

## VYUŽITIE METÓDY ELISA NA ŠTÚDIUM ENZÝMOVEJ HYDROLÝZY BUTYRYLCHOLÍNESTERÁZY V BIOLOGICKOM MATERIÁLI

KATARÍNA TARGOŠOVÁ, MATEJ KUČERA  
a ANNA HRABOVSKÁ

Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta UK, 032 32 Bratislava  
mrvova.kaja@gmail.com

Došlo 30.7.15, prijaté 26.11.15.

Kľúčové slová: butyrylcholínesteráza, metóda ELISA, protilátky

### Úvod

Butyrylcholínesteráza (BChE, E.C. 3.1.1.8) tvorí spolu s acetylcholínesterázou (AChE, E.C. 3.1.1.7) skupinu enzýmov, označovaných ako cholínesterázy (3.1.1)<sup>1</sup>. Tie sú schopné katalyzovať hydrolyzu acetylcholínu na cholín a kyselinu octovú. Aj napriek tomu, že ľudské telo produkuje 10násobne väčšie množstvo BChE ako AChE, je presná fyziologická funkcia tohto enzýmu neznáma<sup>2</sup>. Mnohí pripisujú BChE protektívne vlastnosti, pretože chráni organizmus pred syntetickými a prírodnými neurotoxínmi<sup>3</sup>. Väčšina informácií, ktoré sú známe ohľadne enzýmovej štruktúry a kinetiky BChE, boli popísané za pomoci rekombinantného enzýmu. V súčasnosti je však v popredí vedeckého záujmu natívny enzým a to hlavne pre jeho spojitosť s mnohými patologickými procesmi. Cieľom mnohých štúdií je preto snaha o čo najdôkladnejší popis zmien v správaní BChE *in vivo*, ktoré sprevádzajú rôzne ochorenia. Avšak v súčasnosti dostupné analytické a biochemické metódy vyžadujú pri sledovaní kinetických vlastností purifikovaný enzým. V prípade cholínesteráz je purifikácia časovo a finančne náročný proces, pričom na izoláciu je potrebné veľké množstvo východzieho materiálu. Napríklad pre prípravu približne 100 mg čistého proteínu (so špecifickou aktivitou 720 U/mg) je potrebných až 70–100 litrov ľudskej plazmy<sup>4</sup>. Štúdium BChE v biologických vzorkách s malým objemom (mililitre – mikrolitre) je teda z tohto hľadiska nemožné. Nenáročné riešenie poskytuje izolácia proteínu za pomoci protilátok. V našej štúdií popisujeme metódu ELISA s použitím nových vysoko selektívnych a špecifických protilátok voči ľudskej BChE<sup>5,6</sup>, ktorá je vhodná na izoláciu BChE z malých objemov ľudskej plazmy.

### Experimentálna časť

#### Príprava biologického materiálu

Na základe informovaného súhlasu a po schválení etickou komisiou bola zdravým dobrovoľníkom odobraná ľudská kapilárna krv. Na odber boli použité kolekčné skúmavky ošetrené 500 jednotkami heparínu (Microvette 200LH, Sarstedt # 20.1292) a odobratá krv bola následne centrifugovaná po dobu 10 min pri 11 000 ot./min pri izbovej teplote. Odobraný supernatant (plazma) bol zmrazený v tekutom dusíku a uchovávaný pri teplote –80 °C.

#### Metóda ELISA

Metóda ELISA sa zakladala na ukotvení sekundárnych protilátok (purifikované protilátky IgG + IgM, Jackson ImmunoResearch laboratories, # 115-005-003) v množstve 1 µg na jamku v mikrotitračných doštičkách PLATE IMMUNO F 96 MAXI PINCHBAR (VWR International GmbH Austria, 475094). Po inkubácii 48 h pri teplote 4 °C sme voľné väzbové miesta blokovali 0,1% roztokom albumínu (Sigma-Aldrich, # A2153) v 0,1 mol l<sup>-1</sup> fosfátovom tlmivom roztoku s obsahom 0,15 mol l<sup>-1</sup> NaCl (PBS). Blokovanie mikrotitračných platní trvalo minimálne 48 h pri teplote 4 °C. Riedenie primárnych protilátok, ako aj množstvo ľudskej plazmy, sme určili empiricky tak, ako je to popísané v stati Výsledky. Inkubácia primárnych protilátok prebiehala cez noc pri teplote 4 °C. Na záver sme pridali ľudskú plazmu vo zvolenom objeme, doplnenú na finálny objem 100 µl PBS a nechali inkubovať 6 h pri izbovej teplote. Medzi jednotlivými krokmi sme mikrotitračné doštičky premyli 9× premývacím roztokom (0,01 mol l<sup>-1</sup> fosfátový tlmivý roztok, 0,5% TWEEN80) v automatizovanej premývačke (ELx50<sup>TM</sup>, Biotek).

#### Detekcia aktivity BChE

Aktivitu zachyteného enzýmu a priebeh enzýmovej hydrolyzy sme sledovali štandardnou spektrofotometrickou metódou podľa Ellmana<sup>7</sup> s použitím substrátu 1 mmol l<sup>-1</sup> jodidu butyryltiocholínu v prítomnosti 0,5 mmol l<sup>-1</sup> 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoovej kyseliny (Ellmanovho činidla) a tlmivého roztoku HEPES (kyselina (4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétansirová), pH 7,4. Taktiež sme na detekciu aktivity enzýmu použili fluorimetrické meranie s 1 mmol l<sup>-1</sup> indoxylacetátom riedeným s PBS (emisný filter = 395 nm, excitačný filter = 470 nm). Obidve merania boli uskutočnené v prístroji Bio-tek – Synergy<sup>TM</sup>H4 Hybrid Multi-Mode MicroplateReader.

