu a jsou chráněny membránovými lipidy před štěpením trypsinem (Jørgensen, 1992). V počátečním zkoumání transmembránového uspořádání byla určena orientace N-konce α -podjednotky v cytoplazmě (Giotta, 1975; Jørgensen, 1975 a Jørgensen & Andersen, 1988). Dříve neurčitá orientace C-konce se zdá být nyní jasná ve prospěch cytoplazmatického umístění (Antolovic et al., 1991; Modyanov et al., 1992 a Shull & Greeb, 1988). Na základě blízké podobnosti grafů hydropatie aminokyselin Na⁺/K⁺-ATPasy k Ca²⁺- a H⁺/K⁺-ATPasam, může být model 10ti transmembránových domén upřednostňován také pro Na⁺/K⁺-ATPasu (Sachs et al., 1992; Shull & Greeb, 1988 a Takeyasu et al., 1990). Určení deseti transmembránových segmentů vyplývá z pozorování 19 kDa tryptického fragmentu s N-terminálním asparaginem (Asn837), který je umístěn v cytoplazmě (Karlisch et al., 1993). Další údaje je možno získat z experimentů směřovaných na lokalizaci předpokládaných regulačních fosforylačních míst (Chibalin et al., 1992).

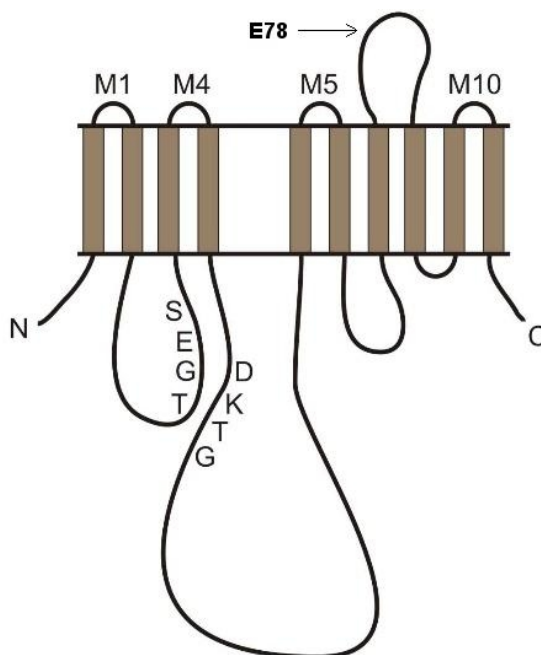
Organizace hydrofobních domén Na⁺/K⁺-ATPasy, s ohledem na každou navzájem, byla studována značením aminokyselinových residuí dotýkajících se lipidů s markery 3-(trifluoromethyl)-3-(*m*-[¹²⁵I]jodofenyl)diazirin([¹²⁵I]TID) a 1-palmitoyl-2-[11-[4-[3-(trifluoromethyl)diazirinylyl]fenyl]][2-³H]undekanoyl]-*sn*-glycerofosforylcholin([2-³H]PTPC-/11) (Modyanov et al., 1992). Menší inkorporace markerů do konformace E₁ α podjednotky než do konformace E₂ indikuje strukturální přeskupení do membrán začleněných domén během cyklu pumpování (Vasilets & Schwarz, 1993).

2.3.2.2 α -podjednotka

Podjednotka α Na⁺/K⁺-ATPasy je složena z přibližně 1000 aminokyselinových residuí (Morth et al., 2007 in Janovská, 2010), má molekulovou hmotnost okolo 110 kDa a byly identifikovány čtyři odlišné isoformy (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010).

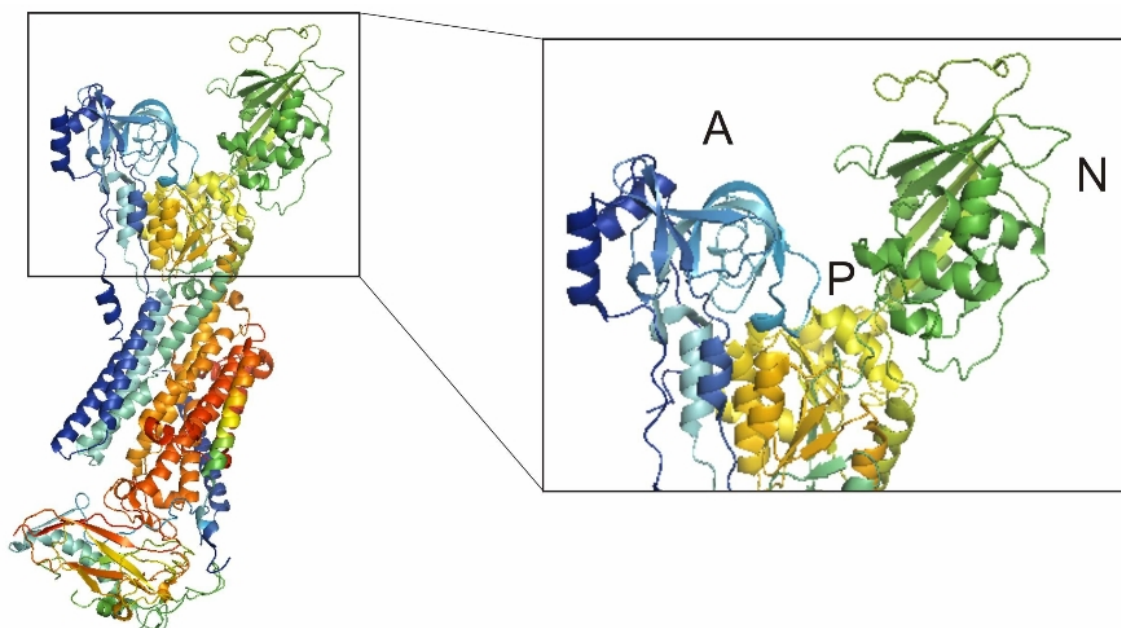
Náčrt α -podjednotky je ukázán na obrázku 7. Extracelulární smyčky jsou, s výjimkou smyčky E78, krátké. Jsou zde tři hlavní intracelulární struktury: za prvé velká centrální smyčka mezi α M4 a α M5 (C45), složená z přibližně 430 aminokyselinových residuí, dále dlouhý N-

terminální konec s přibližně 90 aminokyselinovými zbytky a nakonec intracelulární smyčka s přibližně 120 residui mezi α M2 a α M3 (C23) (Janovská, 2010).



Obrázek 7 – Náčrtek α -podjedenotky (Janovská, 2010; upraveno).

V terminologii Toyoshimovy SERCA struktury s vysokým rozlišením tvoří N neboli nukleotid-vázající doménu, P neboli fosforylační doménu a A neboli aktuátorovou doménu (pohánějící zařízení) – Obr.8 (Toyoshima et al. 2000 in Janovská, 2010). N a P domény jsou formovány C45 smyčkou, A doména je formována aminoterminálním koncem (ocasem) a C23 smyčkou (Shinoda et al. 2009 in Janovská, 2010).



Obrázek 8 – Seřazení cytoplazmatických domén Na^+/K^+ -ATPasy (PDB vstup 2ZXE). Na^+/K^+ -ATPasa je zobrazena ve spektru barevně od N-konce (modrá barva) po C-konec (tmavě žlutá barva). A (aktuátorová), N (nukleotid vázající) a P (fosforylační) domény jsou zobrazeny modře, zeleně a žlutě, v tomto pořadí. Helixy jsou zobrazeny pomocí spirál a β -řetězce pomocí šipek (Janovská, 2010).

Dvě kation-vázající místa (běžně Na^+ i K^+ současně) jsou lokalizována v transmembránové doméně. Jsou formována residui transmembránových helixů αM4 , αM5 , αM6 a αM8 . Helixy αM4 a αM6 Na^+/K^+ -ATPasy jsou nenavinuté ve středu, proto tvoří prostor pro ionty a αM1 ukazuje charakteristický $\sim 90^\circ$ uzel blízko cytoplazmatického povrchu membrány, kde dochází ke kontaktu s αM3 . Tento kontaktní bod může fungovat jako „otočný čep“ pro pohyb αM1 ve spojení s vazbou iontu (Morth et al., 2007). Část αM7 lokalizovaná blízko cytoplazmatického povrchu má zřetelnou smyčku $\sim 18^\circ$, který má zřejmě centrální význam ve vazbě K^+ . Navíc u helixů αM7 - αM10 se projevuje dynamická, neboli hnací role v Na^+/K^+ -ATPase a tyto helixy by mohly být použity ke změně pozice cytoplazmatické domény β -podjednotky (Shinoda et al. 2009 in Janovská, 2010).

Čtyři různé isoformy α -podjednotky byly nalezeny u člověka (Lingrel et al., 2007). Každá může asociovat s podjednotkou β ve stechiometrii 1:1 a formovat tak minimální funkční jednotku. Odpovídající isoformy u člověka a krysy jsou více podobné ($>97\%$ identita) než různé isoformy u stejných druhů (86 – 87 %) (Grishin et al. 1994 in Janovská, 2010).

Morth et al. (2009) vizualizoval rozdíly mezi třemi lidskými isoformami α_1 , α_2 a α_3 . Bylo ukázáno, že jsou zde velmi malé isoformové rozdíly v transmembránové oblasti, což naznačuje, že tyto oblasti jsou konzervované a důležité pro funkci a základní mechanismus transportu a stabilitu. Na druhé straně je zde mnohem více diferencí u povrchově vystavených

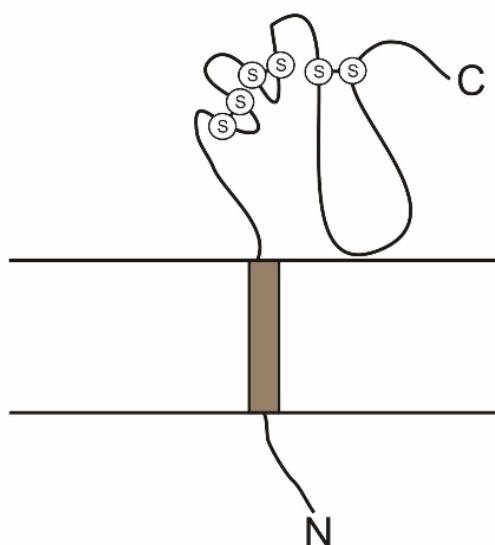
regionů A- a N- domén, odrážející pravděpodobně specifické interakce isoformem s ostatními buněčnými komponentami (Janovská, 2010).

2.3.2.3 β -podjedenotka

Na^+/K^+ -ATPasa a H^+/K^+ -ATPasa jsou jedinými členy ATPasové rodiny P-typu u nichž je známo, že obsahují β -podjedenotku (Janovská, 2010).

Podjedenotka β je transmembránový glykoprotein typu II s ~ 300 aminokyselinovými zbytky skládající se z cytoplasmatické aminoterminální domény čítající okolo 40 zbytků, jedinečného membránového segmentu a větší extracelulární karboxyl-terminální domény tvořené přibližně 240 zbytky (Laughery et al., 2003 in Janovská, 2010) (Obr.9). β -podjednotka má celkovou skutečnou molekulovou hmotnost 55 kDa a prozatím byly objeveny tři isoformy. Všechny β isoformy jsou intenzivně glykosylovány. Savčí β_1 -isoforma má tři N- glykosylační místa. Předpokládaná N-glykosylační místa pro β_2 -isoformu se liší v závislosti na druzích (Blanco a Mercer, 1998 in Janovská, 2010). Extracelulární doména má tři N-glykosylační místa, která jsou konzervována u všech isoformem β -podjednotky různých druhů (Dempski et al. 2005 in Janovská, 2010), a kromě toho obsahuje tři S-S můstky v extracelulární doméně (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010). Disulfidové vazby jsou vyžadovány pro cílení do plazmatické membrány a jsou vysoce odolné vůči redukcí (Laughery et al. 2003 in Janovská, 2010).

V souladu s výsledky Demského et al. (2006), transmembránový helix β -podjednotky je přilehlý k αM9 - αM8 - αM10 kapse. Shinoda et al. (2009) popsal, že transmembránový helix β -podjednotky je spíše oddělený od helixu z α -podjednotky a je nakloněn v úhlu $\sim 32^\circ$ od membránového normálu, téměř paralelně k αM7 . Bylo ukázáno, že βM je nejtěsnější k αM7 a přistupuje k αM10 blízko extracelulárního konce (Morth et al. 2007 in Janovská, 2010).



Obrázek 9 – Náčrtek β -podjednotky (Janovská, 2010).

Geering (2001) prezentoval výsledky, ze kterých plyne, že má β -podjednotka dvě hlavní funkce. Nezbytným významem je role β -podjednotky jako specifického chaperonu asistujícího ve správném vkládání nově syntetizovaných podjednotek α Na^+/K^+ -ATPasy a H^+/K^+ -ATPasy do membrány a, z tohoto důvodu, v jejich strukturálním a funkčním dozrání. Kromě toho, spojení β -podjednotky určuje některé podstatné vnitřní transportní vlastnosti Na^+/K^+ a H^+/K^+ -ATPasy a moduluje citlivost pumpy na kationy (Dempski et al. 2005 in Janovská, 2010). Morth et al. (2007) popsali jasnou indikaci toho, že β -podjednotka kompletně pokrývá extracelulární αM6 a αM7 - αM8 smyčky jako víčko, což může souviset s esenciální rolí β -podjednotky v pohlcování K^+ iontů. Souhlasně k výsledkům Shinody et. al (2009), jsou zde komplexní interakce mezi β - a α -podjednotkou, tvořenou solnými můstky mezi βArg183 , αGlu899 a βLys250 , což způsobuje modulaci transportu kationů β -podjednotkou (Janovská, 2010).

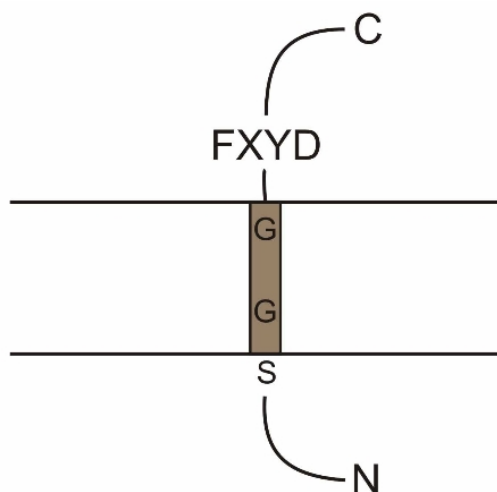
Ukázalo se, že extracelulární doména β -podjednotky podstupuje konformační přeskupení během přechodu z E_1 na E_2 (Dempski et al. 2006 in Janovská, 2010). Podjednotky α a β se pohybují poblíž během konformační změny, navíc, jsou tyto interakce dynamické. Jde zde o strukturní přerovnávání mezi extracelulárním transmembránovým regionem a β -podjednotkou a oběma αM3 - αM4 a αM5 - αM6 regiony během translokace iontů (Janovská, 2010)

2.3.2.4 γ -podjednotka

Podjednotka γ Na^+/K^+ -ATPasy je členem rodiny FXYD proteinů. FXYD proteiny jsou jednoduché transmembránové proteiny pojmenované po neměnném extracelulárním motivu FXYD. U savců obsahuje rodina FXYD proteinů sedm členů (Geering, 2005 in Janovská, 2010). Specifická asociace s Na^+/K^+ -ATPasou a efekty funkce pumpy byla oznámena pro FXYD1 (také známý jako fosfolemman, či PLM), FXYD2 (také známý jako γ -podjednotka Na^+/K^+ -ATPasy), FXYD3 (také známý jako Mat-8), FXYD4 (také známý jako kortikosteroidní hormon-indukovaný faktor), nebo CHIF, FXYD7 a PLM-like protein z řitní žlázy žraloka (PLMS) (Garty a Karlsh, 2006 in Janovská, 2010).

FXYD proteiny jsou tkáňově-specifické pomocné podjednotky Na^+/K^+ -ATPasy regulující její aktivitu v souladu s fyziologickými požadavky tkáně, ve které jsou exprimovány (Geering, 2005 in Janovská, 2010). Tyto proteiny jsou krátké polypeptidy (>100 aminokyselin) s jedinečným transmembránovým segmentem a s nebo bez signálního peptidu (Garty a Karlsh, 2006 in Janovská, 2010). Transmembránový segment γ -podjednotky je tvořen přibližně 30 aminokyselinami s převážně α -helikální strukturou. Extracelulární část γ -podjednotky, obsahující FXYD motiv (Obr.10) se stěhuje mezi α - a β -podjednotkami, kde může dojít ke kontaktu s podjednotkou β . Je to blízko k αM9 , kde jsou Phe949, Glu953, Leu957 a Phe960 uvnitř interakční vzdálenosti γM (Morth et al., 2007 in, Janovská, 2010). Na druhé straně, dvě

koncervovaná Gly residua hrají důležitou roli v interakci s α M9, obzvláště Gly34 (Shinoda et al. 2009 in Janovská, 2010).



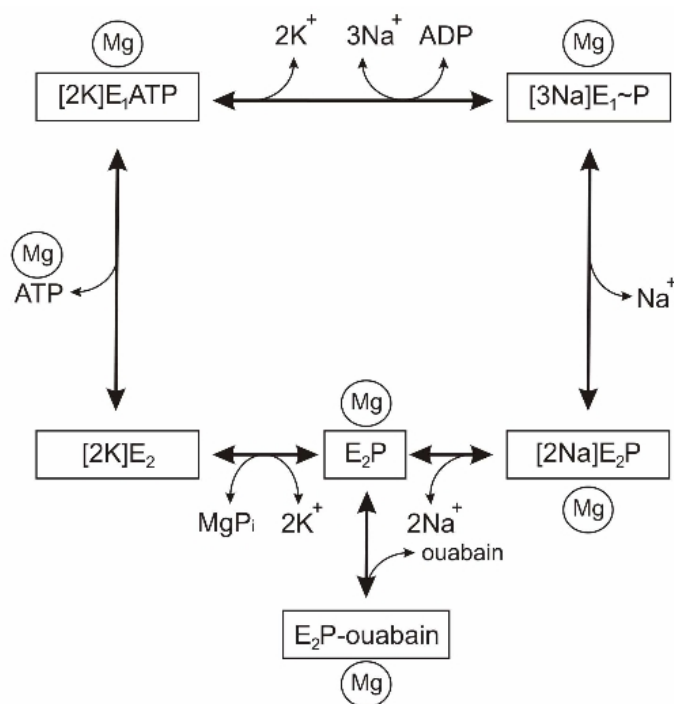
Obrázek 10 – Náčrtek γ -podjnotky se znázorněním pozic konzervovaných aminokyselinových residuí (Janovská, 2010).

2.3.3 Aktivní transport a hydrolýza ATP

Zjednodušeně můžeme reakční mechanismus formulovat čtyřkrokovým schématem: $E_1 \rightarrow E_1P \rightarrow E_2P \rightarrow E_2 \rightarrow E_1$. Toto schéma je zpravidla uváděno v případně Na^+/K^+ -ATPasy Post-Albertovým schématem. (Albers a Siegel 1967 in Janovská, 2010, Post et al., 1972 in Janovská, 2010).

Na^+/K^+ -ATPasa spojuje hydrolýzu ATP s aktivním transportem třech Na^+ iontů ven z buňky a dvou K^+ iontů do buňky v ping-pongové sekvenci, zatímco se střídají mezi dvěma kationtovými komplexy $E_1P[3\text{Na}]$ a $E_2[2\text{K}]$ (Jørgensen & Andersen, 1988 in Janovská, 2010). V modelu reakčního cyklu (Obr.11) relativně velké E_1 - E_2 konformační změny v podjednotce α zprostředkovávají dalekosahové interakce mezi místem pro ATP a kationtovými místy v membránové doméně (Lutsenko a Kaplan, 1995 in Janovská, 2010). V počátečním kroku, vazba ATP s nízkou afinitou ($K_m \approx 0.2 - 0.4 \text{ mM}$) k $E_2[2\text{K}]$ konformaci urychluje $E_2[2\text{K}]$ - $E_1[2\text{K}]$ přechod za uvolnění K^+ na cytoplazmatickém povrchu. ATP je vázán s vysokou afinitou v konformaci E_1 ($K_D \approx 300\text{-}100 \text{ nM}$) (Jørgensen & Andersen, 1988 in Janovská) a zvýšení ve vazebné energii ATP asociovaného s $E_2[2\text{K}]$ - $E_1[2\text{K}]$ konformačním přechodem představuje hnací sílu pro transport K^+ skrz membránu. Další krok transdukce energie je Na -dependentní přenos γ -fosfátu z ATP k acylové vazbě Asp269 podjnotky α a isomerace mezi uzavřenými $E_1P[3\text{Na}]$ a $E_2P[2\text{Na}]$ formami v propojení s reorientací kationtových míst a uvolnění Na^+ iontů na extracelulárním povrchu (Jørgensen & Pedersen, 2000 in Janovská, 2010). Na^+/K^+ -ATPasa také vykazuje ATP- K^+ antagonismus, protože dva vysoce afinitní ligandy stabilizují alternativní konformace, $E_2[2\text{K}]$ s pevně vázanými K^+ ionty nebo $E_1\text{ATP}$ s preferencí pro vazbu Na^+

(Obr.11). Analýzy ATP a kationtů mohou být proto využívány při odhadu udržování rovnováhy mezi E_1 a E_2 konformacemi proteinu a při určení afinit pro K^+ . Afinity pro Na^+ nebo Mg^{2+} vazbu mohou být analyzovány u formy $E_1P[3Na]$ použitím oligomycinu ke stabilizaci fosforylovaného komplexu (Pedersen et al. 2000 in Janovská, 2010). E_2P forma může být stabilizována v ouabainovém komplexu pro odhad afinit pro vazbu Mg^{2+} nebo anorganického fosfátu (Jørgensen et al., 2001 in Janovská, 2010). Vysoce afinitní vazba Rb^+ a Tl^+ může být analyzována v purifikované ledvinné Na^+/K^+ -ATPase nebo v rekombinantním kvasinkovém enzymu při rovnováze s disociačními konstantami $K_D = 7-9 \mu M$ (Pedersen et al. 2000 in Janovská, 2010).



Obrázek 11 – Schéma $E_1 \rightarrow E_2$ reakčního cyklu Na^+/K^+ -ATPasy s ping-pongovou sekvenční kationtovou translokací (Janovská, 2010).

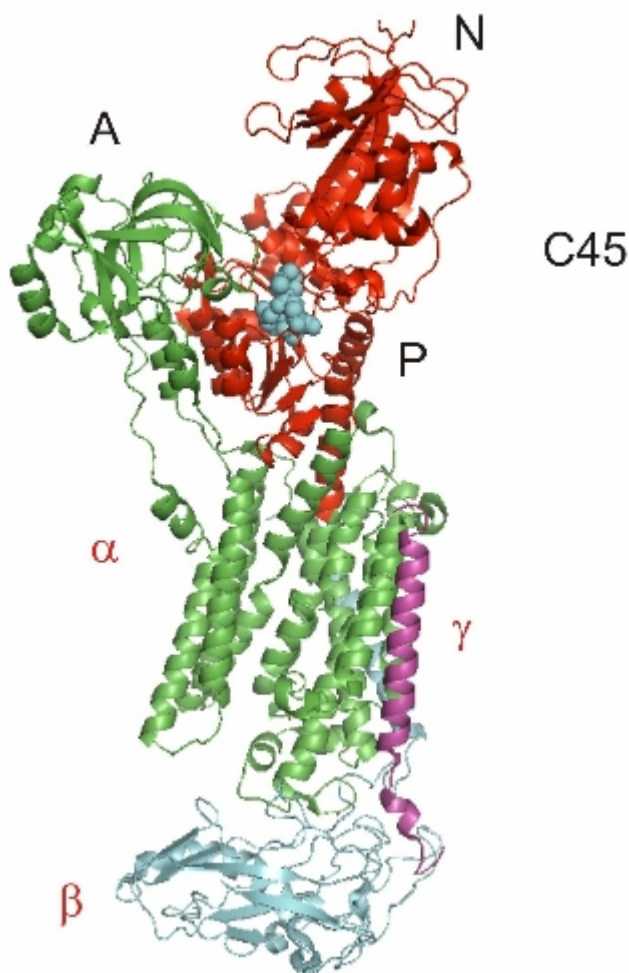
Charakteristický rys E_1 - E_2 přechodu je to, že aktivní místo pozměňuje jeho velikost vzhledem k asociaci a disociaci domény a jejímu sklonu skrze sklápění nebo rotaci P domény. Bylo popsáno, že vztah mezi N a P doménami se během reakce příliš nemění, ovšem asociace a disociace domény A je významný rys (Toyoshima et al. 2000 in Janovská, 2010, Xu et al. 2002 in Janovská, 2010).

2.3.4 Velký cytoplazmatický segment C45

Velká cytoplazmatická klička, lokalizovaná mezi helixy $\alpha M4$ a $\alpha M5$ (C45, Obr.12), která je tvořena přibližně 420 aminokyselinovými zbytky (Lys354-Lys773) s molekulovou hmotností okolo 48 kDa hraje klíčovou roli ve funkci enzymu. Klička je tvořena dvěma dobře

separovanými doménami. P-doména obsahuje fosforylační místo a N-doména obsahuje místo pro vazbu ATP (Janovská, 2010).

C45 klíčka obsahuje čtyři z nejvíce konzervovaných sekvencí P-typu ATPas, zahrnující sekvenci Asp-Lys-Thr-Gly-Ser/Thr (Obr.12), která obsahuje neměnné aspartátové residuum (Asp369), které je fosforylované pomocí ATP jako část katalytického mechanismu těchto proteinů. Přenos γ -fosforylové skupiny z ATP na protein je esenciální krok v katalýze iontového transportu u všech iontových pump P-typu (Janovská, 2010).



Obrázek 12 – Poloha klíčky C45 (červená barva) uvnitř $\alpha\beta\gamma$ komplexu Na^+/K^+ -ATPasy (PDB vstup 2ZXE). Konzervovaná sekvence Asp-Lys-Thr-Gly-Ser/Thr je zde v podobě modrozelených kuliček. Podjednotky α a β a γ jsou znázorněny zeleně, modře a fialově, v tomto pořadí. Helixy jsou zobrazeny jako spirály a β -řetězce v podobě šipek. Aktuátorové, nukleotid-vázající a fosforylační domény jsou popsány jako A, N a P, v tomto pořadí (Janovská, 2010; upraveno).

2.3.5 Fyzilogická role Na^+/K^+ -ATPasy

Jak bylo zmíněno výše, Na^+/K^+ -ATPasa je integrální membránový protein, který transportuje

Na^+ a K^+ skrze plazmatickou membránu téměř všech živočišných buněk a propojuje tuto práci s hydrolyzou terminální fosfátové vazby ATP. Podstatná frakce (přes $\approx 30\%$) ATP generovaného buněčným metabolismem je vyhrazeno k jejím aktivním transportním procesům (Kaplan, 2002 in Janovská, 2010).

Obecně, elektrický gradient tvořený sodnou pumpou, který je esenciální pro excitabilní aktivitu svalové a nervové tkáně, a který je vnitřně řízen Na gradientem udržovaným sodnou pumpou je používán ve většině buněk a orgánů k řízení příjmu a akumulaci široké škály esenciálních živin a buněčných substrátů a k redukci buněčného vápníku a koncentrace protonů.

Koncentrace Na^+/K^+ -ATPasy ve tkáních se značně mění až se 160000 násobným rozdílem mezi nejnižší (erythrocyty) a nejvyšší (mozková kůra) koncentrací. Hladké svalstvo cév je v nižším rozsahu spektra s velmi limitovanou koncentrací pump (400000 – 700000 pump/buňku); ~ 100 krát nižší než je vidět u srdce nebo u kosterního svalstva (Köksoy, 2002 in Janovská, 2010).

Byly identifikovány isoformy pro α - a β -podjednotky Na^+/K^+ -ATPasy a všechny vykazují unikátní tkáňově koncové („tissue-end“) vývojové expresní vzory a nyní jsou pro každou definovány specifické funkční role (Janovská, 2010).

Jak bylo zmíněno výše, existují tři isoformy podjednotky β : β_1 , β_2 a β_3 . Podjednotka α má isoformy čtyři – α_1 , α_2 , α_3 a α_4 . Zatímco α_1 isoforma je exprimována ve všech částech buňky, α_2 isoforma je převážně přítomna v kosterním svalstvu, srdci, mozku, adipocytech, hladkém svalstvu cév a oku, ale i dalších tkáních. Isoforma α_3 se nachází téměř výhradně v neuronech a vaječnicích, ale vyskytuje se také v bílých krvinkách a srdci některých druhů živočichů, včetně člověka (Dostanic-Larson, 2006 in Janovská, 2010). Isoforma α_4 je exprimována ve spermích a je specificky syntetizována ve stádiu spermatogonia, kde je vyžadována pro pohyblivost spermií (Woo, 2000 in Janovská, 2010).

Je rozumné věřit, že tkáňově-specifické rozdělení isoformy α naznačuje, že každá isoforma vykazuje specifickou funkci pro tkáň, ve které je exprimována. Sodná pumpa hraje pravděpodobně rozhodující roli během absorpce vody ve střevě a reabsorpci v ledvinách, jelikož je transport vody a Na^+ přes epitel trvale propojen. Takto může být sodná pumpa v ledvinách a tenkém střevě sdružena s patofyziologií hypertenze a chronických průjmů, v tomto pořadí (Therien & Blostein, 2000 in Janovská, 2010).

V excitabilních tkáních jako jsou neurony a kosterní svaly, musí sodná pumpa obnovit elektrický potenciál podél plazmatické membrány následovaný depolarizací indukovanou excitací. Kosterní svalstvo obsahuje jedno z největších množství Na^+/K^+ pump v těle a hraje tak centrální roli v odstraňování K^+ z krve během cvičení a v přijímání či vlévání K^+ . Při nízké koncentraci K^+ dochází ke snížené expresi Na^+/K^+ pump v kosterním svalu a při snaze obnovit v kosterním svalu zásoby K^+ , dochází k jeho odnímání z různých míst, což může způsobit

hyperkalemii či srdeční zástavu (Clausen, 1996 in Janovská, 2010).

Na^+/K^+ -ATPasa také slouží jako unikátní vazebné místo pro srdeční glykosidy, jako je ouabain, digoxin a digitoxin. Digoxin je v současnosti široce využíván v léčbě městnavého srdečního selhání (Kaplan, 2005 in Janovská, 2010). Dostanic-Larson et al. (2006) demonstrovali, že vazebné místo Na^+/K^+ -ATPasy pro srdeční glykosidy hraje významnou fyziologickou roli v regulaci krevního tlaku. Regulace sodné pumpy v srdečním svalu je kritická pro myokard, pro určení žádané hodnoty („set-pointu“) pro kontrakce srdečního svalu a ustáleného stavu („steady-state“) kontrakce hladkého svalstva cév (Therien & Blostein 2000 in Janovská, 2010).

Sodná pumpa, je cílem četných regulačních mechanismů aktivovaných v odpovědi na změny v buněčných požadavcích (Janovská, 2010).

2.4 Cisplatina

2.4.1 Obecné informace o cisplatině

Cisplatina (*cis*-diaminodichloroplatina(II), CDDP), je antineoplastické léčivo používané při léčbě mnoha typů rakovin, zahrnující rakoviny hlavy, krku, plic, varlat, vaječnicků a rakovinu prsu. Cisplatina je nebezpečná z hlediska ototoxicity, gastrotoxicity, myelosuprese a vyvolání alergické reakce (Hartmann et al., 2000 a Hartmann et al., 2003), ovšem hlavní na dávce závislý vedlejší efekt cisplatiny je nefrotoxicita (Sastry & Kellie, 2005; Arany & Safirstein 2003 a Boulikas, 1992). Nefrotoxicita cisplatiny byla rozpoznána od jejího uvedení před čtvrt stoletím. Přesto, navzdory intenzivnímu úsilí v dalších dekádách k nalezení méně toxických, ale stejně efektivních alternativ, byla cisplatina dále široce předepisována. Zůstává standardní komponentou při léčbě rakovin hlavy a krku (Planting et al., 1999), varlat (Loehrer et al., 1998), malobuněčných (Noda et al., 2002) a nemalobuněčných (Gatzemeier et al., 2000) rakovin plic, vaječnicků (Bolis et al., 1997 a Hoskins et al., 2000), děložního čípku (Rose et al., 1999), močového měchýře (Coppin et al., 1996) a dalších (Pritchard et al., 2000). Cisplatina je dostupná jako generické léčivo v USA a vytváří tak potíže při sledování prodeje a použití. Nicméně, vyhledáváním v ClinicalTrials.gov databázi bylo nalezeno 543 léčiv obsahujících cisplatinu, což naznačuje její široké klinické použití (Miller et al., 2010).

Nefrotoxicita cisplatiny může být presentována různými cestami (Tab.1). Nicméně, nejzávažnější a jedna z nejčastějších prezentací je akutní selhání ledvin (acute kidney injury, AKI), které nastává u 20-30 % pacientů (Miller et al., 2010).

Tabulka 1 – Projev cisplatiny na ledviny (Miller et al., 2010; upraveno).

Akutní onemocnění ledvin (20-30%)	Porucha koncentrační funkce ledvin
Hypomagnesémie (40-100%)	Hyperuricémie
Pancytopenie	Přechodná proteiurie
Distální renální tubulární acidóza	Deficiente erythropoetinu
Hypokalcémie	Trombotická mikroangiopatie
Hyponatrémie	Chronické renální selhání

2.4.2 Klinická charakteristika nefrotoxicity cisplatiny

Jako první bylo již v roce 1965 ukázáno, že cisplatina je inhibitorem buněčného dělení (Rosenberg et al., 1965). Od roku 1969 byly hledány protinádorové vlastnosti na zvířecích modelech (Rosenberg et al., 1969). První zpráva o nefrotoxicitě během studií na zvířatech přišla v roce 1971 (Kociba & Sleight, 1971), kdy byly demonstrovány histopatologické změny akutní tubulární nekrózy spolu s azotemií (nahromaděním dusíkatých látek). Brzké klinické použití cisplatiny ukázalo na dávce závislé akutní selhání ledvin indukované cisplatinou u 14–100% pacientů, s dopadem lišícím se s narůstající dávkou (Madias & Harrington, 1978 a Goldstein & Mayor, 1983). Výskyt ledvinové nedostatečnosti za použití nejnovějších testů se slanou hydratací a diurézou je v rozsahu 20-30% pacientů (Hartmann et al., 1999). Typicky, začíná počátek ledvinové nedostatečnosti několik dní po dávce cisplatiny se zvýšením koncentrace kreatininu v séru a dusíku močoviny v krvi. Výstup moči je obvykle zachován (nedochází ke snížení vylučování moči) a moč může obsahovat glukosu a malé množství proteinů, indikující dysfunkci proximálních tubulů. Běžná je také hypomagnesémie, obzvláště po opakovaných dávkách cisplatiny, dokonce při absenci snížení rychlosti glomerulární filtrace. Obnovení funkce ledvin obvykle trvá 2 – 4 týdny, ačkoliv byly sledovány i zdlouhavější zotavení, či dokonce situace, kdy k obnově nedošlo vůbec. Progresivní a stálá nefrotoxicita může vzniknout s postupnou léčbou navzdory dodržování všech preventivních opatření (Santoso et al., 2003 a Taguchi et al., 2005).

V tabulce 2 jsou uvedeny rizikové faktory pro nefrotoxicitu cisplatiny, které byly identifikovány (Miller et al., 2010).

Tabulka 2 – Rizikové faktory pro nefrotoxicitu cisplatiny (Miller et al., 2010; upraveno).

Zvyšující riziko	Snižující riziko
Dávka	Diabetes (nejisté u lidí)
Počet dávek	Polymorfismus OCT2
Celková dávka (kumulativní dávka)	
Vyšší věk	
Ženské pohlaví	
Kouření	
Hyperalbuminémie	
Preexistující ledvinná nedostatečnost (u lidí limitovaná data)	

Nefrotoxicita se zvyšuje s dávkou a četností podávání léku a také s narůstající dávkou cisplatiny (Madias & Harrington, 1978). Vysoká koncentrace volné plazmatické platiny koreluje s nefrotoxicitou (Reece et al., 1987), a v jedné studii bylo navrženo, že rychlost glomerulární filtrace a koncentrace hořčíku v plazmě se snižuje po dávce cisplatiny vyšší než 50 mg/m² plochy povrchu těla, ovšem zůstává neměnná pokud je dávka menší než 20 mg/m² plochy povrchu těla (Hartmann et al., 1999). Zvýšené riziko nefrotoxicity bylo u pacientů nalezeno v souvislosti s vyšším věkem, kouřením, u žen a lidí s hypoalbuminemií (de Jongh et al., 2001 and de Jongh et al., 2003). Obecně, preexistující dysfunkce ledvin zvyšuje riziko pro AKI. Ve specifickém případě cisplatiny, jsou nicméně limitována data ohledně dopadu nefrotoxicity v populaci s chronickým onemocněním ledvin od té doby, co mnoho zkoušek vylučuje pacienty s ledvinovou nedostatečností (Raj et al., 2006). Cukrovka snižuje riziko nefrotoxicity cisplatiny u zvířecích modelů (Scott et al., 1989), ovšem klinické studie nenalezly žádný dopad cukrovky na nefrotoxicitu u lidí (Gogas et al., 1996 Stewart et al., 1997). Pacienti s určitým polymorfismem v genu OCT2, který reguluje transport platiny do ledvinových buněk, mají nejspíše také nižší riziko projevu nefrotoxicity (Filipski et al., 2009 a Ciarimboli et al., 2010 61).

2.4.3 Mechanismus nefrotoxicity cisplatiny

2.4.3.1 Akumulace cisplatiny v ledvinových buňkách

Cisplatina je ledvinami vylučována glomerulární filtrací i tubulární sekrecí (Yao et al., 2007). Koncentrace cisplatiny uvnitř ledvin převyšuje koncentraci v krvi, což naznačuje aktivní akumulaci léčiva parenchymovými buňkami ledvin. Předchozí studie využívající plátky ledvin (Safirstein et al., 1984), kultivované ledvinové epitelové buňky (Endo et al., 2000) a izolované

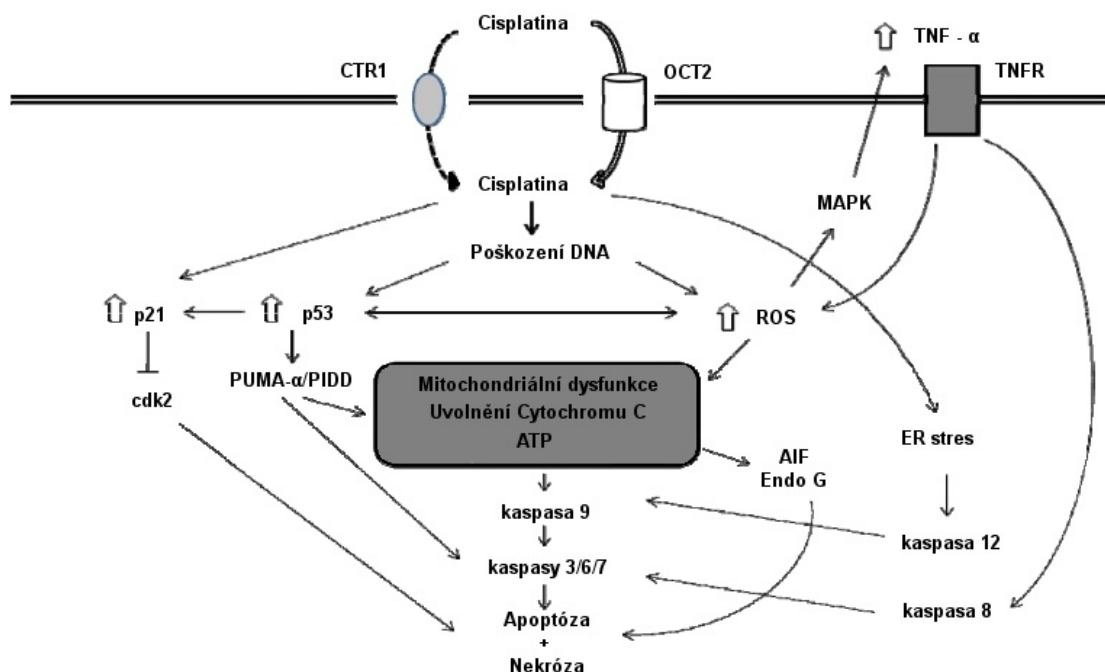
perfundované segmenty proximálních tubulů (Kolb et al., 2003) poskytly důkaz pro basolaterálně-apikální transport cisplatin. Studie nedávných let identifikovaly dva různé membránové transportéry schopné transportu cisplatin do buněk: Ctr1 a OCT2. Ctr1 je měďnatý transportér, který byl také ukázán jako schopný zprostředkovat příjem cisplatin do savčích buněk (Ishida et al., 2002), zahrnující buňky rakoviny vaječníku (Holzer et al., 2004). Ctr1 je silně exprimovaný v ledvinách dospělých a protein je lokalizován v basolaterální membráně proximálních tubulů (Pabla et al., 2009). Snížená exprese Ctr1 v ledvinových buňkách *in vitro* snižuje příjem cisplatin a cytotoxicitu, což naznačuje, že je Ctr1 významným činitelem mechanismu v příjmu cisplatin v těchto buňkách (Pabla et al., 2009). Role Ctr1 u nefrotoxicity cisplatin *in vivo* nebyla zkoumána. Navíc transportér organických iontů OCT2 (SLC22A2) transportuje cisplatinu (Ludwig et al., 2004; Ciarimboli et al., 2005; Filipski et al., 2008 a Yonezawa et al., 2006). Bylo ukázáno, že cisplatin inhibuje příjem jiných OCT2 substrátů, souhlasných s představou, že se tyto substráty podílejí na běžných transportních drahách. Podobně, cimetidin, substrát OCT2, snižuje příjem cisplatin a cytotoxicitu *in vitro* (Pabla et al., 2009; Ludwig et al., 2004; Ciarimboli et al., 2005) a nefrotoxicitu cisplatin *in vivo* (Ciarimboli et al., 2010). Dvě nedávná pozorování směřovala k významné roli OCT2 ve zprostředkování příjmu cisplatin do ledvin a toxicity cisplatin na ledviny. Nejprve, vyřazení („knockout“) OCT2 genu významně redukoval exkreci cisplatin močí (Filipski et al., 2009) a nefrotoxicitu (Filipski et al., 2009 a Ciarimboli et al., 2010). Za druhé, nesynonymní jednonukleotidový polymorfismus (SNP) v OCT2 genu (rs316019) spojen s redukovanou nefrotoxicitou způsobenou cisplatinou u pacientů (Filipski et al., 2009 a Ciarimboli et al., 2010). Důležitost těchto nálezů k možné prevenci cisplatinové nefrotoxicity je zmíněna dále (Miller et al., 2010).

2.4.3.2 Biotransformace cisplatin v ledvinách

Studie u krys a myší indikují, že cisplatin podstupuje metabolickou aktivaci v ledvinách na silnější toxin. Tento proces začíná tvorbou konjugátů s glutathionem v cirkulaci, což je zřejmě zprostředkováno glutathion-S-transferasou (Townsend et al., 2009 a Sadzuka et al., 1994). Vzhledem k tomu, že konjugáty s glutathionem prochází přes ledviny, jsou štěpeny na cysteinylglycinové konjugáty gamma-glutamyl-transpeptidasou (GGT) exprimovanou na povrchu buněk proximálních tubulů (Townsend et al., 2003 a Townsend & Hanigan, 2002). Cysteinylglycinové konjugáty jsou dále metabolizovány na cysteinové konjugáty aminopeptidasami, rovněž exprimovanými na povrchu buněk proximálních tubulů (Townsend et al., 2003). Cysteinové konjugáty jsou transportovány do buněk proximálních tubulů, kde jsou dále metabolizovány prostřednictvím cystein-S-konjugát beta-lyasy na vysoce reaktivní thioly (Townsend et al., 2003; Townsend & Hanigan, 2002 a Zhang & Hanigan, 2003).

2.4.3.3 Buněčné cíle cisplatiny

Platinové sloučeniny zprostředkovávají jejich cytotoxické efekty skrze interakci s DNA (Obr. 13) (Miller et al., 2010).



Obrázek 13 – Dráhy cisplatinou indukované smrti epitelových buněk. Cisplatinu vstupuje do epitelových buněk ledvin skrze OCT2 a, malou měrou, Ctr1 transportér. Cisplatinu způsobuje poškození jaderné a mitochondriální DNA a produkuje reaktivní formy kyslíku (ROS) vedoucí k aktivaci mitochondriálních i nemitochondriálních drah apoptózy a nekrózy (Miller et al., 2010; upraveno).

Ve vodném prostředí jsou chloridové ligandy cisplatinu nahrazeny molekulami vody vytvářejícími pozitivně nabitý elektrofil. Tento elektrofil reaguje s nukleofilními místy intracelulárních makromolekul za tvorby aduktů s DNA, RNA a proteiny (Pascoe & Roberts, 1974). Vazba cisplatinu na DNA vede k tvorbě inter- a intrařetězcových příčných vazeb („cross-linků“), tímto brzdí DNA syntézu a replikaci v rychle proliferujících buňkách (Wang & Lippard, 2005). Objev, že buňky deficientní v DNA opravách jsou více citlivé k buněčné smrti vyvolané cisplatinou podporuje návrh, že cisplatinu zprostředkovává její protinádorové vlastnosti skrze poškození DNA. Nicméně, prvenství v poškození jaderné DNA jako příčina buněčné smrti vyvolané cisplatinou bylo zpochybněno. Ve skutečnosti se totiž se k jaderné DNA váže pouze malé množství buněčné platinu (<1%) a je zde malá souvztažnost mezi citlivostí buněk k buněčné smrti indukované cisplatinou a rozsahem platinace DNA (Burger, 1997). Navíc, Mandic a jeho spolupracovníci použili bezjaderné buňky k demonstraci, že cisplatinou indukovaná apoptotická signalizace nastává nezávisle na poškození jaderné DNA (Mandic et al., 2003).

Několik řad důkazů navrhuje, že mitochondriální DNA, či jiné mitochondriální cíle, jsou ve zprostředkování indukované buněčné smrti cisplatinou pravděpodobně více důležité než poškození jaderné DNA (Cullen et al., 2007). Cisplatin je hydrolyzována k tomu, aby generovala pozitivně nabitý metabolit, který se prioritně akumuluje uvnitř negativně nabitých mitochondrií. Tudíž se zdá, že citlivost buněk k cisplatině koreluje s hustotou mitochondrií (Qian et al., 2005) i s mitochondriálním membránovým potenciálem (Hirama et al., 2006). Toto pozorování může vysvětlit specifickou citlivost proximálních tubulů ledvin k toxicitě cisplatin, protože tento segment vykazuje jednu z nejvyšších hustot mitochondrií v ledvinách (Gullans & Mandel, 2000). Porovnání k cisplatině citlivých a k cisplatině rezistentních buněk rakoviny vaječníku odhalilo nižší mitochondriální membránový potenciál stejně jako menší poškození mitochondriální DNA, což bylo zjištěno později (Hirama et al., 2006). Navíc, spotřeba mitochondriální DNA růstem buněk v ethidium bromidu poskytla buňky více rezistentní k cisplatině (Qian et al., 2005). Nakonec, mitochondriální DNA může být více citlivá k cisplatinou indukovanému poškození než jaderná DNA, v důsledku menší účinnosti DNA opravných mechanismů (Olivero et al., 1997). Dohromady tato pozorování ukazují na fakt, že mitochondriální DNA je významným cílem toxicity cisplatin (Miller et al., 2010).

Mitochondriální energetika je cisplatinou také porušena a může přispívat k nefrotoxicitě. Mastné kyseliny jsou hlavním zdrojem energie pro proximální tubuly, které jsou primárním místem poškození ledvin cisplatinou. Cisplatin inhibuje oxidaci mastných kyselin v myšších ledvinách a buňkách proximálních tubulů v kultuře skrze redukci v PPAR- α zprostředkované expresi genů zahrnutých ve využití buněčných mastných kyselin (Li et al., 2004 a Portilla et al., 2002).

PPAR receptory („perixosome proliferator activated receptors“) jsou zástupci receptorů pro steroidní hormony, patřící do superrodiny ligandem aktivovaných transkripčních faktorů. U obratlovců můžeme nalézt čtyři isoformy PPAR receptorů – α , β , γ a δ . Isoforma α se zdá být silně aktivována syntetickými peroxosomovými proliferátory a bylo ukázáno, že PPAR- α tvoří heterodimer s retinoidním X receptorem a váže se ke specifickým DNA sekvencím, které jsou lokalizovány v opačném směru ke genům citlivým k perixosomovým proliferátorům (Green, 1995)

Agonisté PPAR- α omezují nefrotoxicitu cisplatin *in vivo* (Li et al., 2004 a Li et al., 2004). Cisplatin také ovlivňuje mitochondriální dýchací komplexy a funkci. Vystavení kultivovaných buněk proximálních tubulů cisplatině *in vitro* inhibuje mitochondriální komplexy I a IV respiračního řetězce a, následkem toho, snižuje intracelulární množství ATP (Kruidering et al., 1997). Zacházení s cisplatinou *in vivo* také způsobuje mitochondriální dysfunkci jak je patrné z poklesu membránového elektrochemického potenciálu, podstatného poklesu v příjmu vápníku mitochondriemi a vyčerpání mitochondriálních antioxidačních ochranných systémů

(Kruidering et al., 1997 a Arany et al., 2008).

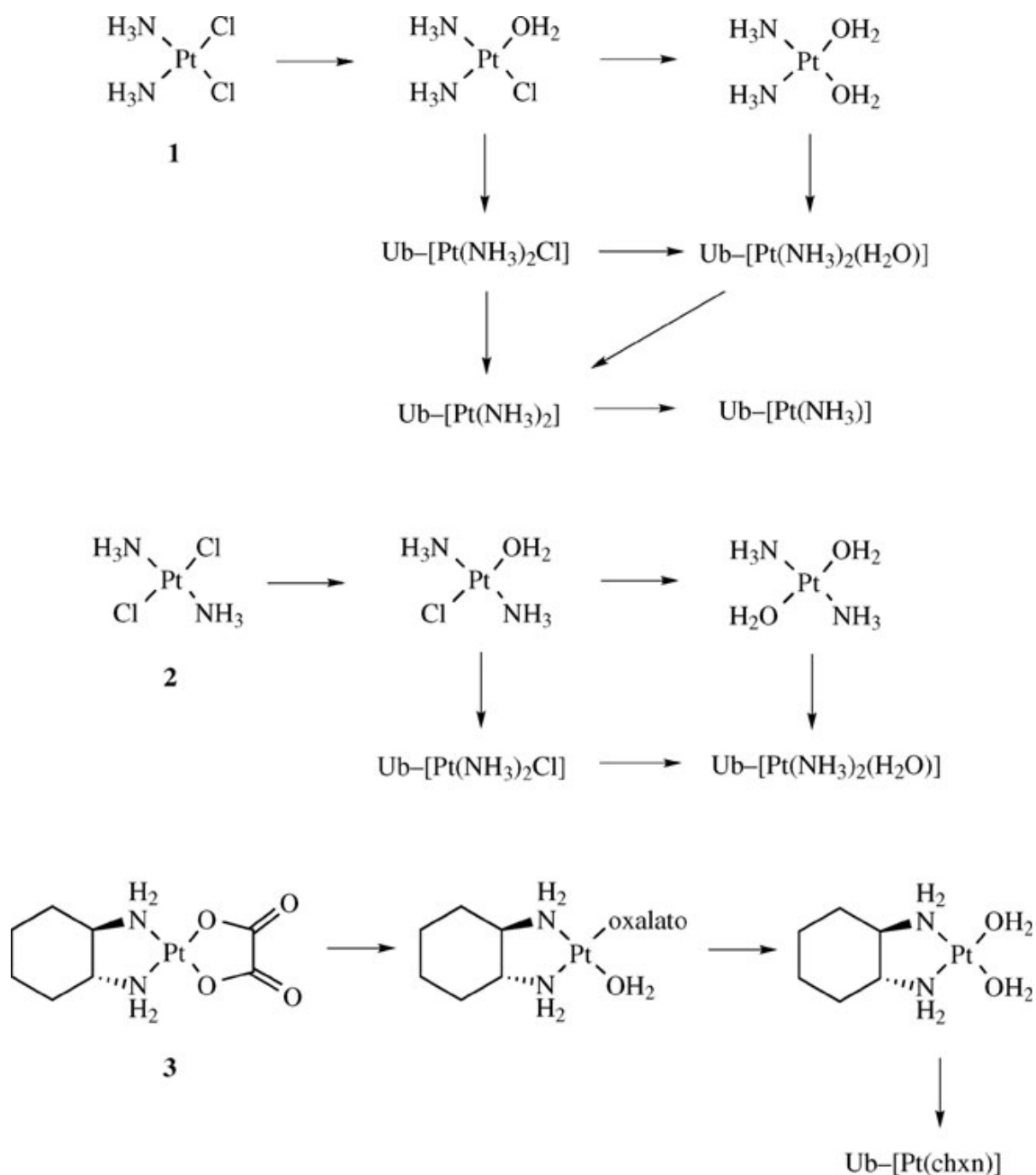
2.4.4 Cisplatina a zkoumání její interakce

Vývoj MALDI-MS (Tanaka, 2003; Tanaka et al., 1988 a Karas & Hillenkamp, 1988), ESI-MS (Fenn, 2003 a Fenn et al., 1989) a tandemové hmotnostní spektrometrie (MS^n) (Biemann, 1988) na konci 80. let umožnil stanovení molekulové hmotnosti intaktních proteinů, analýzu jejich aminokyselinových sekvencí a charakterizaci strukturních modifikací peptidů a proteinů (Hartinger et al., 2007).

Cisplatina [CDDP; *cis*-diaminodichloroplatina(II)], karboplatina a oxaliplatina (struktury viz obrázek 14) jsou nejvýznamněji běžně klinicky využívaná chemoterapeutika založena na platině (Hartinger et al., 2007).

V dnešní době jsou používána v 50% léčby pacientů s rakovinou (Galanski et al., 2003). Je známo, že se platinové komplexy po intravenózní aplikaci váží ve vysokém stupni (nad 90%) k proteinům plazmy (DeConti et al., 1973 a Hartmann & Lipp, 2003). Role vazby těchto tumor-inhibujících léčiv založených na kovech není dobře prozkoumána a může být pro různé kovové komplexy rozdílná. Nicméně, pro platinové komplexy byl významný příspěvek vedlejších účinků připsán právě vazbě na proteiny (Gullo et al., 1980 a Appleton, 1997). Na rozdíl od toho, dobrá snesitelnost a specifita pro tumory rutheniových léčiv je silně závislá na vazbě k transferrinu a také k albuminu, tímto využívají zvýšené mobility a efektu udržení se v organismu, což může přispívat k mechanismu účinku těchto kovových komplexů (Hartinger et al., 2006 a Timerbaev et al., 2006). Další otázky týkající se preferovaných vazebných míst kovových komplexů k proteinům zůstávají diskutovány. Použití ESI-MS ve spojení s kapalinovou chromatografií umožňuje určení vazebného místa CDDP k transferrinu na místě threoninu 457 (Allardyce et al., 2002 a Khalaila et al., 2005). V kontrastu, NMR studii byly stanoveny hlavními vazebnými partnery methioninová residua (Chen et al., 1999 a Cox et al., 1999).

V nedávných letech byly ve hmotnostně spektrometrických studiích zkoumány vazby protirakovinných kovových koordinačních sloučenin k proteinům s využitím klinicky schválených léčiv i léčiv ve stádiu vývoje. Z těchto proteinů šlo především o ubikvitin (Ub), myoglobin a cytochrom *c* (Cyt-C), ale také albumin, transferrin nebo glutathion-*S*-transferasu (Allardyce et al., 2002; Khalaila et al., 2005; Timerbaev et al., 2004; Sulyok et al., 2005; Pongratz et al., 2004, Groessl et al., 2006, Polec-Pawlak et al., 2006 a Ang et al., 2005). Bylo ohlášeno, že CDDP, transplatina [TDDP; *trans*-diaminodichloroplatina(II)], karboplatina a oxaliplatina reagují velmi podobně s Cyt-C, uvolňuje se ovšem buď oxalátový nebo malonátový chelát (Obr.14 – schéma hydrolýzy CDDP, TDDP a oxaliplatiny) (Casini et al., 2006).



Obrázek 14 – Hydrolýza a hlavní Ub vazebné dráhy cisplatiny (1), transplatiny (2) a oxaliplatiny (3). V závislosti na pH mohou být vodné roztoky deprotonovány. Pro zjednodušení jsou vynechány náboje (Hartinger et al., 2007)

Využitím kombinace gelové elektroforézy, ICP-MS s laserovou ablací a proteomických metod byla studována vazba CDDP k proteinům v bakteriích a CDDP a NAMI-A v lidské plazmě a byly identifikovány specifické proteinové cíle (Allardyce et al., 2001 a Khalaila et al., 2006). Sadler a jeho spolupracovníci charakterizovali vazbu experimentálního organokovového Ru-arenového léčiva na Cyt-C kombinací hmotnostní spektrometrie a NMR metod a zjistili, že při inkubaci Cyt-C s desetinásobným nadbytkem Ru(II) komplexu ve vodě a v pufru (octan triethylammonia, pH 8.7 a 7.6, v tomto pořadí) se tvořili pouze monorutheniové druhy aduktů (Wang et al., 2005). Nedávno byla také zjištěna vazba Ru(II)-arenového komplexu RAPTA-C a

analogických oxalato a 1,1-cyklobutandikarboxylových sloučenin na Cyt-C a lysozym a vazebné místo Cyt-C bylo identifikováno jako His33 (Casini et al., 2007).

Ubikvitin byl dosud studován výhradně v souvislosti s antineoplastickými platinovými komplexy CDDP, TDDP a asymetrickými *trans*-Pt komplexy (Gibson & Costello, 1999; Peleg-Shulman & Gibson, 2001; Peleg-Shulman et al., 2002; Najajreh et al., 2003; Balter & Gibson, 2005 a Najajreh et al., 2006). Ubikvitin je malý protein složený ze 76 aminokyselin a s molekulovou hmotností 8565 g.mol⁻¹ (Denison, 2005). Ubikvitin plní u eukaryot esenciální funkce: po označení substrátů ubikvitinovým polymerem jsou tyto substráty cíleny do multipodjednotkové ATP-dependentní proteasy, zatímco substráty označené pouze několika ubikvitiny mají sklon k endocytóze a ve výsledku dochází k proteolýze. U cisplatin bylo zjištěno, že s ubikvitinem tvoří mono- a bis-adykty různých typů, zatímco TDDP vytváří převážně monofunkční adukt Ub-[Pt(NH₃)₂Cl] (monofunkční adukt znamená, že protein okupuje jediné Pt koordinační místo; adekvátně bi- a tri-funkční adukty mají dvě, respektive tři vazby Pt-protein) (Gibson & Costello, 1999 a Peleg-Shulman et al., 2002). Asymetrické Pt(II) komplexy byly určeny pouze v přiřazení výhradně k Met1 ubikvitinu (Balter & Gibson, 2005), který byl navržen jako hlavní cíl pro CDDP, ovšem ne pro TDDP (Hartinger et al., 2007).

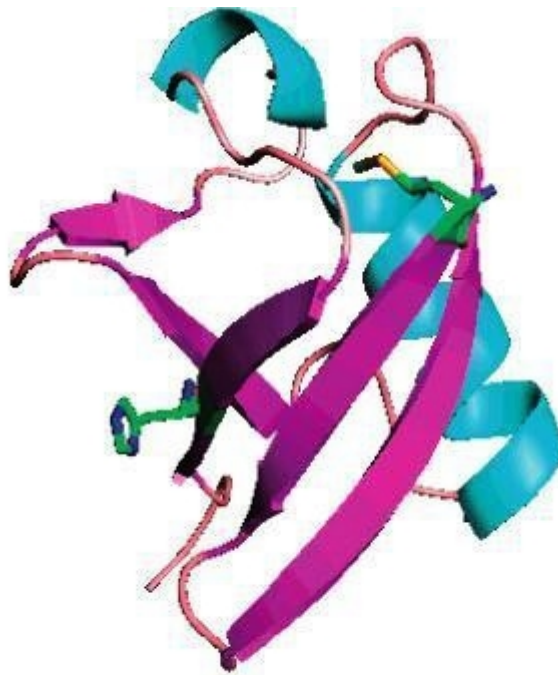
Ve článku Hartinger et al. 2007 byla popsána srovnávací studie použitelnosti nESI (ionizace nanoelektrosprejem) a MALDI technik pro analýzu vazby tumor-inhibujících protirakovinných činitelů oxaliplatinu a CDDP a *trans*-isomeru (TDDP) směrem na modelový protein ubikvitin. Byly zde diskutovány výhody a nevýhody porovnávaných metod pro studium interakce mezi kovovými komplexy a proteiny. V tomto článku bylo poprvé použito MALDI-MS pro charakterizaci interakce mezi proteiny a na bázi kovů (Hartinger et al., 2007).

2.4.5 Reakce platinových komplexů s ubikvitinem

Vazba platinových chemoterapeutik (cisplatinu, oxaliplatinu a neaktivního isomeru transplatinu) na DNA je hlavním jevem pro využití jejich protirakovinné aktivity (Jung & Lippard, 2007).

Vazba na sérové proteiny přispívá u těchto platinových k jejich vedlejším účinkům. U mnoha zkoumaných léčiv, jako například nedávno vyvinutých rutheniových sloučeninám se ovšem uvažuje, že by tato vazba mohla být pozitivně využita (Timerbaev et al., 2006; Ang & Dyson, 2006 a Hartinger et al., 2006).

Pro cisplatinu, její neaktivní strukturální isomer transplatinu a oxaliplatinu byl určen nejvíce zřetelý rozdíl ve vazbě k ubikvitinu (Ub; Obr.15) v rámci vazebné kinetiky a typu formovaných aduktů (Peleg-Shulman & Gibson, 2001; Peleg-Shulman et al., 2002 a Hartinger et al., 2007).



MQIFVKILTG KTITLEVEPS DTIENVKAKI QDKEGIPPDQ
 QRLIFAGQL EDGRTLSDYN IQKESTLHLV LPLRGG

Obrázek 15 – Nahoře molekulární struktura Ub (Vijay-Kumar et al., 1987) s vyznačenými residui Met1 a His68 (LLC. PyMOL, 0.98; DeLano Scientific LLC: Palo Alto, CA). Dole aminokyselinová sekvence Ub s vyznačenými potenciálními vazebnými místy pro kov (Hartinger et al., 2008, upraveno).

Skrze nepřímé stanovení s oxidovanou Ub sírou bylo ukázáno, že se cisplatina váže primárně na síru Met1 a jako sekundární cíl byl určen His68 (Peleg-Shulman & Gibson, 2001; Peleg-Shulman et al., 2002 a Gibson & Costello, 1999), zatímco u vazby transplatiny k ubikvitinu se neprojevovalo směřování k proteinu afinitou cisplatiny k síře. Tento výsledek byl získán z experimentů za použití ESI-MS s oxidovanou Ub sírou, která vede k poklesu reaktivity cisplatiny směrem k Ub (Peleg-Shulman & Gibson, 2001; Peleg-Shulman et al., 2002 a Gibson & Costello, 1999) a z „[¹H, ¹⁵N] heteronucle single quantum coherence“ NMR spektroskopie (Peleg-Shulman & Gibson, 2001). V kontrastu, nebyl u transplatiny nalezen vliv na vazebnou kinetiku, i když byl Met1 oxidován (Hartiger et al., 2008).

Nejběžnější cesta k určení vazebných míst proteinu vyžaduje „bottom-up“ přístup zahrnující digesci proteinu a analýzu pomocí LC-MS (Allardyce et al., 2002; Khalaila et al., 2005 a Casini et al., 2007). Tato metoda není vždy vhodná pro studium léčiv na bázi kovů, jelikož pufr hydrogenuhličitan amonný způsobuje uvolnění platinových aduktů (Gibson & Costello, 1999).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

- **Biologický materiál**

Ke štěpení vzorků proteinů byly použity tyto proteasy – stachyosou modifikovaný hovězí trypsin a elastasa (Šebela, 2006). Dále byly použity myoglobin z koňského srdce, hovězí albumin, ubikvitin z hovězích erytrocytů, lysozym z bílku kuřecího vejce, pepstatin A (mikrobiální zdroj), leupeptin hemisulfát a kanamycin sulfát od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), cytochrom *c* od firmy MP Biomedicals (Solon, USA), lysozym a isopropylthiogalaktosid od firmy Roth (Karlsruhe, Německo), Pepton (peptone from kasein) a kvasničný extrakt (Yeast extrakt servabacter) od firmy Serva Electrophoresis (Heidelberg, Německo).

K vyizolování proteinu byla použita kultura *Escherichia coli* Rosetta-gami a DNA – wild type (WT) velké cytoplazmatické kličky Na⁺/K⁺-ATPasy s His-kotvou (Kubala, 2005).

- **Chemikálie**

5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aceton	Acros organics (New Jersey, USA)
AgNO ₃	Lachema N.P. (Neratovice, Česká republika)
Akrylamid	Serva electrophoresis (Heidelberg, Německo)
APS	Fluka Biochemica (Buchs, Švýcarsko)
APS	Bio-Rad Laboratories (Berkeley, USA)
barvicí roztok Bio-Safe CBB R-250 staining	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
Cis-diaminodichloroplatina	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Coomassie brilliant blue G-250	Bio-Rad laboratories
peroxidisíran amonný	Fluka BioChemika
Coomassie brilliant blue R-250	Bio-Rad laboratories
EDTA (disodná důl, dihydrát)	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
HCl 35%	Lach-Ner
Hydrogenuhlíčan amonný	Fluka analytical (St. Louis, USA)
Imidazol	Roth (Karlsruhe, Německo)
IPTG	Roth

Kyselina octová	Lach-Ner
L-cystein hydrochlorid monohydrát	Sigma-Aldrich
MES monohydrát	Fluka Analytical
MES	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck (Darmstadt, Germany)
N-acetyl-L-cystein	Sigma-Aldrich
NaCl	Lachema
NaOH	Lach-Ner
N-ethylmaleimid	Sigma
Octan amonný	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
SDS	Bio-rad Laboratories
SDS	Serva Electrophoresis
TEMED	Bio-Rad Laboratories
Tris	Bio-Rad Laboratories
Tris	MP biomedicals (Solon, USA)

- Matrice pro MALDI MS:

Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Kyselina sinapová	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

- Materiál pro transformaci a expresi

Dialyzační pufr: 20 mM TRIS + 140 mM NaCl, pH 8.0

Sonikační pufr: 10 mM TRIS + 10 mM NaCl, pH 8.8

Promývací pufr: 20 mM TRIS + 140 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7.6

Regenerační pufr: 20 mM MES, pH 5.0

Eluční pufr: 0.5 M imidazol, pH 8.5

Pro indukci exprese se používal isopropylthiogalaktosid (IPTG) (100 mg/ml).

Dále bylo použito antibiotikum kanamycin (30 mg/ml), inhibitory proteas (na 10 ml roztoku 15 mg lysozymu, 10 μ l leupeptinu (2 mg/ml), 4 μ l pepstatinu, 26 mg PMSF, 10 μ l DTT (0.1543g/1ml) a 100 μ l EDTA).

Pro růst buněk LB (Luria-Broth) médium – na 200 ml 2 g Peptonu (peptone from kasein), 1 g kvasničného extraktu (Yeast extrakt servabacter) a 2 g NaCl.

K vyizolování proteinu byla použita kultura *Escherichia coli* Rosetta-gami a DNA – wild type (WT) velké cytoplazmatické kličky Na⁺/K⁺-ATPasy s His-kotvou (Kubala, 2005).

- Chemikálie pro SDS-PAGE elektroforézu:

Katedra biofyziky UP Olomouc:

30% akrylamid/0.8% N,N'-metylen-bisakrylamid 29:1 (3.3% C),

Separační pufr (1.5 M TRIS, 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8),

Zaostřovací pufr (0.5 M TRIS, 0.4% (w/v) SDS, pH 6.8),

Na₂SO₃,

TEMED,

APS (100 mg/ml),

Isobutanol na převrstvení,

SDS vzorkovací pufr (na 1 litr – 135 ml 1 M TRIS, 150 ml glycerolu, 22 ml mekaptoethanolu, 720 ml destilované H₂O a 30 g SDS),

Elektrodový pufr (na 1 litr – 3 g TRIS, 14.4 g glycin, 1 g SDS, pH neupravované)

Rozdělovací gel 10% (10 ml): 2.5 ml akrylamid/bisakrylamid, 2.5 ml separačního pufru, 4.95 ml destilované H₂O, 15 mg Na₂SO₃, 9.75 µl *N,N,N',N'*-tetramethyl-ethan-1,2-diamin (TEMED), 25 µl peroxidisíran amonný (APS) (100 mg/ml)

Zaostřovací gel 4% (10 ml): 1 ml akrylamid/bisakrylamid, 2.5 ml zaostřovacího pufru, 6.5 ml destilované H₂O, 15 mg Na₂SO₃, 19.5 µl *N,N,N',N'*-tetramethyl-ethan-1,2-diamin (TEMED), 50 µl peroxidisíran amonný (APS) (100 mg/ml)

Barvení gelů: standardní barvicí roztok Coomassie brilliant blue G-250

Katedra biochemie UP Olomouc:

30% akrylamid/0.8% *N,N'*-metylen-bisakrylamid 29:1 (3.3% C),

SDS-PAGE 4x dělicí gelový pufr (1.5 M TRIS/HCl, pH 8.8),

SDS-PAGE 4x zaostřovací pufr (0.5 M TRIS/HCl, pH 6.8),

Wiltfang zásobní roztok 10% (w/v) SDS,

TEMED,

APS (100 mg/ml),

Vodou nasycený 50 % (v/v) n-butanol na převrství horního gelu,

Vzorkovací pufr – Laemmliho pufr (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% roztok bromfenolové modři, 5% β-merkapt ethanol) od firmy Fluka Biochemica (Steinheim, Německo)

SDS Elektrodový pufr (0.025 M TRIS, 0.192 M Glycin, 0.1% w/v SDS, pH 8.3)

Dělicí gel 10% - 3.4 ml akrylamidu/bis-akrylamidu, 2.5 ml SDS-PAGE 4x dělicí gelový pufr, 3.8 ml destilované H₂O, 100 µl 10% SDS, 15 µl TEMED a 50 µl APS

Zaostřovací gel 4% - 0.65 ml akrylamidu/bis-akrylamidu, 1.25 ml SDS-PAGE 4x zaostřovací gelový pufr, 2.95 ml destilované H₂O, 100 µl 10% SDS, 15 µl TEMED a 60 µl APS

Barvení gelů: standardní barvicí roztok Coomassie brilliant blue R-250, barvicí roztok Bio-Safe CBB R-250 staining a standardní odbarvovací roztok (7% kyselina octová, 5% methanol)

- Standardy

Při měření peptidů byla použita směs peptidů pro externí kalibraci hmotnostního spektrometru Microflex – „peptide calibration standard II“ v rozsahu ~ 700-4000 Da. Při měření proteinů byl

použita směs proteinů pro externí kalibraci a to „protein calibration standard I“ s rozsahem ~ 5000-17500 Da a „protein standard II“ s rozsahem ~ 20000-70000 Da, vše zakoupeno od firmy Bruker Daltonics (Brémy, Německo)

- Chemikálie pro štěpení proteinu v gelu:

Pro in-gel digesci byly použity: vodou nasycený n-butanol, Wiltfang 10% SDS, *in-gel* digestion acetonitril, *in-gel* digestion 5% (v/v) kyselina mravenčí a *in-gel* digestion hydrogenuhličitan amonný (25, 50 a 100 mM) Sigma Aldrich (St. Louis, USA), jodoacetamid firmy Sigma chemical Co. (St. Louis, USA), DL-Dithiothreitol firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) a DL-Dithiothreitol firmy Fluka Biochemica (Buchs, Švýcarsko).

- Roztoky pro zip/tip metodu

Pro zip/tip metodu byly použito ekvilibračního roztoku (wash solution), „wet“ roztoku (pre-wet solution) a elučního roztoku (indirect elution solution) a 0.1% trifluoroctová kyselina.

- Čištění kolony

Kobaltová kolona byla promyta nejdříve 200 ml MES, pH 5, poté 10 ml destilované vody a zakonzervována ve 20% ethanolu.

- Ostatní chemikálie

Set pro stanovení koncentrace proteinů BCA metodou firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Ethanol (96%) denaturovaný, MALDI-TOF-MS 0.1% TFA, MALDI-TOF-MS 2.5% TFA, Acetonitril: 0.1% TFA 1:2 (v/v) Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

- **Přístrojové vybavení**

Vybavení pro SDS-PAGE elektroforézu (Skla s 0.75 mm spacers, zdroj napětí Bio-Rad PowerPac Universal™ a MiniPROTEAN® 3 Cell U.S.A) firmy Bio-Rad Laboratories (Berkeley, USA).

Analytické váhy	Sartorius (Göttingen, Německo)
Analytické váhy	Denver Instrument (USA)
Autokláv Tuttnauer 2340 M	Tuttnauer (New York, USA)
Biological thermostat BT120	Laboratorní přístroje Praha
Centrifuga Sigma 3-30K	Sigma (Osterode am Harz, Německo)
Centrifuga spectrafuge mini	Labnet International (Woodbridge, USA)
Destička pro MALDI-TOF-MS	
AnchorChip 600/96 microScout target	Bruker Daltonics (Brémy, Německo)
digestoř	Merci (Praha, Česká republika)

Eppendorfky (0.5, 1 a 2 ml)	Eppendorf (Hamburg, Německo)
flowbox Steril-gemini	BioInstruments (Firenze, Itálie)
Hmotnostní spektrometr	
Bruker Microflex MALDI-TOF LRF20	Bruker Daltonics
Magnetická míchačka IKA® C-MAG HS 7	IKA (Praha, Česká republika)
Nanodrop Biospec-nano	Schimadzu Biotech
Odstředivka eppendorf miniSpin plus	Eppendorf
pH metr 330i	WTW (College Station, USA)
pH metr	InoLab (Kladno, Česká republika)
Pipety Eppendorf reference (2.5 µl)	Eppendorf
Pipety Eppendorf research plus (10, 20, 100, 200, 1000 a 5000 µl)	Eppendorf
Předvážky (různé rozsahy)	Kern (Balingen-Frommern, Německo)
Sonikátor Ultrasonic 3000	BioLogics (Manassas, USA)
Spektrofotometr	WPA
Stolní centrifuga miniSpin plus	Eppendorf
Špičky (10, 200, 1000 a 5000 µl)	Eppendorf
Termoblok AccuBlock™ Digital Drybase	Labnet International (Woodbridge, USA)
Termostat plus	Eppendorf
Thermomixer komfort 1.5 ml	Eppendorf
Transiluminátor UVT-40W	Herolab (Wiesloch, Německo)
Třepačka „vortex“ SA8	Merci (Česká republika)
Třepačka IKA® Vibrax VXR Basic	Fischer Scientific (Pardubice, Česká republika)
UV 500 UV-visible spectrometer	Thermo spectronic (Madison, USA)
Vortex IKA® MS2 MiniShaker	IKA-Werke (Staufen, Německo)
Výkyvná třepačka	Wavetec, Švýcarsko
Výrobník ledu SL 35 W	Maso-profit (Praha, Česká republika)
Zip/tip špičky pro přípravu vzorků (µ-C18)	Millipore corporation (Billerica, USA)

- **Použitý software**

FlexAnalysis 2.4 a FlexControl 3.0 firmy Bruker Daltonics (Brémy, Německo), Mascot server 2.2 firmy Matrix Science (Londýn, Velká Británie) a mMass 3.1.0 a 5.0.0 Institut chemické technologie (Praha, Česká republika).

3.2 Metody

3.2.1 Složení kultivačního LB média

Na 200 ml LB média je potřeba 1 g kvasničného extraktu, 2 g NaCl a 2 g peptonu. Úprava pH na hodnotu 7.4 byla provedena pomocí NaOH. Sterilizace média probíhala autoklávováním po dobu 45 minut při teplotě 121°C. Po autoklávování bylo LB médium skladováno při 4°C. Druhý den bylo LB médium rozděleno na menší (4 ml) a větší (196 ml) objem. Do menšího objemu byly později přidány nakultivované buňky a kanamycin o koncentraci 30 mg/ml a do většího objemu antibiotikum kanamycin o téže koncentraci.

3.2.2 Kultivační podmínky a exprese rekombinantní C45 kličky

Prvním krokem bylo smíchání 10 μ l buněk *E. coli* Rosetta-gami s 2 μ l DNA o koncentraci 100 ng/ μ l obsahující gen pro rekombinantní C45 kličku Na⁺/K⁺-ATPasy o hmotnosti 48 kDa - vše probíhalo při teplotě 4°C. Po smíchání došlo k inkubaci po dobu 20 minut při 4°C s následným tepelným šokem při 42°C po dobu 1 minuty. Následovala inkubace 1-2 minuty při 4°C a vysetí buněk na agarové misky s obsahem kanamycinu. Před vysetím na misky je ještě možno pro lepší účinnost přidat k buňkám 700 μ l LB média o teplotě 37°C, směs hodinu inkubovat při 37°C a na misky vysít 10 μ L směsi. Misky s kulturou se inkubovaly po dobu cca 16 hodin při 37°C. Po této inkubaci byla miska s kulturou skladována při 4°C. Po rozdělení LB média na malý a velký objem byl malý objem sterilizován po dobu 45 minut při teplotě 121°C. K malému objemu byly ve sterilním prostředí připitepovány 4 μ l kanamycinu (ředění 1000x). Poté došlo k inokulaci malého objemu jednou kolonií buněk, inkubaci při 37°C a třepání při 180 otáčkách za minutu („rpm“) po dobu cca 16 hodin spolu s velkým objemem, ke kterému bylo přidáno 200 μ l kanamycinu. Další den byl malý objem ochlazen na 4°C, aby došlo k zastavení dalšího růstu kultury. K velkému objemu s kanamycinem se přidal malý objem a došlo k inkubaci při 37°C/180 rpm po dobu asi 90 minut, tj. do OD₆₀₀ = 0.6 – 0.8. Po dosažení této hodnoty byla přidáním 200 μ L IPTG o koncentraci 100 mg/ml indukována exprese proteinu s následnou kultivací při 17°C/180 rpm po dobu 24 hodin.

3.2.3 Purifikace rekombinantní C45 kličky

Purifikace rekombinantní C45 kličky probíhala tak, že nejprve byla kultura s nadprodukováným proteinem (C45 kličkou Na⁺/K⁺-ATPasy) centrifugována při 5000g/25 minut/4°C. Supernatant byl poté odlit a sediment rozsuspendován v 10 ml sonikačního pufru (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 8.8) s inhibitory (15 mg lysozymu, 26 mg PMSF, 10 μ l leupeptinu (výchozí koncentrace 2 mg/ml), 4 μ l pepstatinu, 10 μ l DTT (zásobní roztok 1 M) – 0.1543g do 1ml a 10 μ l EDTA (zásobní roztok 1 mM), to vše v 10 ml sonikačního pufru). Buňky byly následně

rozbity pomocí sonikátoru. Ocelová sonda sonikátoru byla před použitím opláchnuta ethanolem a destilovanou vodou a buňky byly rozbíjeny 5 minut - 20 sekund zapnuto/ 20 sekund vypnuto. Po rozbití buněk byla sonda opět opláchnuta ethanolem a destilovanou vodou. Hrubý extrakt byl po celou dobu udržován na ledu. Hrubý extrakt se následně centrifugoval při 15000g/25 minut/4°C. Po centrifugaci obsahoval supernatant neboli sonikát (cytosol; tzv. rozpustná fáze) požadovaný rekombinantní protein. Pro následnou elektroforézu se odebralo do mikrozkušavek cca 10-20 µl sonikátu a dále co nejvíce sedimentu (pro určení, zda není určité množství proteinu ještě zde) a zbytek sonikátu (cca 10 ml) se nanasle na afinitní kobaltovou kolonu („Co(II)-Sephrose“) (před jejímž použitím se z ní odpustí konzervační 20% etanol a promývá se 200 ml dialyzačního pufru, tj. 20mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 8) a nechal 60 minut inkubovat při 4°C při občasném promíchání náplně kolony Pasteurovou pipetou. Poté byla kolona vypuštěna a promyta 40 ml promývacího pufru (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7.6) pro odstranění nečistot. Čistý protein byl přes histidinovou kotvu vázan na afinitní kolonu. Z kolony byl protein získán přidáním 3 x 2 ml elučního pufru (0.5 M imidazol, pH 8.5 - nastaveno NaOH/HCl) – inkubace s každými 2 ml probíhala 30 minut. Byly získány 3 eluce proteinu o postupně snižující se koncentraci, která byla následně stanovena třemi způsoby.

Kolona byla pro opětovné uskladnění promyta 200 ml regeneračního pufru (20 mM MES, pH 5 - nastaveno NaOH/HCl) a 10 ml destilované vody. Následně byl přidán 20% etanol pro zakonzervování a kolona byla umístěna do lednice (4°C).

Eluce 1, 2 a 3 byly následně zdialyzovány ve 2 litrech dialyzačního pufru (20mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 8 – stejný pufr jako u promývání kolony) přes noc (po hodině výměna prvního litru pufru za druhý a dialýza přes noc) a uskladněny při -20°C. Z každé z těchto tří elucí jsme ponechali 30 µl bez dialýzy pro následnou elektroforézu - tyto frakce rovněž skladovány při -20°C.

3.2.4 Stanovení koncentrace rekombinantní C45 klíčky

Koncentrace proteinu se měřila u eluce 1, 2 a 3 po dialýze a tyto vzorky se použily při dalších experimentech. K měření koncentrace proteinu jsme použili tři metod: 1) metodu dle Bradfordové, 2) metodu s kyselinou bicinchoninovou a 3) metodu přímého měření koncentrace proteinu z absorpce při 280 nm na přístroji BioSpec-nano (Schimadzu Biotec; jde o tzv. Edelhochovu metodu).

3.2.4.1 Metoda dle Bradfordové

Principem stanovení koncentrace proteinu je posunutí absorpčního maxima ze 465 nm na 595 nm při vazbě Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Vzorek obsahoval: 1350 µl reakčního činidla, 15 µl proteinu a 135 µl destilované vody. Blank obsahoval: 1350 µl reakčního činidla, a

150 μ l destilované vody. Koncentrace proteinu byla stanovena z kalibrační křivky, která byla připravena ve dvou opakováních (jako standard byl použit BSA o koncentraci 1 mg/ml).

3.2.4.2 Bicinchoninová metoda

Při této metoda dochází při interakci proteinu s roztokem BCA činidla k vytvoření zeleného roztoku s absorbcí při 562 nm. Vzorek obsahoval 2 ml činidla a 5 μ l proteinu. Jako blank sloužily 2 ml činidla. Koncentrace proteinu se určila podle kalibrační křivky, připravené ve dvou opakováních (jako standard byl použit BSA o koncentraci 1 mg/ml).

3.2.4.3 Měření na přístroji Shimadzu

Principem metody je proměření kapky proteinu (4 μ l pro optickou dráhu 0.7 mm) při 280 nm. Musíme znát molární absorpční koeficient proteinu při 280 nm (ϵ_{280}), který se určuje z obsahu tryptofanu, tyrosinu a cysteinu v aminokyselinové sekvenci. Vychází se z tzv. Edelhochovy metody: $\epsilon_{280} = n_{\text{Trp}} \cdot 5500 + n_{\text{Tyr}} \cdot 1490 + n_{\text{Cys}} \cdot 125$ ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), kde „n“ je počet aminokyselinových zbytků (Edelhoc, 1967).

3.2.5 SDS – PAGE vyizolovaného proteinu

Pro nanášení na gel bylo potřeba připravit vzorky následujícím způsobem. Do mikrozkušavek se nejdříve napipetovalo vždy 5 μ l vzorkového pufru – „SDS sample buffer“ (Na 1 litr – 135 ml 1 M Tris-HCl, pH = 8.0, 150 ml glycerolu, 22 ml 2-merkapt ethanolu, 720 ml destilované vody a 30 g SDS), poté se přidalo 10 μ l vzorku (eluce 1, 2 a 3 před a po dialýze, sonikát, pelet a marker), směs se 5 minut vařila při 100°C, centrifugovala po dobu 2 minut na stolní centrifuze při 2000g a nakonec byly přidány 3 μ l barvicí směsi (bromfenolové modři o koncentraci 1 mg/ml). Po promíchání byly vzorky připraveny k nanášení na gel.

Samotná elektroforéza byla provedena následně. Nejprve byla připravena skla s 1 mm vymezovači pro tuhnutí gelu. Skla byla před použitím odmaštěna ethanolem.

Dále bylo připraveno 10 ml roztoku pro 10% rozdělovací gel (2.5 ml 30% akrylamidu/0.8% N,N'-metylenbisakrylamidu, 2.5 ml koncentrovaného pufru pro rozdělovací gel (1.5 M Tris-HCl, 0.4 % w/v SDS, pH 8.8), 4.95 ml destilované H₂O, 15 mg Na₂SO₃, 9,75 μ l TEMED a 25 μ l APS o koncentraci 100 mg/ml).

Roztok pro rozdělovací gel se napipetoval mezi skla, převrstil isobutanolem a nechal zhruba 1 hodinu polymerovat při laboratorní teplotě.

Dále bylo připraveno 10 ml roztoku pro 4% zaostřovací gel (1 ml 30% akrylamidu/0.8% N,N'-metylenbisakrylamidu, 2.5 ml koncentrovaného pufru pro zaostřovací gel (0.5 M Tris-HCl, 0.4 % w/v SDS, pH 6.8), 6.5 ml destilované H₂O, 15 mg Na₂SO₃, 19.5 μ l TEMED a 50 μ l APS o koncentraci 100 mg/ml).

- TEMED a APS se přidávají vždy až nakonec, jelikož gel po jejich přidání začne polymerovat a tuhnout
- APS se připravuje pro elektroforézu vždy čerstvý

Po zatuhnutí rozdělovacího gelu se odlil isobutanol a nad něj napipetoval zaostřovací gel, vložil se hřebínek pro vytvoření jamek na vzorek a gel se nechal opět cca 1 hodinu tuhnout při laboratorní teplotě.

Gel se vložil do aparatury sestavené ze soupravy pro elektroforézu (Mini Protean Cell firmy Bio-rad (USA)) a aparatura byla naplněna elektrodoým pufr (na 1 litr pufru – 3 g Tris, 14.4 g glycinu a 1 g SDS, bez úpravy pH). Elektrodoý pufr se lil jednak do samotné cely aparatury, tak do prostoru mezi skla obsahující gel a plastovou náhradu (jelikož se dělal pouze jeden gel). Po odstranění hřebínku se do jamek napipetovaly vzorky. Následně byla aparatura připojena ke zdroji napětí, na kterém se nastavilo napětí 180 V a elektroforéza se nechala běžet po doputování bromfenolové modři ke spodnímu okraji gelu (přibližně 1 hodina).

Po elektroforéze byl gely promyty v destilované vodě, následně se 20 minut barvily v barvicím roztoku (Coomassie brilliant blue R-250). Po 20 minutách byl barvicí roztok vyměněn za roztok odbarvovací (10% kyselina octová) a gely se nechaly přes noc odbarvovat.

K elektroforéze byly jako vzorky použity eluce 1, 2 a 3 před dialýzou a po dialýze, sonikát a sediment. Gel z této elektroforézy byl naskenován a dále využit.

3.2.6 SDS – PAGE ostatních vzorků

Samotná elektroforéza byla prováděna v aparatuře Mini Protean Cell firmy Bio-Rad (USA), a to následujícím způsobem: nejprve byla připravena skla s 0.75 mm vymezoači, která byla vyčištěna pomocí isopropylalkoholu a umístěna do stojánků. Mezi skla byl nejprve napipetován roztok pro 10%T rozdělování gel (3.4 ml akrylamidu/bis-akrylamidu, 2.5 ml SDS-PAGE 4x dělicí gelový pufr, 3.8 ml destilované H₂O, 100 µl 10% SDS, 15 µl TEMED a 50 µl APS). Gel byl poté převrstven *n*-butanolem a nechán cca 45 minut tuhnout. Poté byl *n*-butanol odlit a mezi skla byl napipetován roztok pro 4%T zaostřovací gel (0.65 ml akrylamidu/bis-akrylamidu, 1.25 ml SDS-PAGE 4x zaostřovací gelový pufr, 2.95 ml destilované H₂O, 100 µl 10% SDS, 15 µl TEMED a 60 µl APS), do gelu byly vloženy hřebínky pro vytvoření jamek pro vzorky a takto byl nechán gel opět cca 45 minut ponechán tuhnout. Po ztuhnutí byly gely vloženy do aparatury, aparatura a prostor mezi skly byl zalit elektrodoým pufr (0.025 M TRIS, 0.192 M Glycin, 0.1% w/v SDS, pH 8.3).

Z gelů byly vytaženy hřebínky a do jamek byly napipetovány příslušné vzorky.

3.2.6.1 SDS-PAGE proteinu zdialyzovaného v MES pufru po interakci s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou

Tato elektroforéza se prováděla z důvodu určení vazebného místa cisplatinu s proteinem.

Studium interakce cytoplazmatické C45 kličky Na^+/K^+ -ATPasy s cisplatinou bylo provedeno pomocí metody jednorozměrné SDS-PAGE s následnou analýzou peptidových spekter na MALDI-TOF MS.

Nejprve byla připravena aktivovaná a neaktivovaná cisplatina. Neaktivovaná cisplatina se připravovala jako roztok práškové cisplatinu v destilované vodě. Aktivovaná pak smícháním vodného roztoku cisplatinu s vodným roztokem AgNO_3 v molárním poměru 1:2 (cisplatina: AgNO_3). Po smíchání interagovala cisplatina s AgNO_3 po dobu 24 hodin ve tmě a po této době byla směs centrifugována 10 minut při 5000g a roztok s aktivovanou cisplatinou byl odpipetován od sedimentu, tvořeného sraženinou AgCl . Aktivovaná i neaktivovaná cisplatina byly poté smíchány s proteinem po dialýze v MES pufru, a to v molárním poměru 20:1 (nadbytek cisplatinu). Takto smíchané vzorky byly pak zpracovány dvěma způsoby.

Jednak byl k proteinu s cisplatinou před samotnou elektroforézou přidán pouze Laemmliho pufr (v objemovém poměru 1:1) a za druhé byla ještě před elektroforézou provedena redukce vzorků pomocí DTT a jejich alkylace pomocí IAA, které se provádí běžně až při metodě štěpení proteinu v gelu. Po zredukování a zalkylování byl přidán Laemmliho pufr. K proteinovému vzorku byl přidán stejný objem 10 mM DTT v 0.1 M NH_4HCO_3 s následnou inkubací po dobu 20 minut a 60°C , po vychlazení se přidalo 2/5 objemové množství (oproti proteinu) 55 mM IAA v 0.1 M NH_4HCO_3 s 20ti minutovou inkubací ve tmě, pak ještě stejné 2/5 objemové množství (oproti proteinu) roztoku DTT, nakonec se přidal Laemmliho pufr (stejný objem jako vzorek s IAA a DTT) a vzorky se 5 minut povařily při 100°C . K dispozici byly 4 různé vzorky připravené k elektroforéze.

Po napipetování vzorků se aparatura připojila ke zdroji napětí. Napětí bylo nastaveno nejprve na 100 V a po 10 minutách zvýšeno na 150 V. Po doputování bromfenolové modři ke spodnímu okraji gelu (cca 1 hodina) se aparatura odpojila od zdroje napětí, gely byly vyjmuty, promyty ve vodě a barveny přes noc v obarvovacím roztoku (Bio-Safe CBB R-250 staining). Druhý den byly odbarveny v destilované vodě po dobu 15 minut. Takto byly gely připraveny k dalšímu zpracování.

Za druhé se připravily roztoky aktivované a neaktivované cisplatinu ve vodě, byly smíchány s proteinem v molárním poměru 20:1 a směsi se nechaly reagovat 6-12 hodin pro optimální interakci proteinu s cisplatinou. Poté byly roztoky rozděleny na dva stejné díly a ke každému bylo přidáno poloviční množství (oproti proteinu) Laemmliho pufru s obsahem DTT pro redukci a vzorky se 5 minut vařily při 100°C . Následně byla k prvnímu vzorku přidána destilovaná voda (stejný objem jako protein) a druhému 1 M IAA (stejný objem jako protein) a

oba se vzorky se inkubovaly po dobu 30 minut ve tmě. Takto byly vzorky připraveny pro SDS-PAGE.

Peptidy z gelových kousků po provedení elektroforézy těmito dvěma způsoby byly zpracovány extrakcí a metodou zip/tip. Peptidy po provedení druhého způsobu elektroforézy byly odeslány na MS/MS analýzu do Hradce Králové.

3.2.6.2 SDS-PAGE elektroforéza proteinu s NEM činidlem

Protein byl nejprve namíchán s činidlem N-ethylmaleimidem (NEM) (molární poměr NEM:proteinu 11.676:1) a následně zdialyzován v 50 mM NH_4HCO_3 pufru (Po dvou hodinách vyměněn pufr za čerstvý s následnou dialýzou přes noc). Po dialýze byl protein smíchán v molárním poměru 1:20 s cisplatinou a pro nanášení na elektroforézu byl vzorek byl namíchán 1:1 (v/v) s Laemmliho pufrém, 5 minut povařen při 100°C a po ochlazení byl nanesen na gel.

3.2.7 Štěpení proteinu v gelu

Metoda štěpení proteinu v gelu („*in-gel* digestion“) se používala pro identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie peptidů a pro posouzení míry modifikace proteinu vlivem reakce s cisplatinou a dalšími látkami.

Z gelu, který byl po elektroforéze promyt inkubací v destilované vodě na třepačce pro maximální odsolení, byly vždy nejprve vyřezány příslušné obarvené proteinové pásy skalpelem. Proužky gelu se následně vložily do mikrozkušavek a skalpelem nařezaly na kousky o objemu 1 cm^3 . Následně byly vzorky centrifugovány na stolní centrifuze po dobu 2 minut při 2000g pro usazení gelových kousků na dno mikrozkušavek. Gelové kousky byly poté odbarvovány po dobu cca 45 minut odbarvovacím roztokem (170 μl 100 mM NH_4HCO_3 + 170 μl acetonitril – přičemž se jako první ke vzorkům připipetovává NH_4HCO_3 , aby nedošlo k vysušení gelových kousků acetonitrem). Po přidání odbarvovacího roztoku byl obsah mikrozkušavek protřepán na vortexu.

Po odbarvení gelových kousků byl odbarvovací roztok odpipetován a nahrazen 170 μl acetonitrilu a mikrozkušavky byly opět promíchány na vortexu. Gelové kousky byly v acetonitrilu takto ponechány po dobu 10 – 15 minut pro vysušení (změní se jejich objem a zbledají).

Následně byly vzorky centrifugovány na stolní centrifuze při 2000g po dobu 1 minuty a acetonitril odpipetován. Gelové kousky se ponechaly cca 10 minut oschnout na vzduchu.

Poté se ke gelovým kouskům přidal 10 mM DTT v 0.1 M NH_4HCO_3 a směs se nechala inkubovat při 56°C po dobu 30 minut pro redukci proteinu. Po 30 minutách byly gelové kousky opět centrifugovány na stolní centrifuze 1 minutu při 2000g a DTT odpipetován. Následně se gelové kousky vysušily přidáním 170 μl acetonitrilu.

Poté byl acetonitril nahrazen 55 mM jodoacetamidem v 0.1 M NH_4HCO_3 a směs byla inkubována po dobu 20 minut při laboratorní teplotě ve tmě.

Po 20 minutách byl všechen IAA odpipetován, gelové kousky byly 2x propláchnuty ve 150 μl 0.1 M NH_4HCO_3 . Po propláchnutí byly vzorky zcentrifugovány na stolní centrifuze a NH_4HCO_3 byl odpipetován. Pak byl přidán acetonitril a gelové kousky vysušeny při laboratorní teplotě přes noc.

Druhý den se acetonitril odstranil a vzorky se nechaly po dobu 10 minut oschnout. Poté se k nim přidalo 50 μl pufru s trypsinem (na 1 ml 50 mM NH_4HCO_3 přidáno 10 μl 200 μM modifikovaného trypsinu). Při 4°C se nechal po dobu cca 90 minut pufr s trypsinem absorbovat do gelových kousků. Posledním krokem je výměna pufru s trypsinem za čistý pufr bez trypsinu (25 mM NH_4HCO_3) v objemu 40 μl . V tomto pufru se při 37°C nechaly gelové kousky inkubovat přes noc pro naštipání proteinu na peptidy. Druhý den se vzorky centrifugovaly na stolní centrifuze a supernatant byl připraven pro analýzu na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru.

3.2.8 Extrakce peptidů z gelových kousků

Daší metodou, která byla využita při experimentech byla extrakce peptidů z gelových kousků. Z mikrozkušavek s gelovými kousky po štěpení proteinů v gelu se po centrifugaci odpipetovalo 5 μl supernatantu pro analýzu na přístroji MALDI-TOF. Zbytek vzorků byl připraven pro extrakci peptidů z gelových kousků. K těmto vzorkům bylo přidáno vždy 10 μl 25 mM NH_4HCO_3 a následovala inkubace při 37°C po dobu 15 minut a třepání při 300 rpm. Vzorky se poté zcentrifugovaly na stolní centrifuze při 2000g po dobu 1 minuty přidalo se k nim 10 μl acetonitrilu s následnou inkubací při 37°C po dobu 15 minut.

Po 15 minutách se vzorky opět zcentrifugovaly a supernatanty se přepipetovaly do čistých mikrozkušavek..

Ke gelovým kouskům se přidalo 40-50 μl 5% kyseliny mravenčí a následovala opět inkubace při 37°C po dobu 15 minut. Vzorky se zcentrifugovaly na stolní centrifuze a přidalo se k nim 10 μl acetonitrilu a následovala opět inkubace při 37°C po dobu 15 minut při třepání. Vzorky se zcentrifugovaly a supernatanty (extrakty) byly přidány k prvním supernatantům (extraktům).

Spojené extrakty se následně odpařily na vakuové odparce. Odparky se rozpustily v 10 μl 0.1% TFA a takto byly připraveny pro analýzu na MALDI-TOF.

3.2.9 Metoda zip/tip

Vzorky rozpuštěné v 0.1% TFA se mohou zpracovat před samotnou analýzou metodou zip/tip. Pro zip/tip metodu bylo potřeba si připravit tzv. zvlhčovací, ekvilibrační a eluční roztoky. Do

0.5 ml mikrozkušavek se napipetovalo vždy 10 µl elučního roztoku. Do 1.5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 400 µl zvlhčovacího roztoku a do druhé 1.5 ml mikrozkušavky 150 µl ekvilibračního roztoku, který se pro každý vzorek následně musí měnit. Na 10 µl automatickou pipetu se nasadila speciální zip/tip špička s C18 náplní a propláchla se 2x zvlhčovacím roztokem a 2x ekvilibračním roztokem (při vytahování špičky s roztoku se do ní nesmí nasát vzduch). Poté se na C18 špičku nanese vzorek tak, že se špička 10x propláchla ve vzorku. Následně se špička propláchla 5x v ekvilibračním roztoku a vzorek ze špičky se vypláchl v 10 µl elučního pufru v předpřipravené 0.5 ml mikrozkušavce. Takto byly vzorky připraveny pro analýzu na MALDI-TOF (0.6 µl vzorku + 0.6 µl matrice).

3.2.10 MALDI-TOF MS – peptidové mapování

3.2.10.1 MALDI-TOF vzorků z gelů po elektroforéze čistého vyizolovaného proteinu

Nejprve byly pomocí MALDI-TOF stanoveny nečistoty ve vyizolovaném proteinu a to následujícím způsobem. Z gelu po elektroforéze čistého vyizolovaného proteinu byly metodou štěpení proteinu v gelu zpracovány pásy odpovídající eluci 1, 2 a 3 po dialýze v Tris pufru. Na destičku AnChor Chip s 96 pozicemi bylo nakapáno vždy 0.6 µl vzorku či standardu a to tak, aby vzorky byly kolem standardu, na který se přístroj kalibroval co nejbližší a do daného vzorku či standardu bylo připipetováno 0.6 µl matrice pro zkrystavání vzorku. Destička s krystaly vzorků byla umístěna do iontového zdroje přístroje a byla naměřena spektra pro jednotlivé vzorky, která byla softwarově vyhodnocena.

3.2.10.2 MALDI-TOF vzorků z elektroforézy proteinu v MES pufru po reakci s cisplatinou

Po provedení elektroforézy prvním způsobem i druhým způsobem (s extrakcí a zip/tip) metodou byly vzorky naneseny na destičku a analyzovány. Nanášelo se 0.6 µl standardu a vzorku a 0.6 µl matrice CHCA. Po zkrystalování vzorků byla proměřena peptidová spektra.

3.2.10.3 MALDI-TOF proteinu po reakci s NEM činidlem

Proteinové pásy byly z gelů vyřezány a zpracovány metodou štěpení proteinu v gelu. Po naštipání s trypsinem byly naneseny na destičku. Nanášelo se 0.6 µl vzorku respektive standardu a 0.6 µl matrice CHCA. Po zkrystalování byla naměřena spektra.

3.2.11 MALDI-TOF MS – měření intaktní hmoty

3.2.11.1 MALDI-TOF C45 kličky

Nejčistší eluce byla dále zpracována tak, že byla zdialyzována v nových pufrech, kompatibilních s hmotnostní spektrometrií. Tyto pufrы byly 50 mM octan amonný, pH 6 a 20 mM MES + 50 mM NaCl, pH 6.

Protein (C45 klička) zdialyzovaný v octanu amonném byl použit pro měření intaktní hmoty za použití kyseliny sinapové jak matrice. Tento protein byl smíchán v molárním poměru 1:20 s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou pro analýzu interakce s proteinem. Protein s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou byl inkubován 6 hodin pro vzájemnou interakci. Kyselina sinapová byla připravena čerstvá v koncentraci 10 mg/ml v roztoku acetonitril/0.1% TFA 1:2 v/v. Jako standard byl použit roztok BSA ve vodě v koncentraci 10 mg/ml. Na destičku se nanášelo po 1 ul standardu a vzorku a 1 ul matrice. Po zkrystalování vzorků byla provedena analýza a získána spektra.

3.2.11.2 MALDI-TOF ubikvitinu

K interakci s ubikvitinem byla použita opět aktivovaná i neaktivovaná cisplatina. Neaktivovaná i aktivovaná cisplatina byla připravená čerstvá, ale použita byla pro zkoušku i zhruba měsíc skladovaná aktivovaná cisplatina, která byla po tuto dobu umístěna v lednici při 4 °C. Nejdříve byl namíchán ubikvitin s neaktivovanou cisplatinou (poměr molárně 1:10 při nadbytku ubikvitinu) a vzorek byl rozdělen na dvě poloviny. První polovina se inkubovala 24 hodin při 37 °C a druhá stejný čas při pokojové teplotě. Také byla připravena aktivovaná cisplatina (cisPt:AgNO₃ = 1:2, interakce přes noc), která byla smíchána druhý den s ubikvitinem. S ubikvitinem byla také smíchána skladovaná aktivovaná cisplatina (obojí v poměru 1:10). Reakce aktivované cisplatinы s ubikvitinem byla prováděna po dobu 6 hodin. Vzorky byly naneseny na MALDI destičku a byla proměřena spektra.

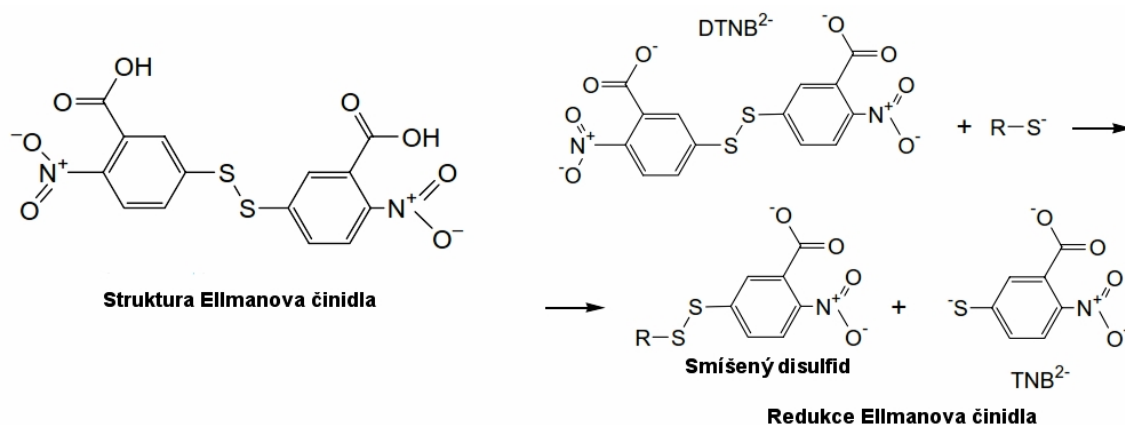
3.2.11.3 MALDI-TOF myoglobinu a cytochromu c

Roztoky myoglobinu a cytochromu *c* byly v molárním poměru 1:10 smíchány s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou a nechány přes noc při laboratorní teplotě pro vzájemnou interakci. Poté byly tyto vzorky zpracovány na MALDI-TOF MS. Na destičku bylo nakapáno vždy po 1 ul vzorku či standardu a 1 ul matrice. Jako matrice byla použita kyselina sinapová v koncentraci 10 mg/ml v roztoku ACN/0.1% TFA. Po vytvoření krystalků byla naměřena spektra.

3.2.12 Stanovení –SH skupin v proteinu

3.2.12.1 Teorie

Sulfhydrylové skupiny jsou pravděpodobně nejreaktivnější postranní skupiny běžně se nacházející v proteinech, a jako takové, propůjčovaly samy sebe v časném stupni vývoje reagentů pro jejich specifické modifikace. Existuje několik kolorimetrických metod pro stanovení počtu thiolových skupin v proteinu založených na relativní snadnosti, se kterou jsou oxidovány. Asi nejznámější je metoda využívající 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou kyselinu) (DTNB), která se běžně nazývá také Ellmanovo činidlo (Ellman, 1959). Výrazně barevný thionitrobenzoátový anion uvolňující se s každou zreagovanou thiolovou skupinou proteinu (viz obr.16) může být určen z absorpance při 412 nm ($\epsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ při pH 8). Ellmanovo činidlo může být také použito pro kvantifikaci sulfanu roztoku, ovšem z jednoho molu sulfanu a 1 molu DTNB se vytvoří 2 moly thionitrobenzoátového anionu a 1 mol elementární síry (Nashef et al., 1977).



Obrázek 16 – Reakce –SH skupiny proteinu s DTNB (Převzato z protokolu stanovení SH skupin firmy Pierce Biotechnology, Inc., USA; upraveno).

3.2.12.2 Stanovení -SH skupin v cytoplazmatické kličce C45 Na^+/K^+ -ATPasy

Při stanovování počtu -SH skupin v proteinu bylo použito upraveného protokolu firmy Interchim (Francie).

3.2.12.3 Příprava materiálu

Jako reakční pufr byl připraven 30 mM Tris + 3 mM EDTA + 1% SDS. Ellmanovo činidlo bylo připraveno rozpuštěním 4 mg práškového Ellmanova činidla v 1 ml reakčního pufru. Jako standardu bylo použito *L*-cystein hydrochlorid monohydrátu o molekulové hmotnosti 175.6 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Kalibrační řada byla připravena za použití reakčního pufru v koncentracích 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 a 7.8125 μM

3.2.12.4 Postup

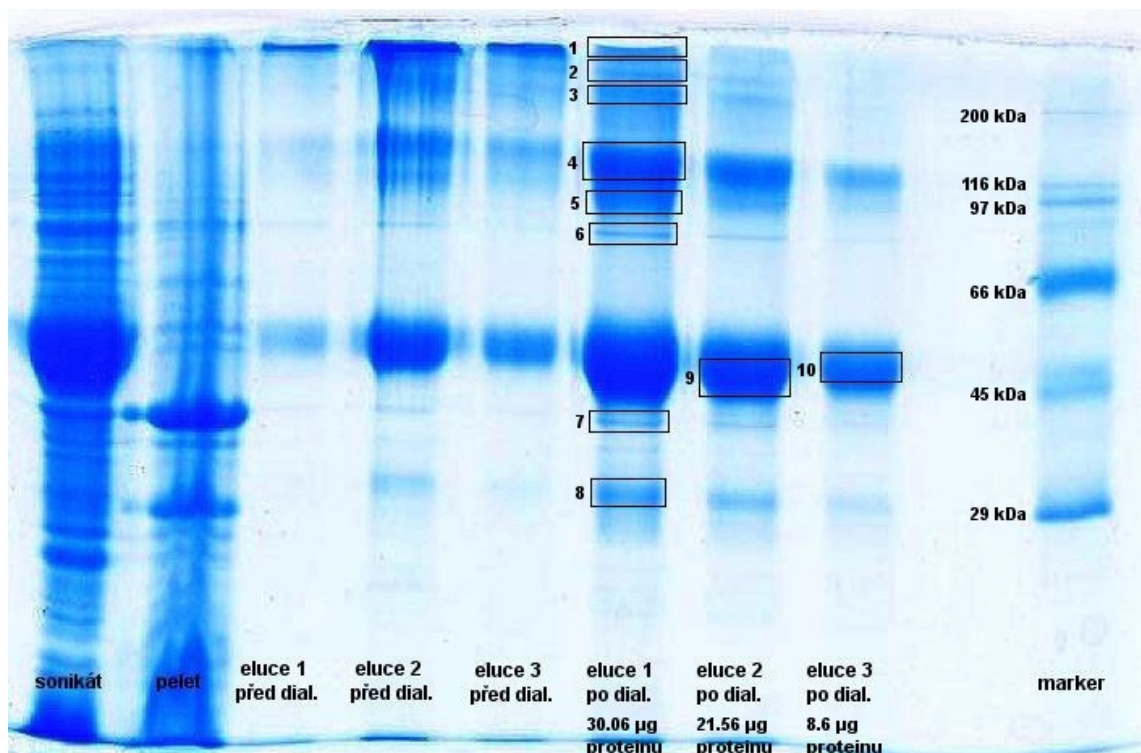
Připravila se sada zkumavek. Do každé se napipetovalo 50 μ l Ellmanova činidla a 2.5 ml reakčního pufru. Poté se přidalo 250 μ l standardu, vzorku (ATPasy a ATPasy s cisplatinou, které byly do 250 μ l naředěny 5x a 12.5x v tomto pořadí, aby koncentrace sulfhydrylových skupin byla ve 250 μ l v rozsahu standardní kalibrační křivky) nebo reakčního pufru (blank). Vzorky byly promíchány na vortexu a ponechány 15 minut při laboratorní teplotě. Poté se proměřila absorbance při 412 nm.

4 Výsledky

4.1 Kontrola čistoty připraveného proteinu SDS-PAGE

4.1.1 Vyřezání a zpracování gelových pásů

Po vyzolování proteinu bylo potřeba určit čistotu získaného proteinu v elucích po dialýze, které se dále zpracovávaly. Eluce 1, 2 a 3 po dialýze byly získány v koncentraci 3.06, 2.15 a 0.85 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, v tomto pořadí. Na gel se nanášelo 18 μl vzorku (10 μl proteinu, 3 μl bromfenolové modři a 5 μl vzorkového pufru), z čehož vyplývá, že v jamkách bylo 30.6, 21.5 a 8.5 μg pro eluci 1, 2 a 3 v tomto pořadí. Byly vyřezány proteinové pásy – 8 pásů ze sloupce pro eluci 1 a po jednom pro eluci 2 a 3 po dialýze (viz černé rámečky v obr.17).



Obrázek 17 – Gel po elektroforéze vyzolovaného proteinu. Černými rámečky jsou znázorněny proteinové pásy, které byly vyřezány a zpracovány štěpením proteinů v gelu.

Vyřezané pásy obsahovaly proteinový vzorek. Po provedení štěpení proteinu v gelu byly získány peptidy a následně byla naměřena odpovídající peptidová spektra. Soubor peptidů sloužil pro porovnání se souborem teoretických peptidů, k čemuž se využilo peptidového mapování. Na základě porovnání bylo zjištěno do jaké míry byl protein znečištěn.

4.1.2 Výsledky stanovení nečistot v elucích 1, 2 a 3 po dialýze

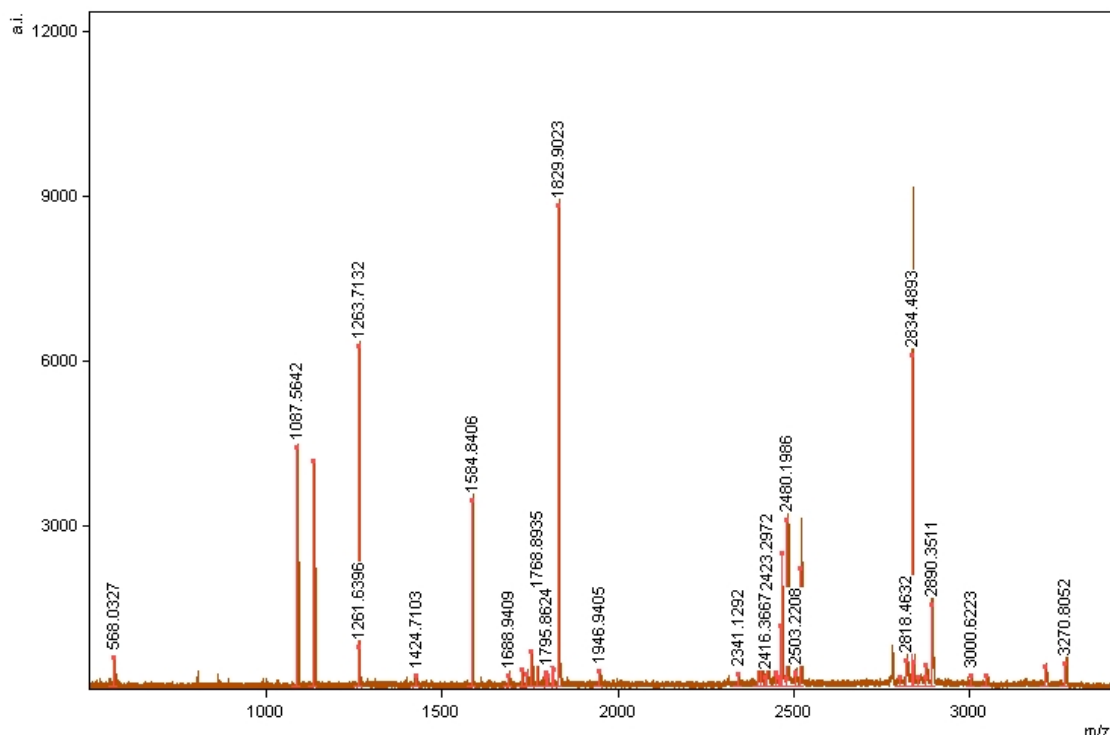
Podle obrázku 17 byly vyřezány proteinové pásy (označené rámečky) a ty byly zpracovány štěpením v gelu. Získané peptidy byly porovnány pomocí peptidového mapování s teoretickými peptidy (peptidy byly modifikovány fixní karbamidomethylací cysteinů a variabilní oxidací methioninů) a takto byly získány informace o znečištění jednotlivých vyznačených proteinových pásů.

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky z peptidového mapování a na obrázku 18 příklad získaného spektra (pro pás vyřezaný pro eluci 3), u kterého byl vytvořen list píků porovnávaný s teoretickými peptidy.

Tabulka 3 – Stanovení nečistot v jednotlivých pásech pomocí peptidového mapování na MALDI-TOF.

Pás	Protein	Přístupové číslo (Accession number)	Molekulová hmotnost (Da)	Hodnota skóre (%)	Celkem peptidů / určené peptidy	Pokrytí sekvence (%)
1	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa – α ₁	AT1A1_MOUSE	114221	109	28/13	17
2	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa – α ₁	AT1A1_MOUSE	114221	104	35/14	17
3	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa – α ₁	AT1A1_MOUSE	114221	127	32/16	18
4	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa – α ₁	AT1A1_MOUSE	114221	109	43/14	19
5	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa – α ₁	AT1A1_MOUSE	114221	80	41/12	15
6	Hainantoxin-IX-6	H9F01_HAPHA	10004	42	45/4	46
7	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa – α ₁	AT1A1_MOUSE	114221	47	29/7	10
8	podjednotka Imidazol- glycerolfosfátsynthasy	HIS6_NITMS	29081	55	23/5	30
9	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa – α ₁	AT1A1_MOUSE	114221	87	57/17	19
10	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa – α ₁	AT1A1_MOUSE	114221	113	52/16	19

Pro vyhledávání byly použity peptidy v celém rozsahu *m/z* při nastavení maximální počtu chybných štěpení 1, štěpení trypsinem, chyba 0.2 Da, fixní karbamidomethylace a variabilní modifikace v podobě oxidace methioninu a byla použita databáze Swissprot.



Obrázek 18 – Příklad peptidového spektra – eluce 3 po dialýze. Rozsah m/z = 0-3400.

4.2 Ubikvitin, myoglobin a cytochrom *c*

V literatuře je možné najít mnoho článků týkajících se interakce cisplatiny s různými proteiny. V experimentech byla sledována interakce cisplatiny s ubikvitinem, myoglobinem a cytochromem *c*.

4.2.1 Výsledky interakce ubikvitinu s cisplatinou

Ubikvitin již byl, respektive je studován výhradně v interakci s antineoplastickými platinovými komplexy CDDP, TDDP a asymetrickými *trans*-Pt komplexy (Gibson & Costello, 1999; Peleg-Shulman & Gibson, 2001; Peleg-Shulman et al., 2002; Najajreh et al., 2003; Balter & Gibson, 2005; Najajreh et al., 2006). Ubikvitin je malý protein složený ze 76 aminokyselin s molekulovou hmotností $8565 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Kirkpatrick et al., 2005). V našich experimentech byla sledována pouze interakce cisplatiny s tímto proteinem. Podle článku Hartinger et al. 2007 je známo, že cisplatin tvoří s ubikvitinem mono- a bis-adykty různých typů.

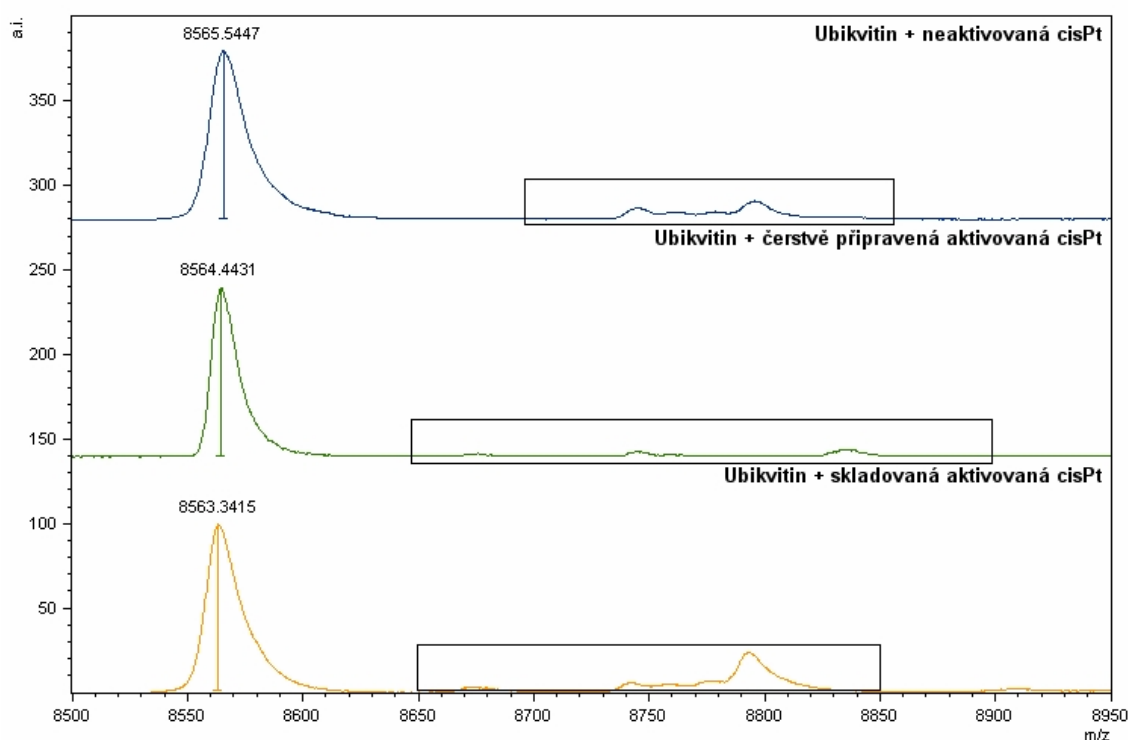
V experimentu tedy byly hledány adukty ubikvitinu s cisplatinou v oblasti m/z okolo 9000. Tabulka 4 znázorňuje možné adukty ubikvitinu s cisplatinou.

Tabulka 4 – Možné adukty cisplatiny s ubikvitinem s přidělenými molekulovými hmotnostmi (Hartinger et al., 2007; upraveno).

Molekulová hm. (Da)	Ub-Pt adukty
8566	Ub
8775	Ub-[Pt(NH ₃)]
8792	Ub-[Pt(NH ₃) ₂]
8811	Ub-[Pt(NH ₃) ₂ (H ₂ O)]
8828	Ub-[Pt(NH ₃) ₂ Cl]
9002	Ub-[Pt(NH ₃) ₂ + Pt(NH ₃)]
9019	Ub-[Pt(NH ₃) ₂] ₂
9037	Ub-[Pt(NH ₃) ₂ + Pt(NH ₃) ₂ (H ₂ O)]
9055	Ub-[Pt(NH ₃) ₂ (H ₂ O)] ₂ or Ub-[Pt(NH ₃) ₂ Cl + Pt(NH ₃) ₂]

4.2.1.1 Reakce ubikvitinu s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou

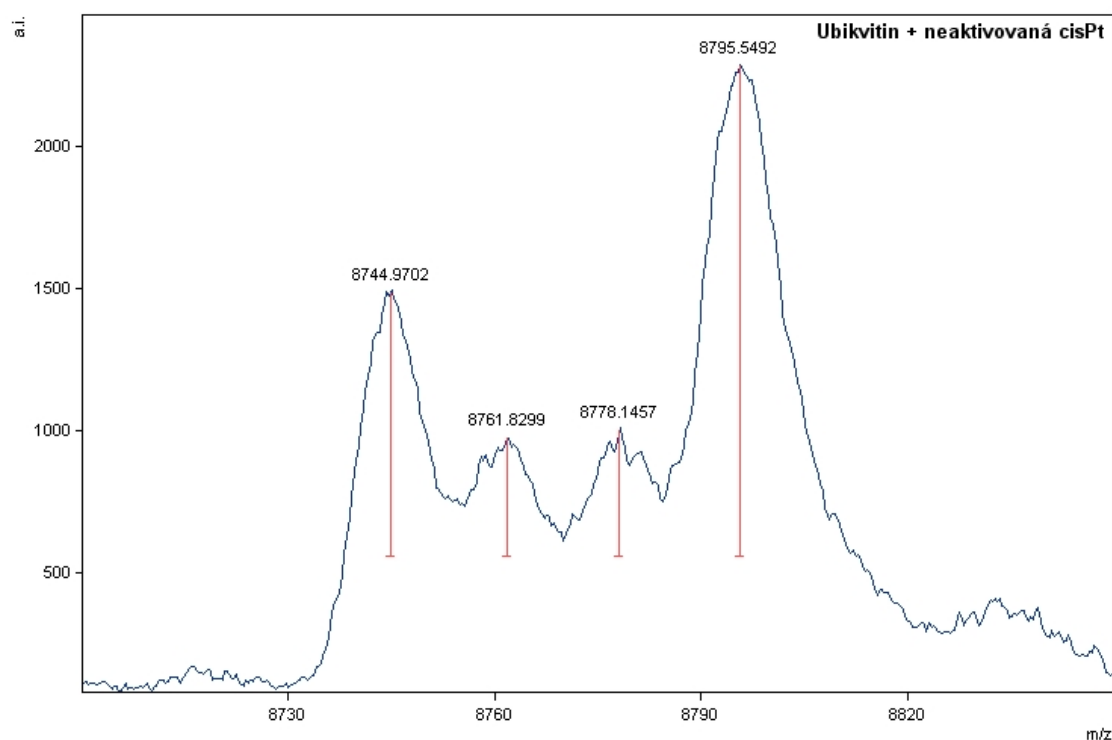
Protein ubikvitin byl smíchán s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou v molárním poměru 1:10 (nadbytek cisplatiny) a byla sledována vzájemná interkace. Na obrázku 19 můžeme vidět spektra pro reakci ubikvitinu s neaktivovanou cisPt (24 hodin, 37°C) a s aktivovanou cisplatinou (čerstvě připravenou a skladovanou).



Obrázek 19 – Spektra po interakci ubikvitinu s neaktivovanou a aktivovanou cisplatinou. Rozmezí m/z = 8500 – 8950.

U všech tří spekter vidíme zřetelný pík odpovídající ubikvitinu (m/z = 8565.5447 pro horní, 8564.4431 pro prostřední a 8563.3415 pro spodní spektrum). Rámečky jsou znázorněny adukty, jejichž detail můžeme vidět na obrázcích 20 pro reakci s neaktivovanou cisplatinou, 21 pro reakci s čerstvě připravenou aktivovanou cisplatinou a 22 pro reakci se skladovanou

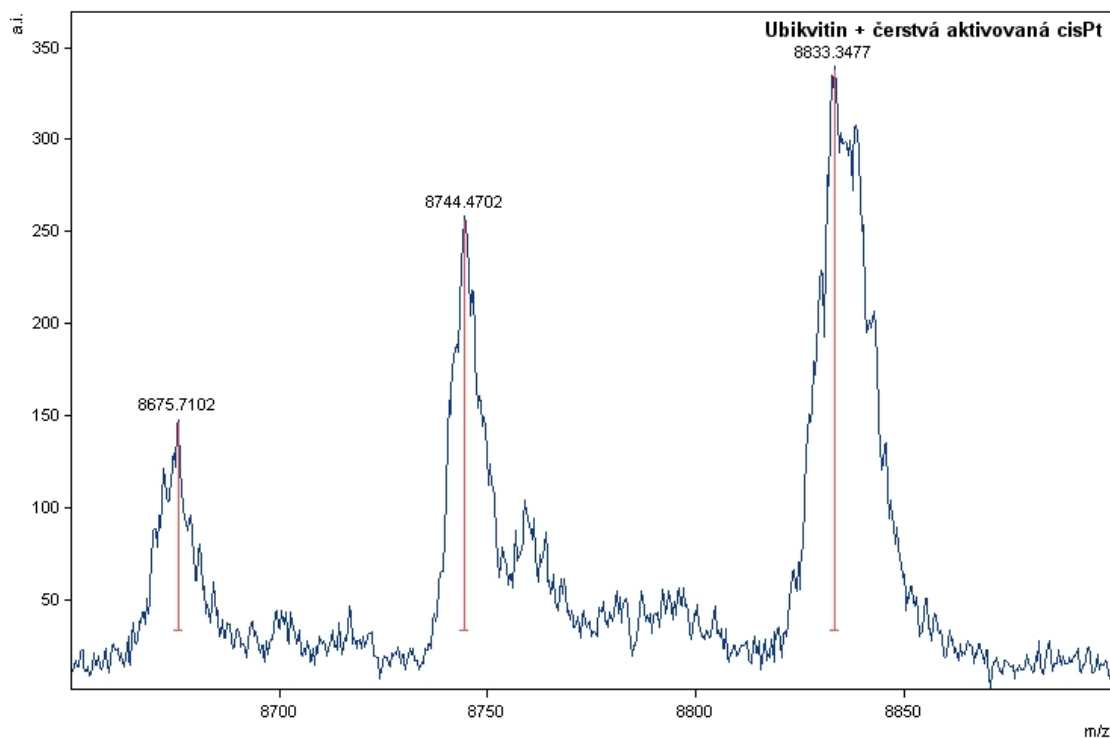
aktivovanou cisplatinou.



Obrázek 20 – Detail aduktů odpovídající interakci ubikvitinu s neaktivovanou cisplatinou (24 hodin, 37°C). Rozmezí m/z = 8700 – 8850.

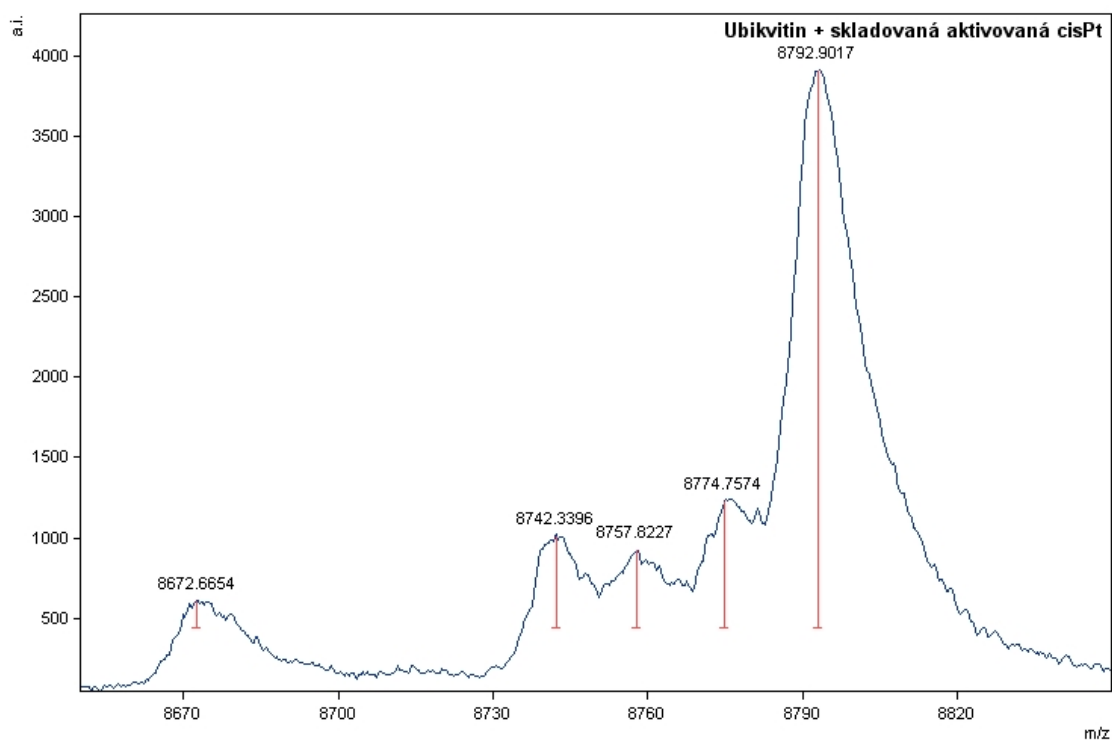
Adukty mají hodnoty m/z 8744.9702, 8762.8299, 8778.1457 a 8795.5492, tedy s rozdíly 179.4255, 197.2862, 212.601 a 229.9145 oproti nezreagovanému ubikvitinu (8565.5447). Píky 8778.1457 a 8795.5492 podle tabulky 4 zřejmě odpovídají aduktům $[\text{Ub-Pt}(\text{NH}_3)]$ a $[\text{Ub-Pt}(\text{NH}_3)_2]$, pík 8744.9702 neodpovídá žádnému aduktu, pík 8762.8299 by mohl být adukt Ub-Pt (molekulová hmotnost platiny je $195.08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Výsledky byly stejné jako při inkubaci s ubikvitinu s neaktivovanou cisplatinou po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě.



Obrázek 21 – Detail aduktů odpovídající reakci ubiquitinu s čerstvou aktivovanou cisplatinou. Rozmezí $m/z = 8650 - 8900$.

Aduktů mají hodnoty m/z 8675.7102, 8744.4702 a 8833.3477 a tedy s rozdíly 111.2671, 180.0271 a 268.9046 oproti nezreagovanému ubiquitinu (8564.4431). Píky neodpovídají podle tabulky 4 žádným aduktům.



Obrázek 22 – Detail aduktů odpovídající reakci ubikvitinu se starou aktivovanou cisplatinou. Rozmezí m/z = 8650 – 8850.

Adukty mají hodnoty m/z 8672.6654, 8742.3396, 8757.8227, 8774.7574 a 8792.9017, tedy s rozdíly 109.3239, 178.9981, 194.4812, 211.4159 a 229.502 oproti nezreagovanému ubikvitinu (8563.3415). Pík 8774.7574 a 8792.9017 podle tabulky 4 zřejmě odpovídají aduktům [Ub-Pt(NH₃)] a [Ub-Pt(NH₃)₂], píky 8672.6654, 8742.3396 neodpovídají žádným aduktům, pík 8757.8227 by mohl být adukt Ub-Pt.

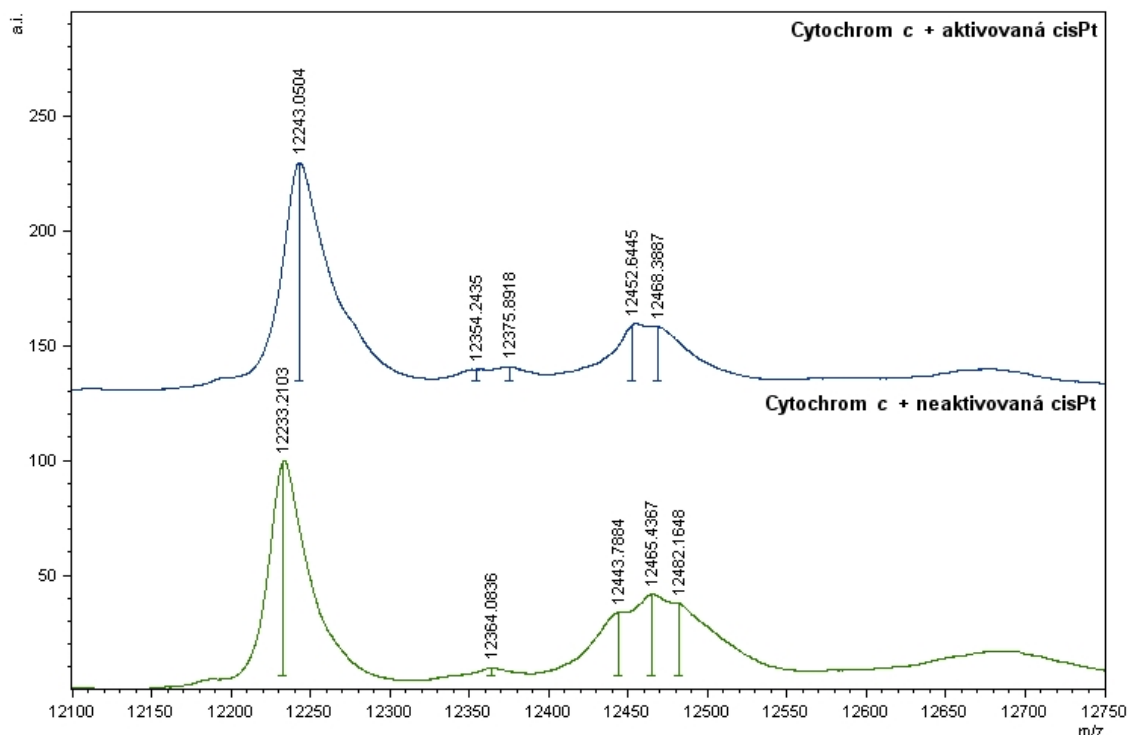
Je vidět, že se skladovanou aktivovanou cisplatinou ubikvitin na rozdíl od čerstvě připravené reaguje.

4.2.2 Výsledky interakce myoglobinu a cytochromu *c* s cisplatinou

Stejně jako v případě ubikvitinu, byla sledována interakce myoglobinu a cytochromu *c* s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou (poměr látkových množství 1:10, nadbytek cisplatiny).

Používal se cytochrom *c* s molekulovou hmotností 12327 Da a koňský myoglobin s molekulovou hmotností 16951.48 Da. Tyto dva proteiny vytváří různé adukty.

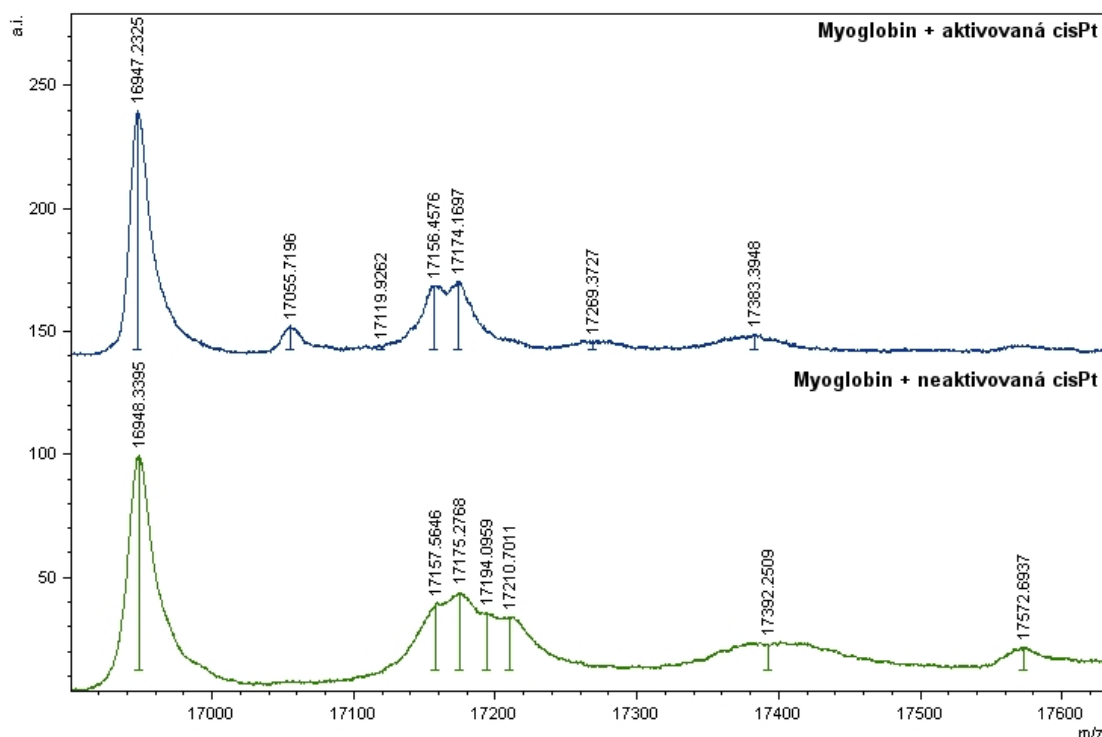
Na obrázcích 23 a 24 vidíme spektra odpovídající interakci cytochromu *c* a myoglobinu s cisplatinou. Nejintenzivnější pík znázorňuje cytochrom *c* (cca 12 kDa), respektive myoglobin (cca 17 kDa). Kromě píků pro cytochrom *c* a myoglobin jsou zde vidět píky pro různé adukty těchto proteinů s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou. V článku Zhao a King, 2010 je uvedeno, že interakce myoglobinu s cisplatinou vede ke tvorbě monoaduktů s posunem 228 Da ([Mb-Pt(NH₃)₂]) a bisaduktů s posunem 455 Da ([Mb-Pt(NH₃)₂]₂) oproti nezreagovanému proteinu. V článku Casini et al., bylo zjištěno, že cytochrom *c* vytváří adukty s rozdíly 194.2, 210.3, 227.7, 246, 266.2, 437.5, 454.5 a 522.2 oproti nezreagovanému cysteinu. Obecně lze ovšem říci, že cytochrom *c* a myoglobin vytvářejí adukty se stejnými rozdíly jako ubikvitin (viz tab.4), čehož bylo při zjišťování aduktů myoglobinu a cytochromu *c* s cisplatinou využito. Ve spektrech naměřených během diplomové práce byly hmoty cytochromu *c* a myoglobinu odlišné. Důvodem je, že myoglobin a cytochrom *c* v kalibračním standardu mají odlišné hmoty (přesnější) než myoglobin a cytochrom *c* použité k samotnému měření. Rozdíly mezi adukty s cisplatinou a nezreagovanými proteiny nebyly přesné a zjistily se připočítáním vždy výše zmíněných rozdílů k nezreagovanému proteinu. Pro přesnější stanovení rozdílů mezi zreagovanými a nezreagovanými proteiny by musela být provedena elektroforéza.



Obrázek 23 – Porovnání spekter cytochromu *c* s neaktivovanou a aktivovanou cisplatinou v rozsahu m/z 12100 – 12750.

Na horním spektru vidíme pík s hodnotou m/z 12243.0504, který odpovídá nezreagovanému cytochromu *c*, další píky mají hodnoty m/z 12354.2435, 12375.8918, 12452.6445 a 12648.3887 a rozdíly oproti nezreagovanému cytochromu *c* jsou tedy 111.1931, 132.9314, 209,5941 a 225,3383. Píky 12452.6445 a 12648.3887 odpovídají aduktům [Cyt_C-Pt(NH₃)] a [Cyt_C-Pt(NH₃)₂]. Píky 12354.2435, 12375.8918 nejsou adukty cytochromu *c* s aktivovanou cisplatinou a jde pravděpodobně o nerovnosti základní linie.

Na dolním spektru vidíme pík s hodnotkou m/z 12233.2103, který odpovídá nezreagovanému cytochromu *c*, další píky mají hodnoty m/z 12364.0836, 12443.7884, 12465.4367 a 12482.1648 a rozdíly oproti nezreagovanému cytochromu *c* jsou tedy 130.8733, 210.5781, 232.2264 a 248.9545. Pík 12443.7884 tedy odpovídá aduktu [Cyt_C-Pt(NH₃)]. Píky 12354.2435, nejsou 12364.0836, 12465.4367 a 12482.1648 adukty cytochromu *c* s neaktivovanou cisplatinou.



Obrázek 24 - Porovnání spekter myoglobinu s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou v rozsahu m/z 16900 – 17650.

Na horním spektru vidíme pík s hodnotkou m/z 16947.2325, který odpovídá nezreagovanému myoglobinu, další píky mají hodnoty m/z 17055.7196, 17119.9262, 17156.4576, 17174.1697, 17269.3727 a 17383.3948 a rozdíly oproti nezreagovanému myoglobinu jsou tedy 108.4871, 172.6937, 209,2251, 226,9372, 322.1402 a 436.1623. Píky 17156.4576, 17174.1697 a 17383.3948 odpovídají aduktům $[\text{Mb-Pt}(\text{NH}_3)]$, $[\text{Mb-Pt}(\text{NH}_3)_2]$ a $[\text{Mb-Pt}(\text{NH}_3)_2 + \text{Pt}(\text{NH}_3)]$. Píky 17055.7196, 17119.9262 a 17269.3727 nejsou adukty myoglobinu s aktivovanou cisplatinou a jde pravděpodobně o nerovnosti základní linie.

Na dolním spektru vidíme pík s hodnotkou m/z 16948.3395, který odpovídá nezreagovanému myoglobinu, další píky mají hodnoty m/z 17157.5646, 17175.2768, 17194.0959, 17210.7011, 17392.2509 a 17572.6937 a rozdíly oproti nezreagovanému myoglobinu jsou tedy 209.2251, 226.9373, 245.7564, 262.3616, 443.9114 a 624.3542. Píky 17157.5646, 17175.2768, 17194.0959, 17210.7011 tedy odpovídají aduktům $[\text{Mb-Pt}(\text{NH}_3)]$, $[\text{Mb-Pt}(\text{NH}_3)_2]$, $[\text{Mb-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]$ a $[\text{Mb-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]$. Píky 17392.2509 a 17572.6937 nejsou adukty myoglobinu s neaktivovanou cisplatinou.

4.3 Cytoplazmatická klička

Vyizolovaný protein byl po kontrole znečištění zdialyzován v pufrch kompatibilních s hmotnostní spektrometrií - octanu amonném a MESu. Protein v octanu amonném byl použit

pro měření intaktní hmoty a protein v MESu pro měření peptidů. Jak při měření intaktní hmoty, tak při měření peptidů bylo cílem určit interakce ATPasy s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou.

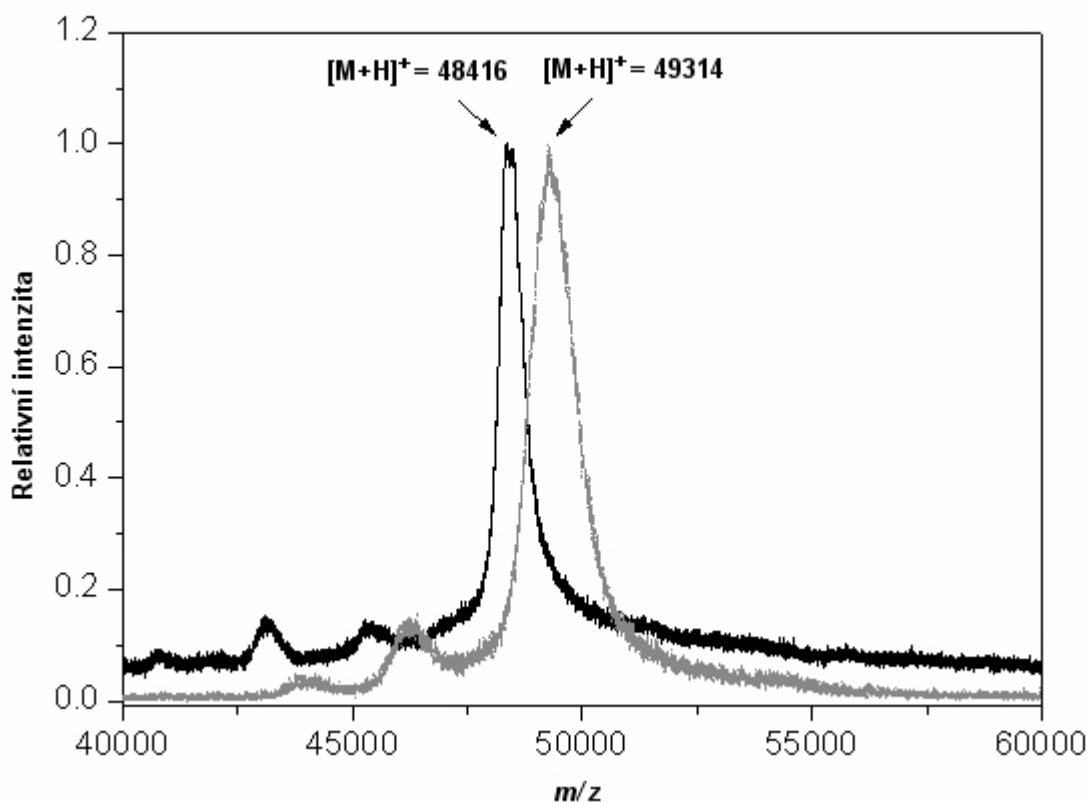
4.3.1 Stanovení intaktní hmoty

ATPasa v octanu amonném byla smíchána s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou v poměru látkových množství 20:1 (nadbytek cisplatiny) a byla sledována interakce.

Průměrná molekulová hmotnost nemodifikované cytoplazmatické kličky C45 Na^+/K^+ -ATPasy 48416 ± 15 Da, po reakci s neaktivovanou cisplatinou 49314 ± 16 Da a po reakci s aktivovanou cisplatinou 50969 ± 23 Da. Molekulová hmotnost cisplatiny je $301.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

4.3.1.1 Reakce proteinu s neaktivovanou cisplatinou.

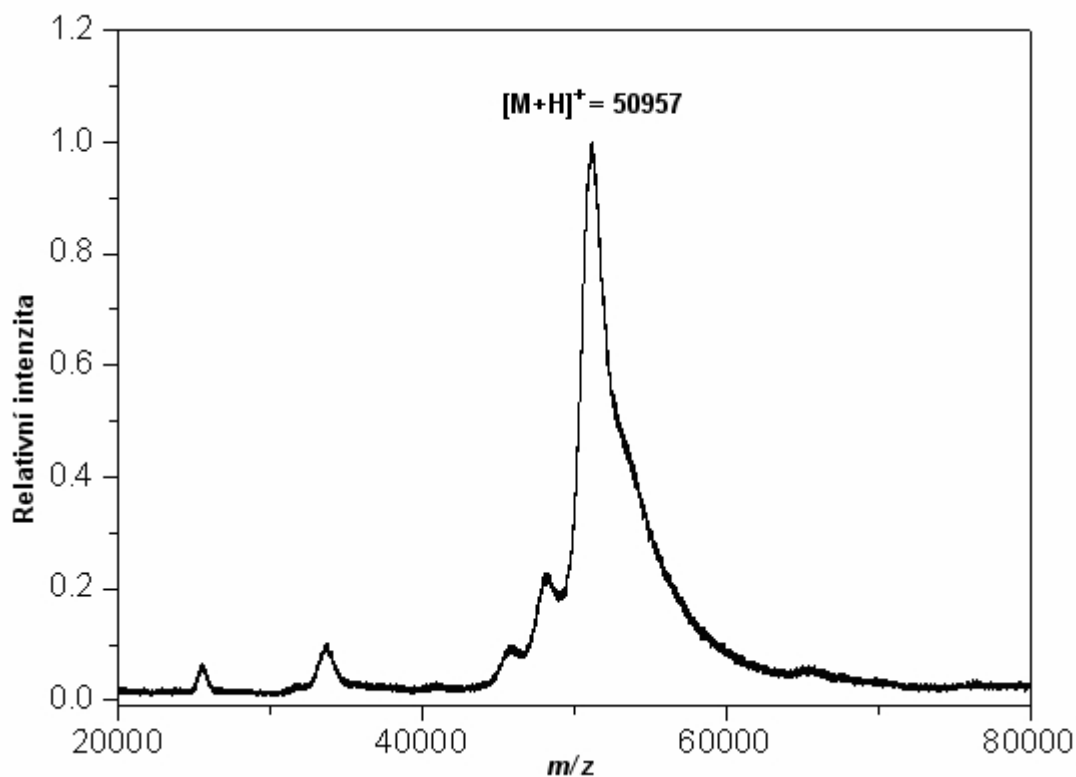
Na obrázku 25 je porovnán pík pro intaktní hmotu samotné kličky ($m/z = 48416$) a kličky po interakci s neaktivovanou cisplatinou ($m/z = 49314$). Rozdíl v m/z mezi zinteragovanou a samotnou kličkou je 898.



Obrázek 25 – Porovnání intaktní hmoty nemodifikované (pík znázorněný černě) a neaktivovanou cisplatinou modifikované (pík znázorněný šedě) C45 kličky.

4.3.1.2 Reakce proteinu s aktivovanou cisplatinou.

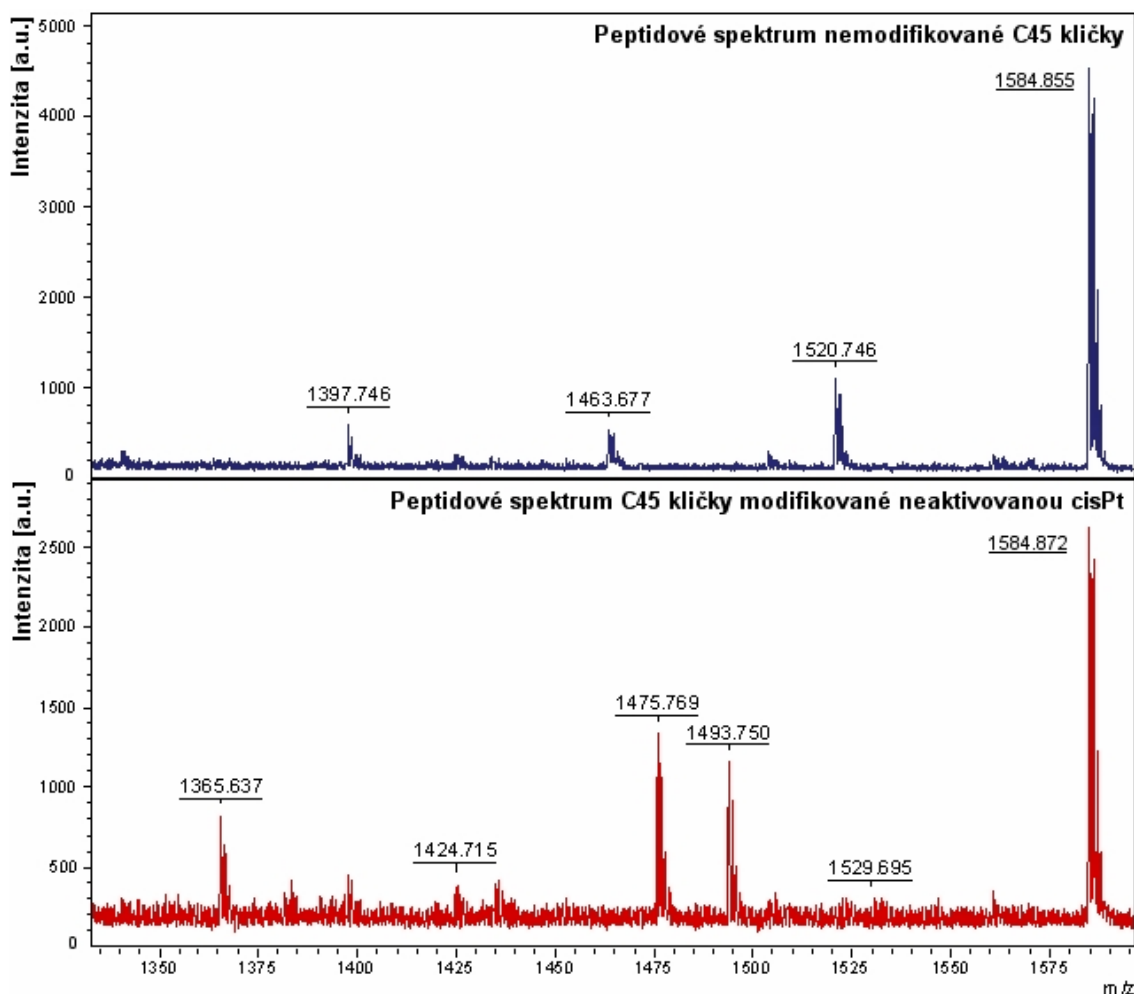
Na obrázku 26 je pík po interakci kličky s aktivovanou cisplatinou ($m/z = 50957$). Rozdíl v m/z mezi zinteragovanou a samotnou kličkou je 2541 ($50957-48416$).



Obrázek 26 – Pík pro protein modifikovaný aktivovanou cisplatinou. Pík pro nemodifikovanou C45 kličku není zobrazen – odpovídá píku na obrázku 25.

4.3.2 Peptidy po reakci s cisplatinou

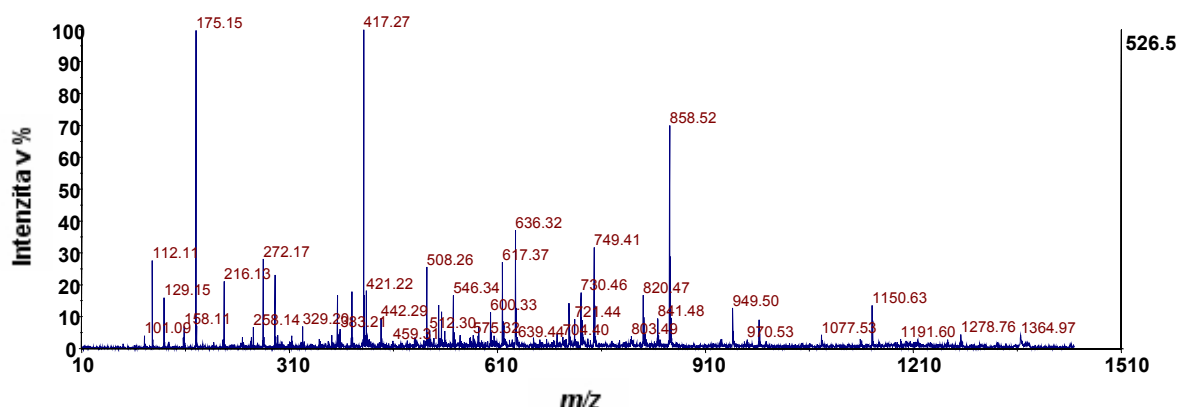
Pro zjištění konkrétních vazebných míst byla porovnána MALDI-TOF hmotnostní spektra peptidů (nemodifikované C45 kličky a kličky modifikované před SDS-PAGE a štěpením neaktivovanou cisplatinou) vzniklých trypsinovým štěpením vzorku rekombinantní ATPasy (C45 kličky) v polyakrylamidovém gelu po separaci SDS-PAGE. Na obrázku 27 pak vidíme porovnání MALDI-TOF hmotnostních spekter peptidů vzniklých trypsinovým štěpením vzorku rekombinantní ATPasy (klička C45) v polyakrylamidovém gelu po separaci SDS-PAGE. Nahoře výsledek s nemodifikovaným proteinem v rozsahu m/z 1300-1600, dole obdobný výřez spektra získaného po štěpení ATPasy modifikované předtím reakcí s neaktivovanou cisplatinou



Obrázek 27 – porovnání spekter modifikované a nemodifikované C45 kličky.

Porovnáním MALDI-TOF hmotnostních spekter peptidů po trypsinovém štěpení rekombinantní ATPasy (klička C45) před a po reakci s cisplatinou (Obr.27) byly nalezeny některé peptidy, o kterých se dalo předpokládat, že se ve spektru objevily v důsledku modifikace určitých aminokyselinových zbytků. Šlo o peptidy s hodnotami m/z 1179, 1320, 1365, 1475, 1493, 1638, 1707, 1765, 1993, 2384 a 2872 a dále skupinu peptidových iontů s m/z 2533, 2550, 2566 a 2584. Peptidový ion m/z 1475 je typickou známkou kontaminace vzorku keratinem (Garbis et al., 2005) a řada výše zmíněných peptidů byla proto podrobena tandemové hmotnostně spektrometrické analýze na přístroji MALDI-TOF/TOF (zakázková analýza na Ústavu molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany v Hradci Králové), jelikož na Katedře biochemie PĚF UP není dostupný přístroj s kolizní celou pro měření tandemových hmotnostních spekter. Takto bylo potvrzeno, že vzorek ATPasy po reakci s neaktivovanou cisplatinou byl kontaminován následujícími keratinovými peptidy: VGLISMIDPPR (m/z 1179), SQYEQLAEQNR (m/z 1365), SRSGGGGGGLGSGGSIR nebo FLEQQNQVLQTK (obojí m/z 1475), SQYEQLAEQNRK (m/z 1493) a GSLGGGFSSGGFSSGGSFSR (m/z 1707). Výsledky MS/MS měření na přístroji MALDI-

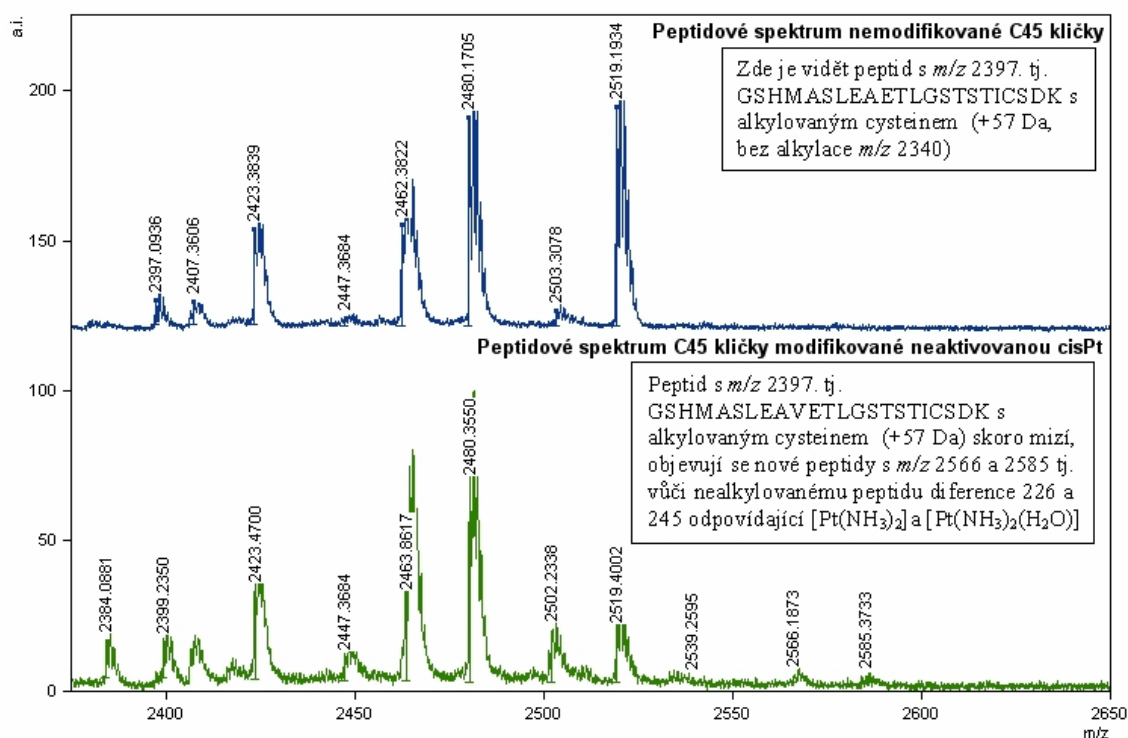
TOF/TOF jsou demonstrovány na obrázku 28 – fragmentace peptidu m/z 1365.



Obr. 28 - MS/MS spektrum peptidového prekurzorového iontu m/z 1365. Fragmentové ionty odpovídají aminokyselinové sekvenci SQYEQLAEQNR, která určuje příslušnost peptidu k lidskému keratinu 10 (přístupový kód v databázi Swiss-Prot je P13645).

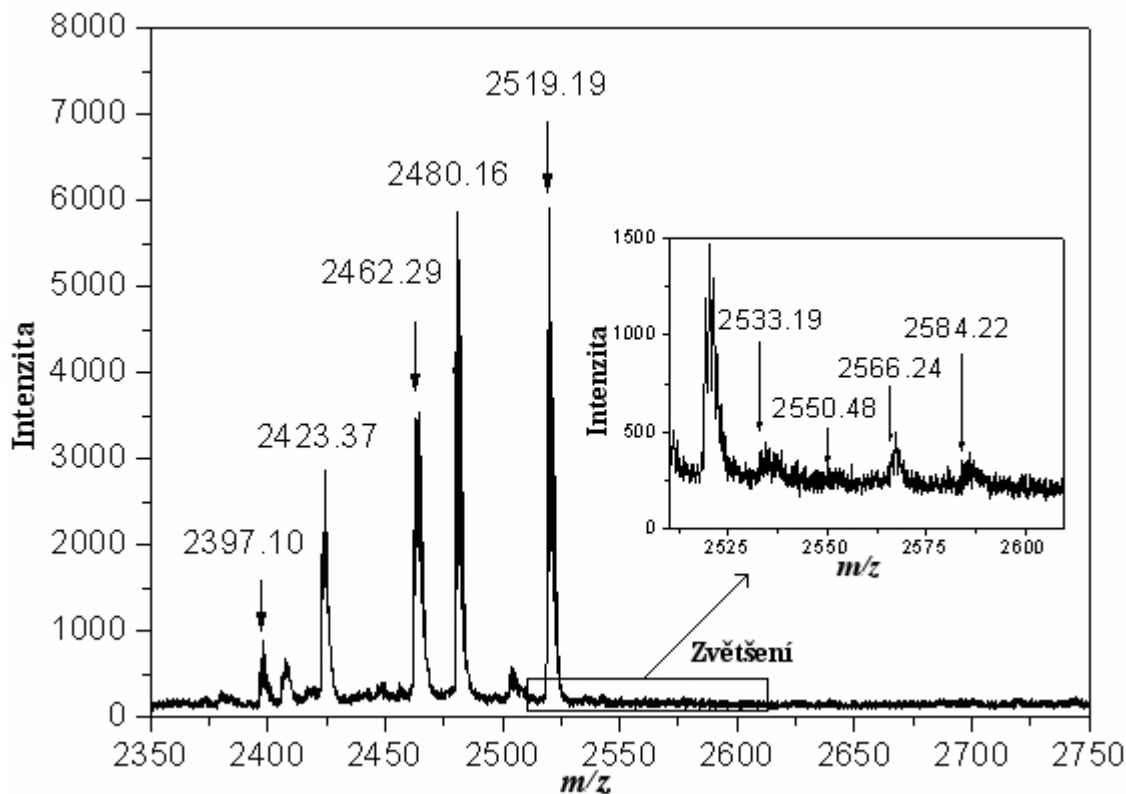
Otázku identity peptidových iontů m/z 2533, 2550, 2566 a 2584 nebylo možné řešit pomocí MS/MS vzhledem k nízké intenzitě signálů. Zda se jedná o adukty s cisplatinou bylo proto zjišťováno pouze nepřímo na základě výpočtu hmotnostních rozdílů.

Na obrázku 29 je demonstrován domnělý přechod peptidu GSHMASLEAVETLGSTICS DK (m/z 2397.1 po štěpení nezreagovaného proteinu s karbamidomethylací na Cys a oxidací MET na modifikovanou formu. Pozorované hmotnostní posuny jsou 193, 210, 226 a 244, což odpovídá s tvorbou monoaduktů Pt, [Pt(NH₃)], [Pt(NH₃)₂] and [Pt(NH₃)₂(H₂O)], v tomto pořadí (Zhao and King, 2011).



Obrázek 29 – Porovnání peptidových spekter modifikované a nemodifikované kličky. Rozsah $m/z = 2375 - 2650$.

Obrázek 30 pak znázorňuje podrobné peptidové spektrum nemodifikované C45 kličky v podobném rozsahu jako na obrázku 29.



Obrázek 30 – Podrobné peptidové spektrum proteinu v rozsahu $m/z 2350 - 2750$.

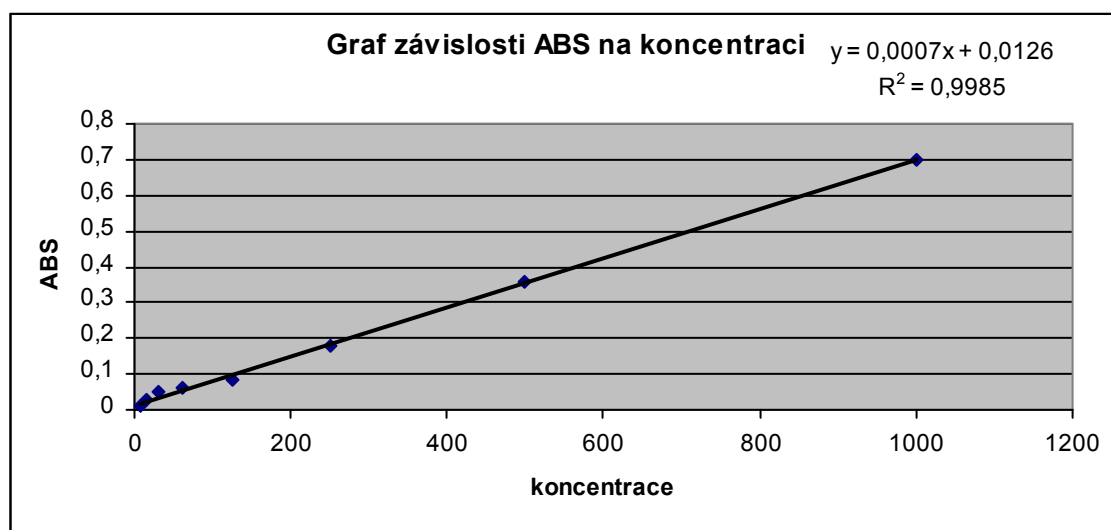
4.3.3 Stanovení sulfhydrylových skupin u C45 kličky

Zde bylo použito jako ředícího pufru 30 mM Tris + 3 mM EDTA + 1% SDS. Ellmanovo činidlo a kalibrační řada byly připraveny právě za použití tohoto pufru. Vzorky ATPasy a ATPasy po reakci s cisplatinou (pro srovnání) byly v tomto pufru zdialyzovány, přičemž vzorek ATPasy s cisplatinou byl naředěn 12.5x a vzorek čisté ATPasy 5x. Kalibrační řada byla připravena za použití cystein hydrochlorid monohydrátu v koncentracích 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 a 7.8125 μM . V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty absorbancí pro jednotlivé koncentrace kalibrační řady ve dvou opakováních.

Tabulka 5 – Absorbance standardů cysteinu.

Kalibrace c [μM]	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.81
ABS 1	0.72	0.369	0.192	0.092	0.066	0.053	0.026	0.015
ABS 2	0.678	0.344	0.163	0.079	0.058	0.046	0.026	0.020
ABS průměr	0.699	0.3565	0.1775	0.0855	0.062	0.0495	0.026	0.0175

Na základě tabulky byl vytvořen graf 1 a z něj získána rovnice regrese pro výpočet koncentrací SH skupin.

Graf 1 – Závislost absorbance na koncentraci.

Tabulka 6 pak obsahuje informace o absorbanci a koncentraci vzorků ATPasy a ATPasy po reakci s cisplatinou.

Tabulka 6 – absorbance a koncentrace vzorků ATPasy a ATPasy s cisplatinou.

	c ATPasy [μM]	c ATPasy + akt. cisPt [μM]
ABS ATPasy	0.076	452.857
ABS ATPasy + akt. cisPt	0.030	310.714

Pro čistou ATPasu je počet SH skupin $452.857/53.34 = 8.49$ pro Shimadzu a $452.857/31.95 = 14.174$ pro BCA metodu, průměr je 11.332 SH skupin a pro ATPasu s cisplatinou $310.714/53.34 = 5.825$ SH skupin pro Shimadzu a $310.714/31.95 = 9.725$ SH skupin pro BCA metodu, průměr je 7.775. to znamená že pro povrchové SH skupiny je výsledek $11.332 - 7.775 = 3.557$.

Samotná ATPasa:

$c = 452.857 \mu\text{M}$

$452.857/53.34 = 8.49$ SH skupin (cysteinových residuí) pro Schimadzu.

$452.857/31.95 = 14.174$ SH skupin (cysteinových residuí) pro BCA metodu

průměr = $(8.49 + 14.174)/2 = \underline{11.332}$ SH skupin

ATPasa + cisplatina:

$c = 310.714 \mu\text{M}$

$310.714 / 53.34 = 5.825$ SH skupin (cysteinových residuí) pro Schimadzu

$310.714 / 31.95 = 9.725$ SH skupin (cysteinových residuí) pro BCA metodu

průměr = $(5.825 + 9.725)/2 = \underline{7.775}$ SH skupin

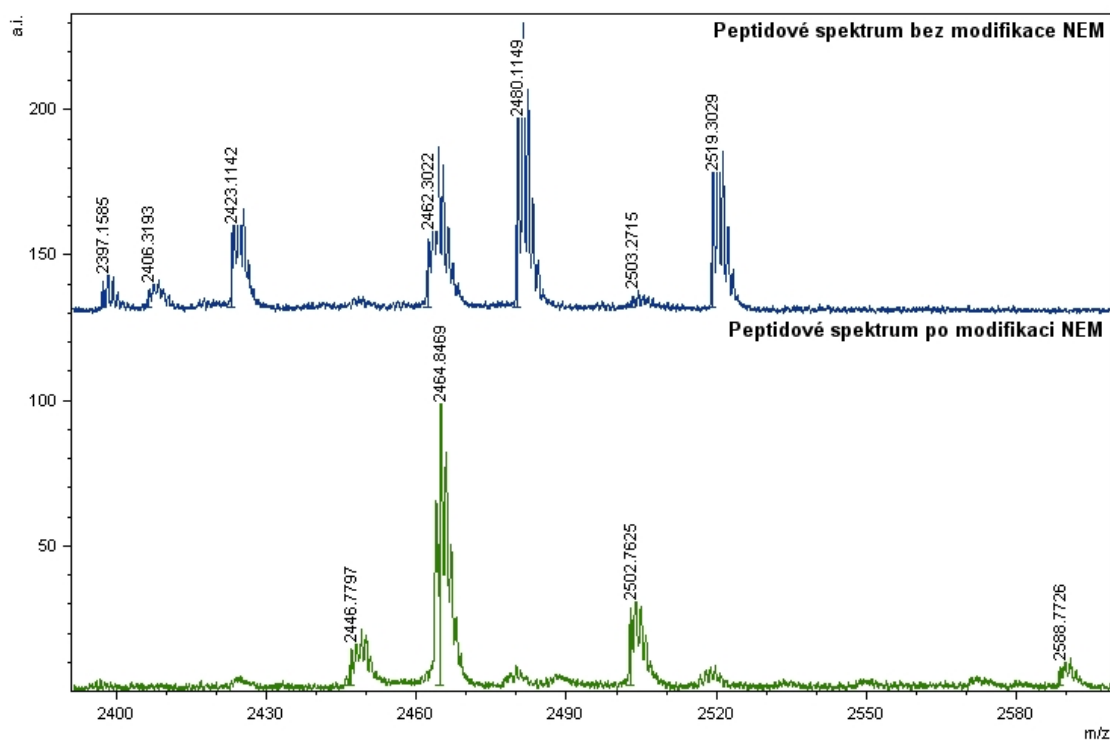
Pro povrchové SH skupiny je výsledek $11.332 - 7.775 = \underline{3.557}$

4.3.4 ATPasa po reakci s NEM

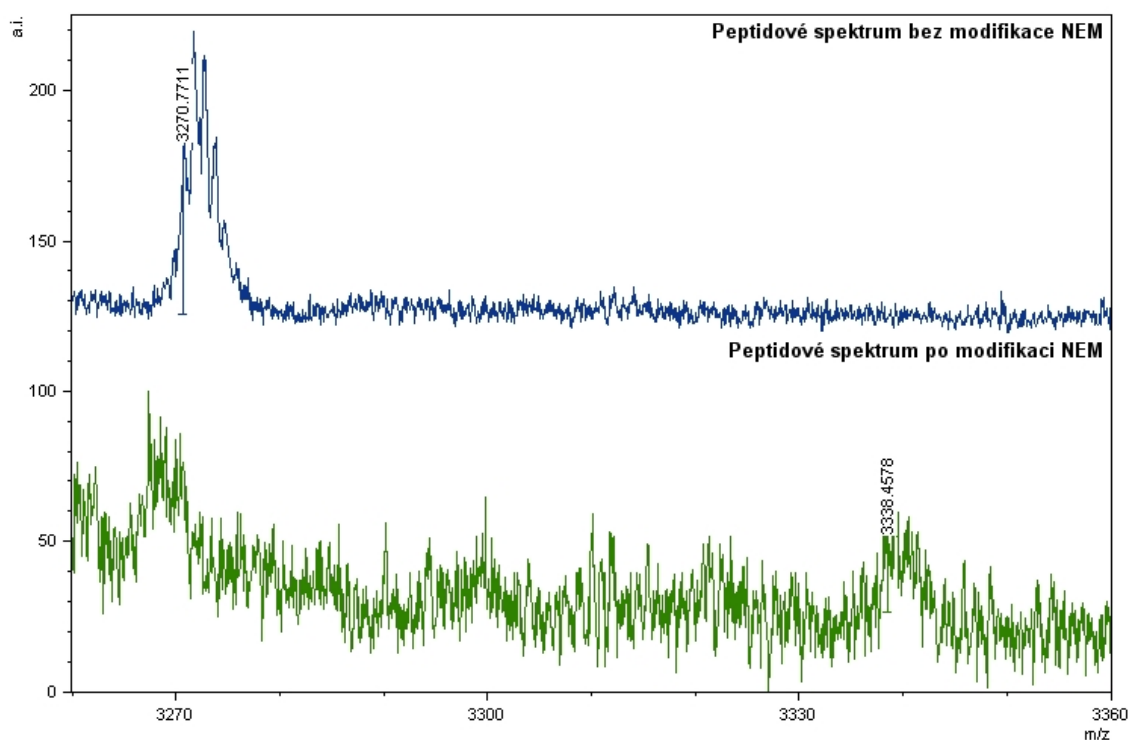
Pro stanovení odhadu vazebného místa cisplatiny k ATPase bylo také využito porovnání peptidových spekter nemodifikovaného proteinu a proteinu modifikovaného činidlem NEM (*N*-ethylmaleimid). NEM reaguje s SH skupinami cysteinů a ve spektru vytváří píky s přírůstkem 125 Da oproti nemodifikovanému proteinu (po alkylationi NEM je celková hmota modifikovaného cysteinu 228 Da) (Zabet-Moghaddam et al., 2008) a s přírůstkem 68 Da (125-57 Da) oproti zalkylovanému cysteinu.

Byla porovnána MALDI-TOF hmotnostní spektra po trypsinovém štěpení rekombinantní ATPasy (klička C45) před a po reakci s NEM (Obr.31).

Ve spektru nemodifikovaného proteinu byly nalezeny píky odpovídající peptidům IAGLCNR (*m/z* 803), LIIVEGCQR (*m/z* 1087), GSHMASLEAVETLGSTSTICSDK (*m/z* 2397), ACVVHCSDLKDMTSEELDDILR (*m/z* 2519), RAVAGDASESALLECIEICCGSVMEMR (*m/z* 3046) GSHMASLEAVETLGSTSTICSDKTGTLTQN (*m/z* 3270), u kterých jsou cysteinová residua přítomna na povrchu proteinu a tak přístupná vazbě cisplatiny. Nárůst hmoty o 68 Da byl ovšem pouze u peptidů s *m/z* 2397, 2519 a 3270 a to 2465, 2588 a 3338, v tomto pořadí.



Obrázek 31 – Porovnání peptidového spektra nemodifikovaného proteinu a proteinu modifikovaného činidlem NEM. Rozsah m/z je 2390-2600.



Obrázek 32 Porovnání peptidového spektra nemodifikovaného proteinu a proteinu modifikovaného činidlem NEM. Rozsah m/z je 3260-3360.

5 Diskuze

Jak již bylo zmíněno výše, cisplatina je léčivo, které je schopné se vázat na různé proteiny. V literatuře je možné o interakci tohoto léčiva s proteiny nalézt mnoho informací, jako například na která aminokyselinová residua se cisplatina váže nebo jaké vytváří s proteiny adukty.

Hartinger a jeho spolupracovníci se kromě jiného zabývali interakcí cisplatinou s malým proteinem ubikvitinem a zjistili, že se váže přednostně k síře na Met1 proteinu. Jako sekundární cíl byl určen His68 (Hartinger et al., 2008) a popsáno bylo také jaké adukty tento protein s cisplatinou vytváří (viz tabulka 4) (Hartinger et al., 2007).

Lze nalézt i četné informace o interakci cisplatinou s myoglobinem a cytochromem *c*. Interakce cisplatinou s ubikvitinem, myoglobinem a cytochromem *c* byla sledována i během experimentální části mé diplomové práce.

Bylo ověřeno, že ubikvitin vytváří stejné adukty jaké jsou uvedeny v tabulce 4. Tyto adukty mají oproti nemodifikovanému proteinu charakteristický nárůst molekulové hmotnosti. U myoglobinu a cytochromu *c* byly nalezeny adukty odpovídající výsledkům s ubikvitinem.

Po ověření, že ubikvitin, myoglobin a cytochrom *c* vytváří s cisplatinou adukty, které jsou uváděny i v literatuře bylo cílem další práce zjistit jak reaguje s cisplatinou rekombinantní C45 klička ATPasy, tzn. jaké vytváří adukty a následně kam se v proteinu cisplatina váže.

Předpokladem pro určování vazby cisplatinou na C45 kličce byla tvorba stejných aduktů s cisplatinou jako u ubikvitinu, myoglobinu a cytochromu *c* se stejnými hmotnostními nárůsty oproti nemodifikovanému proteinu, tedy C45-Pt(NH₃), C45-Pt(NH₃)₂, C45-Pt(NH₃)Cl a dalších (porovnání tabulka 4) a také byla předpokládána tvorba aduktu C45-Pt.

Dalším předpokladem bylo, že se cisplatina u sbaleného proteinu váže na cysteinová residua, respektive k jejich SH skupinám, které jsou určitým způsobem přístupné pro vazbu cisplatinou, čehož se využilo při zkoumání vazby cisplatinou na protein.

Nejdříve byla proměřena intaktní hmota proteinu s aktivovanou a neaktivovanou cisplatinou. U aktivované i neaktivované cisplatinou byl zjištěn nárůst hmoty oproti nemodifikovanému proteinu. U neaktivované cisplatinou byl tento nárůst o ~ 900 Da a u aktivované o ~ 2500 Da. Cisplatina má molekulovou hmotnost 301.1 g.mol⁻¹, ovšem při vazbě k ATPase se z důvodu tvorby různých aduktů její molekulová hmotnost snižuje a rozdíl 900 Da může odpovídat vazbě až 4 molekul neaktivované cisplatinou k proteinu a rozdíl 2500 Da vazbě 11 – 12 molekul aktivované cisplatinou.

Aktivovaná cisplatinou vzniká reakcí cisplatinou s AgNO₃ a má strukturu [Pt(NH₃)₂(H₂O)₂](NO₃)₂. Aktivace zřejmě způsobuje i vazbu na jiná než cysteinová residua, což

je ve shodě s výsledkem vazby většího počtu molekul aktivované oproti neaktivované cisplatině k proteinu.

Obecně lze říci, že zjištěním nárůstu hmoty po interakci aktivované i neaktivované cisplatině s C45 klíčkou bylo ověřeno, že se cisplatin skutečně na protein váže.

Pro detailnější prozkoumání vazby cisplatině k proteinu bylo provedeno porovnávání peptidových spekter modifikovaného a nemodifikovaného proteinu po trypsinovém štěpení. K reakci byla z důvodu výsledků, které byly více ve shodě s teoretickými předpoklady použita neaktivovaná cisplatin. Vzhledem k předpokladu vazby cisplatině na -SH skupiny cysteinů byly hledány rozdíly u peptidů obsahujících cystein.

Po porovnání peptidových spekter modifikovaného a nemodifikovaného proteinu bylo objeveno v peptidovém spektru pro modifikovaný protein několik peptidů. Byly to peptidy s hodnotami m/z 1179, 1320, 1365, 1475, 1493, 1638, 1707, 1765, 1993, 2384 a 2872 a dále skupinu peptidových iontů s m/z 2533, 2550, 2566 a 2584. Peptid 1475 se v peptidovém spektru objevuje v kreatinem znečištěných vzorcích, proto byly peptidy s m/z 1179, 1320, 1365, 1475, 1493, 1638, 1707, 1765, 1993, 2384 a 2872 analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií a bylo u nich zjišťováno, zda se jedná o kontaminaci lidským kreatinem. Peptidy s m/z 2533, 2550, 2566 a 2584 nebylo možné kvůli nízkému signálu na MS/MS analyzovat.

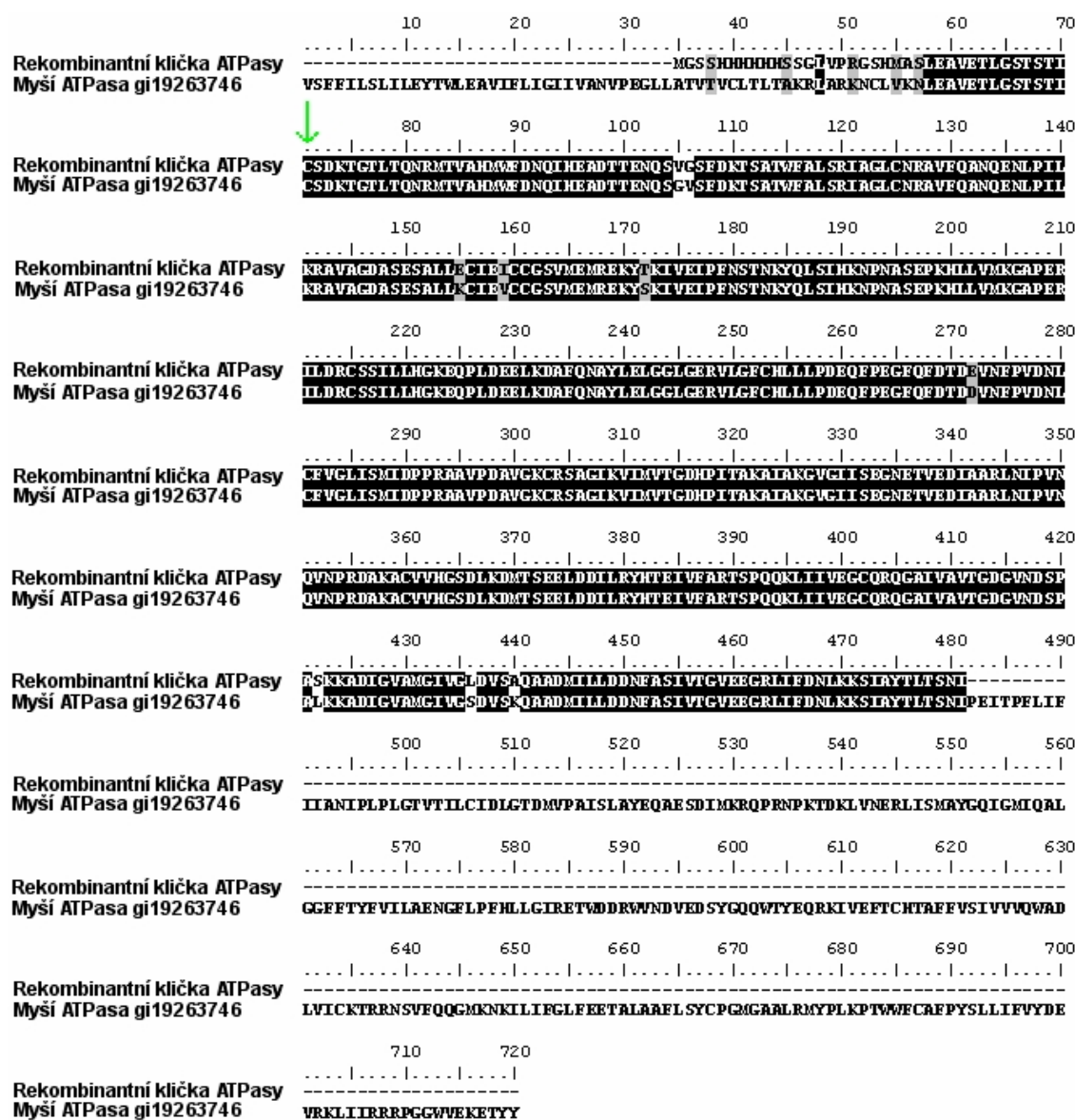
U peptidu GSHMASLEAVETLGSTICS \underline{S} DK (m/z 2397.1 po štěpení nezreagovaného proteinu s karbamidomethylací na Cys a oxidací MET) byly zjištěny po modifikaci cisplatinou hmotnostní posuny 193, 210, 226 a 244, které odpovídaly tvorbě monoaduktů Pt, [Pt(NH₃)], [Pt(NH₃)₂] and [Pt(NH₃)₂(H₂O)], v tomto pořadí (Zhao and King, 2011).

Pro stanovení odhadu vazebného místa cisplatině k ATPase bylo také využito porovnání peptidových spekter nemodifikovaného proteinu a proteinu modifikovaného činidlem NEM. Ve spektru po modifikaci činidlem NEM bylo nalezeno několik peptidů, které ve spektru nemodifikovaného peptidu nebyly přítomny. Šlo o peptidy s m/z 803, 1087, 2397, 2519, 3046 a 3270. Typický hmotnostní nárůst 68 Da peptidu po reakci s činidlem NEM oproti peptidu po alkylnaci, ale bez modifikace činidlem NEM však byl ve spektrech vidět pouze u peptidů s m/z 2397, 2519 a 3270.

Peptid s m/z 3270 (po reakci s NEM s m/z 3338) má sekvenci GSHMASLEAVETLGSTSTICS \underline{S} DKTGTLTQN. Tato sekvence souvisí se sekvencí GSHMASLEAVETLGSTICS \underline{S} DK s m/z 2397, u které došlo ke štěpení za lysinem. Skutečnost, že byly u peptidu s m/z 2397 stanoveny po reakci s cisplatinou hmotnostní posuny 193, 210, 226 a 244 odpovídající aduktům Pt, [Pt(NH₃)], [Pt(NH₃)₂] and [Pt(NH₃)₂(H₂O)] a že u peptidu s m/z 3270 s ním souvisejícího byl nalezen zmíněný hmotnostní nárůst o 68 Da, lze říci, že SH skupina cysteinu 367 (pořadí v celé Na⁺/K⁺-ATPase) je exponován pro vazbu modifikačních činidel (GSHMASLEAVETLGSTICS \underline{S} DK – cystein na pozici 367 celé Na⁺/K⁺-ATPasy je zde

vyznačen).

Na Obrázku 33 je vidět sekvence rekombinantní kličky ATPasy připravené během experimentální části a myší ATPasu gi19263746 (gi19263746 je databázový kód).



Obrázek 33 – Sekvence rekombinantní kličky ATPasy a myší ATPasy gi19263746. Obě sekvence se navzájem mírně liší a sekvence připravené rekombinantní kličky začíná na pozici 35 a končí na pozici 481. Cystein 367 je vyznačen zelenou šipkou.

Na obrázku 34 je pak trojrozměrný model struktury rekombinantního proteinu s vyznačením aminokyselinových zbytků Cys367.



Obrázek 34 - Model struktury klíčky C45 s vyznačením aminokyselinových zbytků Cys367 (síra žlutě) a Asp369 (kyslíky červeně). Uvedený cystein je pravděpodobným místem vazby cisplatiny, zbytek kyseliny asparagové nacházející se v blízké vzdálenosti je fosforylačním místem nezbytným pro funkci enzymu (Pedersen et al., 1996). Obrázek byl zhotoven použitím programu PyMOL v. 1.2r1 (DeLano Scientific Ltd.) dostupným na <http://www.pymol.org>, podkladem byl datový soubor modelu C45 klíčky ve formátu PDB, který byl poskytnut Katedrou biofyziky PŘF UP.

Předpokládaná vazba cisplatiny na Cys367, která vyplývá z výsledků hmotnostní spektrometrie, má zajímavou souvislost s prostorovou strukturou ATPasové klíčky C45. Jak je možné vidět na obrázku 34, tento cysteinový zbytek je dobře přístupný a nachází se v sousedství Asp369, místa fosforylace, které je důležité pro správnou funkci enzymu (Pedersen et al., 1996). Oba zbytky jsou součástí N-koncové části proteinu. Vazba cisplatiny v blízkosti místa klíčového pro enzymovou aktivitu tak může být příčinou jejich negativních účinků na enzymovou aktivitu.

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo seznámit se s fungováním Na^+/K^+ -ATPasy a s její rolí v metabolismu, seznámit se s cisplatinou a nakonec sledovat interakce tohoto léčiva s ATPasou.

V teoretické části diplomové práce byly uvedeny informace o membránách a membránových proteinech, na což navazovaly kapitoly o Na^+/K^+ -ATPase, její struktuře či právě fungování v metabolismu.

Druhá část teoretické části se zaměřovala na cisplatinu. Byly zhodnoceny její obecné vlastnosti, vysvětlen mechanismus nefrotoxicity a nakonec bylo popsáno studium interakce tohoto léčiva s proteiny, především s ubikvitinem.

V praktické části bylo prvním úkolem získat rekombinantní cytoplazmatickou kličku C45 Na^+/K^+ -ATPasy, aby mohla být studována vazba cisplatin k tomuto proteinu a určit jeho čistotu.

Pro ověření, zda cisplatin reaguje s proteiny, bylo nejprve použito proteinů ubikvitinu, myoglobinu a cytochromu *c*, jejichž interakce s cisplatinou byly studovány v mnoha člancích. Po zjištění, že tyto proteiny s cisplatinou skutečně interagují a vytvářejí stejné adukty, jaké jsou uváděny v literatuře následovalo sledování interakce cisplatin s připravenou rekombinantní ATPasou.

Neprve byl měřena intaktní hmota proteinu po reakci s aktivovanou i neaktivovanou cisplatinou a po zjištění nárůstu hmoty oproti nemodifikovanému proteinu byla vazba cisplatin k proteinu studována dále na úrovni peptidů. Byla porovnáována peptidová spektra modifikovaného a nemodifikovaného proteinu a na základě rozdílů bylo konečným výsledkem zjištění jednoho vazebného místa – cysteinového residua 367.

7 Seznam použité literatury

Abrahams J. P., Leslie A. G. W., Lutter R., Walker J. E. (1994) Structure at 2.8-Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628.

Abrahams J. P., Lutter R., Todd R. J., van Raaij M. J., Leslie A. G. W., Walker J.E. (1993) Inherent asymmetry of the structure of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria at 6.5 angstrom resolution. *EMBO J.* **12**, 1775-1780.

Albers R. W. and Siegel G. J. (1967) Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of electrophorus electric organ. 4. modification of response to sodium and potassium by arsenite plus 2,3-dimercaptopropanol. *J. Biol. Chem.* **242**, 4972-4979.

Allardyce C. S., Dyson P. J., Abou-Shakra F. R., Birtwistle H., Coffey J. (2001) Inductively coupled plasma mass spectrometry to identify protein drug targets from whole cell systems. *Chem. Commun.* **24**, 2708–2709.

Allardyce C. S., Dyson P. J., Coffey J., Johnson N. (2002) Determination of drug binding sites to proteins by electrospray ionisation mass spectrometry: the interaction of cisplatin with transferrin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 933-935.

Ang W. H., Khalaila I., Allardyce C. S., Juillerat-Jeanneret L., Dyson P. J. (2005) Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1382–1383.

Ang W. H., Dyson P. J. (2006) Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: Towards targeted chemotherapy. *Eur. J. Inorg. Chem.* **20**, 4003-4018.

Antolovic R., Bruller H.J., Bunk S., Linder D. and Schoner, W. (1991) Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the α subunit of Na⁺/K⁺-ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane. *Eur. J. Biochem.* **199**, 195-202.

Appleton T. G. (1997) Donor atom preferences in complexes of platinum and palladium with amino acids and related molecules. *Coord. Chem. Rev.* **166**, 313–359.

Arany I., Kaushal G. P., Portilla D., Megyesi J., Price P. M., Safirstein R. L. (2008) Cellular mechanisms of nephrotoxicity. In *Clinical Nephrotoxins* (Broe M. E. D., Porter G. A., Bennett W. M., Deray G., eds.), pp. 155–170, Springer, New York, NY, USA.

- Arany I., Safirstein R. L. (2003) Cisplatin nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* **23**, 460–464.
- Balter L., Gibson D. (2005) Mass spectrometric studies of the formation and reactivity of trans-[PtCl₂(Am) (piperidinopiperidine)] center dot HCl complexes with ubiquitin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3666–3672.
- Baxter-Lowe L. A., Guo J. Z., Bergstrom E. E. and Hokin L. E. (1989) Molecular cloning of the Na,K-ATPase α -subunit in developing brine shrimp and sequence comparison with higher organisms. *FEBS Lett.* **257**, 181-187.
- Biemann K. (1988) Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **16**, 99–111.
- Blanco G and Mercer RW (1998) Isozymes of the Na,K-ATPase heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **275**, F633-F650.
- Bolis G., Favalli G., Danese S., Zanaboni F., Mangili G., Scarabelli C., Tateo S., Valsecchi M., Scarfone G., Richiardi G., Frigerio L., Melpignano M., Villa A., Parazzini F. (1997) Weekly cisplatin given for 2 months versus cisplatin plus cyclophosphamide given for 5 months after cytoreductive surgery for advanced ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **15**, 1938–1944.
- Boulikas T. (1992) Poly(ADP-ribose) synthesis in blocked and damaged cells and its relation to carcinogens. *Anticancer Res.* **12**, 885–898.
- Boyer P.D. (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749.
- Bragg P. D., Hou C. (1990) Feaction of membrane-bound F₁-adenosine triphosphatase of *Escherichia coli* chemical ligands and the symmetry of β subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 216-222.
- Brown B.S. (1996) Biological membranes. Schoul of Biological Science, 2.205 Stopford Building, University of Manchester, Oxford Road, Manchester M 13 9PT, U.K., The Biochemical Society, ISBN 0 904498 32 8
- Burger H., Nooter K., Boersma A. W. M., Kortland C. J., Stoter G. (1997) Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int. J. Cancer* **73**, 592–599.
- Casini A., Gabbiani C., Mastrobuoni G., Messori L., Moneti G., Pieraccini G. (2006) Exploring metallodrug-protein interactions by ESI mass spectrometry: The reaction of anticancer platinum

drugs with horse heart cytochrome *c*. *ChemMedChem* **1**, 413-417.

Casini A., Mastrobuoni G., Ang W. H., Gabbiani C., Pieraccini G., Moneti G., Dyson P. J., Messori L. (2007) ESI-MS characterisation of protein adducts of anticancer ruthenium(II)-arene PTA (RAPTA) complexes. *ChemMedChem* **2**, 631–635.

Ciarimboli G., Deuster D., Knief A., Sperling M., Holtkamp M., Edemir B., Pavenstadt H., Lanvers-Kaminsky C., am Zehnhoff-Dinnesen A.; Schinkel A. H., Koepsell H., Jurgens H., Schlatter E. (2010) Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am. J. Pathol.* **176**, 1169–1180.

Ciarimboli G., Ludwig T., Lang, D.; Pavenstadt H., Koepsell H., Piechota H. J., Haier J., Jaehde U., Zisowsky J., Schlatter E. (2005) Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am. J. Pathol.* **167**, 1477–1484.

Clausen T. (1996) The Na⁺,K⁺ pump in skeletal muscle: quantification, regulation and functional significance. *Acta Physiol. Scand.* **156**, 227-235.

Collins J.H., Leszyk J. (1987) The „γ subunit“ of Na,K-ATPase: A small, amphiphilic protein with a unique amino acid sequence. *Biochemistry-us* **26**, 8665-8668.

Coppin C., Gospodarowicz M., James K., Tannock I., Zee B., Carson J., Peter J., Sullivan D. (1996) Improved local control of invasive bladder cancer by concurrent cisplatin and preoperative or definitive radiation. *J. Clin. Oncol.* **14**, 2901–2907.

Cox M. C., Barnham K. J., Frenkiel T. A., Hoeschele J. D., Mason A. B., He Q.-Y., Woodworth R. C., Sadler P. J. (1999) Identification of platination sites on human serum transferrin using C-13 and N-15 NMR spectroscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.* **4**, 621–631.

Cullen K. J., Yang Z., Schumaker L., Guo Z. (2007) Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 43–50.

de Jongh F. E., Verweij J., Loos W.J., de Wit R., de Jonge M. J. A., Planting, A. S. T., Nooter K., Stoter G., Sparreboom A. (2001) Body-surface area-based dosing does not increase accuracy of predicting cisplatin exposure. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3733–3739.

de Jongh F.E., van Veen R.N., Veltman S.J., de Wit R., van der Burg M.E.L., van den Bent M.J., Planting A., Graveland W.J., Stoter G., Verweij J. (2003) Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: Analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br. J. Cancer* **88**, 1199–1206.

DeConti R. C., Toftness B. R., Lange R. C., Creasey W. A. (1973) Clinical and pharmacological studies with *cis*-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* **33**, 1310–1315.

Dempski R. E., Friedrich T., Bamberg E. (2005) The β -subunit of the Na^+/K^+ -ATPase follows the conformational state of the holoenzyme. *J. Gen. Phys.* **125**, 505-520 .

Dempski R. E., Hartung K., Friedrich T., Bamber E. (2006) Fluorometric measurements of intermolecular distances between the α - and β -subunits of the Na^+/K^+ -ATPase. *J. Biol.Chem.* **281**, 36338-36346.

Denison C., Kirkpatrick D. S., Gygi S. P. (2005) Proteomic insights into ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 69–75.

Dostanic-Larson I., Lorenz J. N., Van Huysse J. W., Neumann J. C., Moseley A. E., and Lingrel J. B. (2006) Physiological role of the α_1 - and α_2 -isoforms of the Na^+/K^+ -ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am. J. Physiol. Regul. Intel. Comp.Physiol.* **290**, R524-R528.

Edelhoch H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry-us* **6**, 1948-1954.

Ellman G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.

Endo T., Kimura O., Sakata M. (2000) Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line. *Toxicology* **146**, 187–195.

Fenn J. B. (2003) Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angew. Chem., Int. Ed.* **42**, 3871–3894.

Fenn, J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spektrometry of large biolmolecules. *Science* **246**, 64–71.

Filipski K. K., Loos, W.J., Verweij J., Sparreboom A. (2008) Interaction of Cisplatin with the human organic cation transporter 2. *Clin. Cancer Res.* **14**, 3875–3880.

Filipski K. K., Mathijssen R. H., Mikkelsen T. S., Schinkel A. H., Sparreboom A. (2009) Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin. Pharmacol.Ther.* **86**, 396–402.

Galanski M., Arion V. B., Jakubec M. A., Keppler B. K. (2003) Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 2078–2089.

Garbis S., Lubec G., Fountoulakis M. (2005) Limitations of current proteomics technologies. *J. Chromatogr. A* **1077**, 1-18.

Garty H. and Karlish S. J. D (2006) Role of FXYD proteins in ion transport. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 431-459

Gatzemeier U., von Pawel J., ten Velde G., Mattson K., DeMarinis F., Harper P., Salvati F., Robinet G., Lucenti A., Bogarets J., Gallant G. (2000) Phase III comparative study of high-dose cisplatin versus a combination of paclitaxel and cisplatin in patients with advanced non-smallcell lung cancer. *J.Clin. Oncol.* **18**, 3390–3399.

Geering K. (2001) The functional role of β -subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 425-438.

Geering K. (2005) Function of FXYD proteins, regulators of Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**(6), 387-392.

Geering K. (2006) FXYD proteins: new regulators of Na, K-ATPase. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **290**, 241-250.

Geering K., Theulaz I., Verrey F., Haeuptle M.T., Rossier, B. C. (1989) A role for the beta-subunit in the expression of functional $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in *Xenopus* oocytes *Am. J. Physiol.* **257**, C851-C858.

Gibson D., Costello C. E. (1999) A mass spectral study of the binding of the anticancer drug cisplatin to ubiquitin. *Eur. J. Mass Spectrom.* **5**, 501–510.

Giotta G. J. (1975) Native $(\text{Na}^{++}\text{K}^+)$ -dependent adenosinetriphosphatase has 2 trypsin-sensitive sites. *J. Biol. Chem.* **250**, 5159-5164.

Gogas H., Shapiro F., Aghajanian C., Fennelly D., Almadrones L., Hoskins W. J., Spriggs D. R. (1996) The impact of diabetes mellitus on the toxicity of therapy for advanced ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **61**, 22–26.

Goldstein R. S., Mayor G. H. (1983) Minireview. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci.* **32**, 685–690.

Green S. (1995) PPAR: a mediator of peroxisome proliferator action. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* **333**, 101-105.

Grishin A. V., Sverdlov V. E., Kostina M. B., Modyanov N. N. (1994) Cloning and

characterization of the entire cDNA encoded by ATPAL1 – a member of the human Na,K/H,K-ATPase gene family. *FEBS Lett.* **349**, 144-150.

Groessl M., Hartinger C. G., Egger A., Keppler B. K. (2006) Proceedings of the 9th International Symposium on Metal ions in Biology and Medicine held in Lisboa Portugal, 21-24 May 2006. In *Metal Ions in Biology and Medicine, vol. 9*, Lohn Libbey Eurotext, pp. 111-116, Paris.

Gullans S. R., Mandel L. J. (2000) Coupling of energy transport in proximal and distal nephron. In *The Kidney: Physiology and Pathophysiology, 3rd ed., Vol. 1* (Seldin D. W., Giebisch G., eds.), pp. 445–482, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA.

Gullo J. J., Litterst C. L., Jaguára P. J., Sikic B. I., Hoth D. F., Woolley, P. V. (1980) Pharmacokinetics and protein-binding of *cis*-dichlorodiammine platinum(II) administered as a one-hour or as a 20-hour infusion. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **5**, 21–26.

Harris W. E., Stahl W. L. (1988) Origin of the gamma-polypeptide of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys Acta* **942**, 236-244.

Hartinger C. G. Ang W. H. Casini A. Messori L. Keppler B. K., Dyson P. J. (2007) Mass spectrometric analysis of ubiquitin-platinum interactions of leading anticancer drugs: MALDI versus ESI. *J. Anal. At. Spectrom.* **22**, 960-967.

Hartinger C. G., Zorbas-Seifried S., Jakubec M. A., Kanast B., Zorbas H., Keppler B. K. (2006) From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J. Inorg. Biochem.* **100**, 891–904.

Hartinger Ch. G., Tsybin Y. O., Fuchser J., Dyson P. J. (2008) Characterization of platinum anticancer drug protein-binding sites usány a top-down mass spectromteric approach. *Inorg. Chem.* **47**, 17-19.

Hartmann J. T., Fels L. M., Knop S., Stolt H., Kanz L., Bokemeyer C. (2000) A randomized trial comparing the nephrotoxicity of cisplatin/ifosfamide-based combination chemotherapy with or without amifostine in patients with solid tumors. *Invest. New Drugs* **18**, 281–289.

Hartmann J. T., Kollmannsberger C., Kanz L., Bokemeyer C. (1999) Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int. J. Cancer* **83**, 866–869.

Hartmann J. T., Lipp H.-P. (2003) Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin.*

Pharmacother. **4**, 889–901.

Herrera V. L., Emanuel J. R., Ruiz-Opazo N., Levenson R., Nadal-Ginard B. (1987) Origin of the gamma-polypeptide of the Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Cell. Biol.* **105**, 1855-1865.

Hirama M., Isonishi S., Yasuda M., Ishikawa H. (2006) Characterization of mitochondria in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **16**, 997–1002.

Holzer A. K., Samimi G., Katano K., Naerdemann W., Lin X., Safaei R., Howell S. B. (2004) The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **66**, 817–823.

Horisberger J. D., Lemas V., Kraehenbuhl J. P., Rossier B. C. (1991) Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 565 -584.

Hoskins P., Eisenhauer E., Vergote I., Dubuc-Lissoir J., Fisher B., Grimshaw R., Oza A., Plante M., Stuart G., Vermorken J. (2000) Phase II feasibility study of sequential couplets of Cisplatin/Topotecan followed by paclitaxel/cisplatin as primary treatment of advanced epithelialovarian cancer: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study. *J. Clin. Oncol.* **18**, 4038–4044.

Chen Y., Guo Z., Sadler P. J. (1999). Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. In *Cisplatin, Vol. 4* (B. Lippert, ed.), pp. 293–318, WileyVCH, Weinheim.

Chibalin A. V., Vasilets L. A., Hennekes H., Pralong D., Geering K. (1992) Phosphorylation of Na,K-ATPase alpha-subunits in microsomes and in homogenates of *Xenopus* oocytes resulting from the stimulation of protein kinase A and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **267**, 22378-22384.

Ishida S., Lee J., Thiele D.J., Herskowitz I. (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14298–14302.

Jaisser F., Canossa C. M., Horisberger J. D., Rossier B. C. (1992) Primary sequence and functional expression of a novel ouabain-resistant Na,K-ATPase. The β subunit modulates potassium activation of the Na,K-pump. *J. Biol. Chem.* **267**, 16895 – 16903.

Janovská M., (2010) Interaction of small organic molecules with the sodium pump – Doctoral thesis.

Jörgensen P. L. (1975) Purification and characterization of (Na⁺,K⁺)-ATPase. 5. conformational changes in enzyme. Transition between Na-form and K-form studied with tryptic digestion as a

tool. *Biochim. Biophys. Acta* **401**, 399-415.

Jørgensen P. L. (1992) Functional domains of Na,K-ATPase; conformational transitions in alpha-subunit and ion occlusion. *Acta Physiol. Scand.* **146**, 89-95.

Jørgensen P. L., Andersen J. P. (1988) Structural basis for E₁-E₂ conformational transitions in Na,K-pump and Ca-pump proteins. *J. Membr. Biol.* **103**, 95-120.

Jørgensen P. L., Hakansson K. O., Karlisch S. J. D. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 817-849.

Jørgensen P. L., Jørgensen J. R., Pedersen P. A. (2001) Role of conserved TGDGVND-loop in Mg²⁺ binding, phosphorylation, and energy transfer in Na,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 367-377.

Jørgensen P. L., Pedersen P. A. (2000) Structure-function relationships of Na, ATP, or Mg²⁺ binding and energy transduction in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**, 57-74.

Jung Y., Lippard S. J. (2007) Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem. Rev.* **107**, 1387-1407.

Kano I., Nagai F., Satoh K., Ushiyama K., Nakao T., Kano K. (1989) Structure of the α_1 subunit of horse Na,K-ATPase gene. *FEBS lett.* **250**, 91-98.

Kaplan J. H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 511-535.

Kaplan J. H. (2005) The sodium pump and hypertension: A physiological role for the cardiac glycoside binding site of the Na,K-ATPase. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(44), 15723-15724.

Karas M., Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301.

Karlisch S. J. D., Goldshleger R., Jørgensen P.L. (1993) Location of Asn⁸³¹ of the α chain of Na/K-ATPase at the cytoplasmic surface. Implication for topological models. *J. Biol. Chem.* **268**, 3471-3478.

Kawakami K., Noguchi S., Noda M., Takahashi H., Ohta T., Kawamura M., Gojima H., Nagano K., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numai S. (1985) Primary structure of the α subunit of *Torpedo californica* (Na⁺+K⁺)ATPase deduced from cDNA sequence. *Nature* **316**, 733-736.

Kawakami K., Ohta T., Nojima H., Nagano K. (1986) Primary structure of the alpha-subunit of

- human Na,K-ATPase deduced from cDNA sequence. *J. Biochem.* **100**, 389-397.
- Kawamura M., Noguchi S. (1991) in *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation* (Kaplan J. H., De-Weer P., eds.), pp. 45-62, The Rockefeller University Press, New York, USA.
- Khalaila I., Allardyce C. S., Verma C. S., Dyson P. J. (2005) A mass spectrometric and molecular modelling study of cisplatin binding to transferrin. *ChemBioChem* **6**, 1788-1795.
- Khalaila I., Bergamo A., Bussy F., Sava G., Dyson P. J. (2006) The role of cisplatin and NAMI-A plasma-protein interactions in relation to combination therapy. *Int. J. Oncol.* **29**, 261–268.
- Kociba R. J., Sleight S. D. (1971) Acute toxicologic and pathologic effects of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat. *Cancer Chemother. Rep.* **55**, 1–8.
- Köksoy A. A. (2002) Na⁺/K⁺-ATPase: A Review. *J. Ankara Med. Sch.* **24** (2), 73-82.
- Kolb R., Ghazi M., Barfuss D. (2003) Inhibition of basolateral transport and cellular accumulation of cDDP and N-acetyl-L-cysteine-cDDP by TEA and PAH in the renal proximal tubule. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **51**, 132–138.
- Kruidering M., Van de Water B., de Heer E., Mulder G.J., Nagelkerke J. F. (1997) Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: Mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 638–649.
- Laughery M. D, Todd M. L., and Kaplan J. H. (2003) Mutational analysis of α - β subunit interactions in the delivery of Na,K-ATPase heterodimers to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **278**, 34794-34803.
- Lebovitz R. M., Takeyasu K. and Fambrough D. M. (1989) Molecular characterization and expression of the (Na⁺+K⁺)-ATPase α subunit in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **8**, 193-202.
- Li S., Basnakian A., Bhatt R., Megyesi J., Gokden N., Shah S.V., Portilla D. (2004) PPAR-alpha ligand ameliorates acute renal failure by reducing cisplatin-induced increased expression of renal endonuclease G. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**, F990–F998.
- Li S., Wu P., Yarlagadda P., Vadjunec N. M., Proia A. D., Harris R. A., Portilla D. (2004) PPAR alpha ligand protects during cisplatin-induced acute renal failure by preventing inhibition of renal FAO and PDC activity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F572–F580.
- Lingrel J. B., Argüello J. M., Van Huysse J., Kuntzweiler T. A. (1997) Cation and cardiac

- glycoside binding sites of the Na,K-ATPase. *Ann. Ny. Acad. Sci.* **834**, 194-206.
- Lingrel J. B., Orłowski J., Shull M. M., Price E. M. (1990) Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **38**, 37-89.
- Loehrer P. J., Gonin R., Nichols C. R., Weathers T., Einhorn L. H. (1998) Vinblastine plus ifosfamide plus cisplatin as initial salvage therapy in recurrent germ cell tumor. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2500–2504.
- Ludwig T., Riethmüller C., Gekle, M., Schwerdt G., Oberleithner H. (2004) Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int.* **66**, 196–202.
- Lutsenko S. Kaplan J.H. (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry-us* **34**, 15607-15613.
- Madias N. E., Harrington J. T. (1978) Platinum nephrotoxicity. *Am. J. Med.* **65**, 307–314.
- Mandic A., Hansson J., Linder S., Shoshan M.C. (2003) Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 9100–9106.
- McDonough A. A., Geering K. and Farley R.A. (1990) The sodium pump needs its beta subunit. *FASEB J.* **4**, 1598-1605.
- Mercer R W., Biemesderfer D., Bliss D. P., Collins J. H., Forbush B. (1991) in *The Sodium Pump: Recent Developments* (DeWeer, P., Kaplan, J., eds.), pp. 37-41, Rockefeller University Press, New York.
- Miller R. P., Tadagavadi R. K., Ramesh G., Reeve W. B. (2010) Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins* **2**, 2490-2518.
- Modyanov N., Lutsenko S., Chertova E., Efremov R., Gulyaev, D. (1992) Transmembrane organization of the Na⁺/K⁺-ATPase molecule.. *Acta Physiol. Scand.* **146**, 49-58
- Moller J. V., Juul B., le Maire M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**, 1-51.
- Morth J. P., Pedersen B. P., Toustrup-Jensen M. S., Sorensen T. L. M., Petersen J., Andersen J. P., Vilsen B., Nissen P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* **450**, 1043-1050.
- Morth J. P., Poulsen H., Toustrup-Jensen M. S., Schack V. R., Egebjerg J., Andersen J. P.,

- Vilsen B., Nissen P. (2009) The structure of the Na⁺,K⁺-ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations. *Phil. Trans. R. Soc. B* **364**, 217-227
- Najajreh Y., Ardeli-Tzaraf Y., Kašpárkova J., Heringova P., Prilutski D., Balter L., Jawbry S., Khazanov E., Perez J. M., Barenholz Y., Brabec V., Gibson D. (2006) Interactions of platinum complexes containing cationic, bicyclic, nonplanar piperidinopiperidine ligands with biological nucleophiles. *J. Med. Chem.* **49**, 4674–4683.
- Najajreh Y., Peleg-Shulman T., Moshel O., Farrell N., Gibson D. (2003) Ligand effects on the binding of cis- and trans-[PtCl(2)Am1Am2] to proteins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 167–175.
- Nashef A. S., Osuga D. T., Fernet R.E. (1977) Determination of hydrogen-sulfide with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), N-ethylmaleimid, and parachloromercuribenzoate. *Anal. Biochem.* **79**, 394-405.
- Noda K., Nishiwaki Y., Kawahara M., Negoro S., Sugiura T., Yokoyama A., Saijo N.(2002) Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **346**, 85–91.
- Olivero O. A., Chang P. K., LopezLarrazza D. M., SeminoMora M. C., Poirier M. C. (1997) Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ.Mutagen.* **391**, 79–86.
- Ovchinnikov J. A., Modyanov N. N., Broude N. E., Petrukhin K. E., Grishin A. V., Arzamazova N. M., Aldanova N. A., Monastyrskaya G. S., Sverdlov E .D. (1986) Pig kidney Na⁺,K⁺-ATPase. Primary structure and spatial organization. *FEBS lett.* **201**, 237-245.
- Ovchinnikov Y. A., Luneva N. M., Arystarkhova E. A., Gevondyan N. M. Arzamazova N. M., Kozhich A .T., Nesmeyanov V. A., Modyanov N. N. (1988) Topology of Na⁺,K⁺-ATPase. Identification of the extracellular and intracellular hydrophilic loops of the catalytic subunit by specific antibodies.. *FEBS lett.* **227**, 230-234.
- Pabla N., Murphy R. F., Liu K., Dong Z. (2009) The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**, F505–F511.
- Palmgren M. G, Axelsen K. B. (1998b) Evolution of substrate specificities in the P-type Atlase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**, 84-101.

Palmgren M. G., Axelsen K. B. (1998a) Evolution of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 37-45.

Pascoe J. M., Roberts J. J. (1974) Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1359–1365.

Pedersen P. A., Jörgensen J. R., and Jörgensen P. L. (2000) Importance of conserved α -subunit segment 709GDGVND for binding, phosphorylation, and energy transduction in Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275** (48), 37588-37595.

Pedersen P. A., Rasmussen J. H., Jörgensen P. L. (1996) Expression in high yield of pig alpha 1 beta 1 Na,K-ATPase and inactive mutants D369N and D807N in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 2514-2522.

Pedersen P. L., Carafoli E. (1987a) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Sciences* **12**, 146-150.

Pedersen P. L., Carafoli E. (1987b) Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. *Trends Biochem. Sciences* **12**, 186-189.

Peleg-Shulman T., Gibson D. (2001) Cisplatin-protein adducts are efficiently removed by glutathione but not by 5'-guanosine monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3171-3172.

Peleg-Shulman T., Najajreh Y., Gibson D. (2002) Interactions of cisplatin and transplatin with proteins. Comparison of binding kinetics, binding sites and reactivity of the Pt-protein adducts of cisplatin and transplatin towards biological nucleophiles. *J. Inorg. Biochem.* **91**, 306-311.

Planting A., Catimel G., de Mulde P., de Graeff A., Hoppener F., Verweij J., Oster W., Vermorken J. (1999) Randomized study of a short course of weekly cisplatin with or without amifostine in advanced head and neck cancer. *Ann. Oncol.* **10**, 693–700.

Polec-Pawlak K., Abramski J. K., Semanova O., Hartinger C. G., Timerbaev A. R., Keppler B. K., Jarosz M. (2006) Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis - inductively coupled plasma-mass spectrometry: A further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins. *Electrophoresis* **27**, 1128–1135.

Pongratz M., Schluga P., Jakubec M. A., Arion V. B., Hartinger C. G., Allmaier G., Keppler B. K. (2004) Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium

coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 46–51.

Portilla D., Dai G., McClure T., Bates L., Kurten R., Megyesi J., Price P., Li S. (2002) Alterations of PPAR α and its coactivator PGC-1 in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int.* **62**, 1208–1218.

Post R. L., Hegyvary C., Kume S. (1972) Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **247**, 6530-6540.

Price E. M., Lingrel J. B. (1988) Structure-function relationships in the Na,K-ATPase α subunit: Site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme. *Biochemistry-us* **27**, 8400-8408.

Price E. M., Rice D. A., Lingrel J. B. (1990) Structure-function studies of Na,K-ATP. Site-directed mutagenesis of the border residue from the H1-H2 extracellular domain of the α subunit. *J. Biol. Chem.* **265**, 6638-6641.

Pritchard J., Brown J., Shafford E., Perilongo G., Brock P., Dicks-Mireaux C., Keeling J., Phillips A., Vos A., Plaschkes J. (2000) Cisplatin, doxorubicin, and delayed surgery for childhood hepatoblastoma: A successful approach — results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3819–3828.

Qian W., Nishikawa M., Haque A. M., Hirose M., Mashimo M., Sato E., Inoue M. (2005) Mitochondrial density determines the cellular sensitivity to cisplatin-induced cell death. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C1466–C1475.

Raj G. V., Iasonos A., Herr H., Donat S. M. (2006) Formulas calculating creatinine clearance are inadequate for determining eligibility for cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3095–3100.

Reece P. A., Stafford I., Russell J., Khan M., Gill P. G. (1987) Creatinine clearance as a predictor of ultrafilterable platinum disposition in cancer patients treated with cisplatin: Relationship between peak ultrafilterable platinum plasma levels and nephrotoxicity. *J. Clin. Oncol.* **5**, 304–309.

Rose P., Bundy B., Watkins E., Thigpen J., Deppe G., Maiman M., Clarke-Pearson D., Insalaco S. (1999) Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1144–1153.

Rosenberg B., Vancamp L., Krigas T. (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698–699.

Rosenberg B.; VanCamp L., Trosko J. E., Mansour V. H. (1969) Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature* **222**, 385–386.

Sadzuka Y., Shimizu Y., Takino Y., Hirota S. (1994) Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat by inducers and an inhibitor of glutathione S-transferase. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 453–459.

Safirstein R., Miller P., Guttenplan J. B. (1984) Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int.* **25**, 753–758.

Sachs G., Besancon M., Shin J. M., Mercier F., Munson K., Persey S. (1992) Structural aspects of the gastric H,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 301-308.

Santoso J. T., Lucci J. A. III, Coleman R. L., Schafer I., Hannigan E.V. (2003) Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: A randomized trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **52**, 13–18.

Sastry J., Kellie S. J. (2005) Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **22**, 441–445.

Scott L. A., Madan, E., Valentovic M. A. (1989) Attenuation of cisplatin nephrotoxicity by streptozotocin-induced diabetes. *Fundam. Appl. Toxicol.* **12**, 530–539.

Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. (2009) Crystal structure of the sodiumpotassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* **459**, 446-451

Shull G.E. and Greeb J. (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na^+ , K^+ - and other cation transport ATPases. *J. Biol. Chem.* **263**, 8646-8657.

Shull G.E., Greeb J. and Lingrel J.B. (1986) Molecular cloning of three distinct forms of the Na^+ , K^+ -ATPase alpha-subunit from rat brain. *Biochemistry-us* **25**, 8125-8132

Shull G.E., Schwartz A. and Lingrel J.B. (1985) Amino-acid sequence of the catalytic subunit of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase deduced from a complementary DNA. *Nature* **316**, 691-695.

Schönrock C., Morley S. D., Okawara Y., Lederis K., Richter D. (1991) Sodium and potassium ATPase of the teleost fish *Catostomus commersoni*. Sequence, protein structure and

evolutionary conservation of the alpha-subunit. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **372**, 279-286.

Skou J. C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 394-401.

Stewart D. J., Dulberg C. S., Mikhael, N. Z., Redmond M. D., Montpetit V. A., Goel, R. (1997) Association of cisplatin nephrotoxicity with patient characteristics and cisplatin administration methods. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **40**, 293–308.

Sulyok M., Hann S., Hartinger C. G., Keppler B. K., Stingeder G., Koellensperger G. (2005) Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium (III) compound with plasma proteins. *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 856– 863.

Sweadner K. J., Rael E. (2000) The FXYD gene family of small ion transport regulators of channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomic* **68**, 41-56.

Taguchi T., Nazneen A., Abid M. R., Razzaque M. S. (2005) Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib. Nephrol.* **148**, 107–121.

Takeyasu K., Lemas V., Fambrough D. M. (1990) Stability of the Na(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit isoforms in evolution. *Am. J. Physiol.* **259**, C619-C630.

Tanaka K. (2003) The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). *Angew. Chem., Int. Ed.* **42**, 3861–3870.

Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yohida T. (1988) Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2**, 151–153.

Therien A. G., Blostein R. (2000) Mechanism of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C541-C566.

Timerbaev A. R., Aleksenko S. S., Polec-Pawlak K., Ruzik R., Semanova O., Hartinger C. G., Oszwaldowski S., Galanski M., Jarosz M., Keppler B. K. (2004) Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin. *Electrophoresis* **25**, 1988-1995.

Timerbaev A. R., Hartinger C. G., Aleksenko S. S., Keppler B. K. (2006) Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem. Rev.* **106**, 2224-2248.

- Townsend D. M., Deng M., Zhang L., Lapus M. G., Hanigan, M. H. (2003) Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1–10.
- Townsend D. M., Hanigan M. H. (2002) Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 142–148.
- Townsend D. M., Tew K. D., He L., King J. B., Hanigan M. H. (2009) Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed. Pharmacother.* **63**, 79–85.
- Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405** (6787), 647-655.
- Vasilets L. A., Schwarz W. (1993) Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1154**, 201-222.
- Verrey F., Kairouz P., Schaerer E., Fuentes P., Geering K., Rossier B. C., Kraehenbuhl J.-P. (1989) Primary sequence of *Xenopus laevis* Na⁺-K⁺-ATPase and its localization in A6 kidney cells. *Am. J. Physiol.* **256**, F1034-F1043.
- Vijay-Kumar S., Bugg C. E., Cook W. J. (1987) Structure of the ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **194**, 531-544.
- Wang D., Lippard S. J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 307–320.
- Wang F., Bella J., Parkinson J. A., Sadler P. J. (2005) Competitive reactions of a ruthenium arene anticancer complex with histidine, cytochrome c and an oligonucleotide. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 147–155.
- Woo A. L., James P. F., Lingrel J. B. (2000) Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 20693-20699.
- Xu C., Rice W. J., Wanzhong H., Stokes D. L. (2002) A structural model for the catalytic cycle of Ca²⁺-ATPase. *J. Mol. Biol.* **316**, 201-211.
- Xu K. Y. (2005) Activation of (Na⁺+K⁺)-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **338**, 1669-1677.
- Yao X., Panichpisal K., Kurtzman N., Nugent K. (2007) Cisplatin nephrotoxicity: A review. *Am. J. Med. Sci.* **334**, 115–124.

Yonezawa A., Masuda S., Yokoo S., Katsura T., Inui K.-i. (2006) Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 879–886.

Zabet-Moghaddam M., Kawamura T., Yatagai E., Niwayama S. (2008) Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of peptides modified with N-ethylmaleimide or iodoacetanilide *Bioorg. Med.Chem.Lett* **18**, 4891-4895.

Zhang L., Hanigan M. H. (2003) Role of cysteine S-conjugate β -lyase in the metabolism of cisplatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 988–994.

Zhao T., King F. L. (2010) A mass spectrometric comparison of the interactions of cisplatin and transplatin with myoglobin. *J. Inorg. Biochem.* **104**, 186-192.

Zhao T., King F. L. (2011) Mass-spectrometric characterization of cisplatin binding sites on native and denaturated ubiquitin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 633-639.

8 Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
AKI	„acute kidney injury“ - akutní selhání ledvin
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
C45	cytoplazmatická klička Na^+/K^+ -ATPasy lokalizovaná mezi čtvrtým a pátým transmembránovým helixem její α -podjednotky
Ca^{2+} -ATPasa	Ca^{2+} -adenosintrifosfatasa
CDDP	cisplatina
Da	dalton
DCCD	dicyklokarbodiimid
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou kyselina)
DTT	dithiotreitol
E78	extracelulární klička Na^+/K^+ -ATPasy lokalizovaná mezi sedmým a osmým transmembránovým helixem její α -podjednotky
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GGT	gamma-glutamyl-transpeptidasa
H^+/K^+ -ATPasa	H^+/K^+ -adenosintrifosfatasa
His-Tag	histidinová kotva (sekvence šesti a více histidinů za sebou na C- nebo N-konci proteinu)
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
IAA	jodoacetamid
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
K_D	disociační konstanta
K_m	Michaelisova konstanta
LB médium	Luria Broth médium
m/z	poměr hmotnosti ku náboji

MALDI-TOF MS	„Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry“
MALDI-TOF/TOF	MALDI-TOF v tandemovém uspořádání
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)ethansulfonová kyselina
Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	Na ⁺ /K ⁺ - adenosintrifosfatasa
NEM	<i>N</i> -ethylmaleimid
OD ₆₀₀	optická densita při 600 nm
PMF	peptidové mapování („peptide mass fingerprinting“)
PMSF	fenylmethansulfonylchlorid
PPAR- α	„Perixisome proliferator activated receptors“
rpm	otáčky za minutu
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného („sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis“)
SERCA	sarko(endo)plazmatická Ca ²⁺ -ATPasa
SNP	nesynonymní jednonukleotidový polymorfismus
TDDP	transplatina
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	„wild-type“ sekvence
α Mx	x-tý transmembránový helix α -podjednotky Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy (x je číslo)
β M	transmembránový helix β -podjednotky Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy
γ M	transmembránový helix γ -podjednotky Na ⁺ /K ⁺ -ATPasy