## Výsledky a diskusia

Metóda ELISA navrhnutá na izoláciu enzýmu z biologických vzoriek

V rámci optimalizácie metodiky sme titrovali potrebné množstvo primárnych protilátok, riedenie ľudskej plazmy a stanovili koncentráciu substrátu.

Keďže sa jedná o novopripravené protilátky voči ľudskej BChE, v prvom kroku sme stanovili vhodné množstvo primárnych protilátok pre túto metodiku. Potrebné riedenie nových primárnych protilátok sme určili na základe saturačnej krivky (obr. 1), ktorá vyjadruje závislosť priemernej nameraných hodnôt absorbancie od množstva ukotvených primárnych protilátok. Ako vyplýva z lineárneho fitovania tejto krivky, k polovičnej saturácii sekundárnych protilátok (v množstve 1 µg/jamku) primárnymi protilátkami dochádza pri množstve 1,3 µg (hodnota  $K_D$ ). Pre docelenie úplnej saturácie sme zvolili 5-násobok tejto hodnoty, teda v nasledujúcich experimentoch sme používali 6,5 µg protilátky na jamku.

V rámci populácie je pre BChE typická inter-individuálna variabilita aktivity, ktorej príčiny doposiaľ nie sú známe<sup>8</sup>. Táto rozdielna aktivita enzýmu pravdepodobne vyplýva z rôznej hladiny expície a rôznych katalytických vlastností BChE. Zároveň sú katalytické vlastnosti ako aj množstvo BChE v krvi ovplyvnené fyziologickými a patologickými podmienkami v organizme a množstvom prítomných xenobiotík. Niektoré štúdie zároveň uvádzajú, že na hladinu BChE má vplyv vek, pohlavie a váha jedinca<sup>9</sup>. Na základe týchto skutočností sme v nasledujúcom kroku stanovili optimálny objem plazmy tak, aby sme predišli nedostatočnej saturácii primárnych protilátok pri nízkych koncentráciách BChE vo vzorkách. Objem ľudskej plazmy pre ELISA metódu sme určili zo saturačnej krivky, s použitím plazmy troch zdravých jedincov. K saturácii protilátok enzýmom dochádza pri použití 2,5 µl plazmy na jamku. Vzhľadom na možnú inter-individuálnu

variabilitu BChE bol objem ľudskej plazmy pre ďalšie experimenty zvolený v nadbytku, a to konkrétne 5 µl plazmy na jamku.

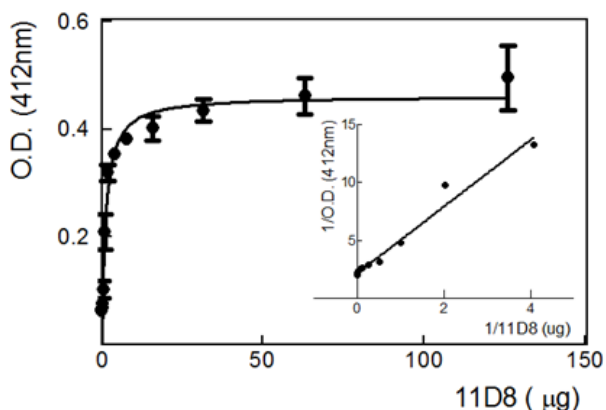
Aktivitu zachyteného enzýmu sme merali s použitím substrátu jodidu butyryltiocholínu. Hydrolyza pozitívne nabitých substrátov je sprevádzaná istými kinetickými zvláštnosťami. Nadbytok substrátu môže viesť k aktivácii (napr. pri hydrolyze acetyl-, propionyl- alebo butyryltiocholínu) alebo inhibícii (pri hydrolyze benzoyltiocholínu) BChE<sup>10</sup>. Vzhľadom k tomu, že nepoznáme presné množstvo zachyteného enzýmu v nami navrhnutej metóde ELISA, je veľmi ťažké zvoliť koncentráciu substrátu bez toho, aby sme sa vyhli ovplyvneniu aktivity BChE. A teda z dôvodu možnosti aktivácie alebo inhibície BChE pri hydrolyze jodidu butyryltiocholínu sme sledovali vplyv rôznej koncentrácie tohto substrátu na ukotvený enzým. Vhodnú koncentráciu sme vybrali na základe saturačnej krivky, a to 1 mmol l<sup>-1</sup> jodid butyryltiocholínu na jamku (obr. 2).

Štúdium enzýmovej aktivity BChE „purifikovanej“ metódou ELISA

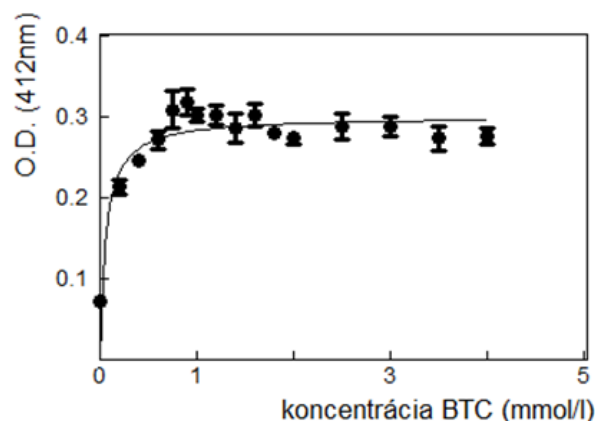
Nami optimalizovanú metodiku sme využili na sledovanie hydrolyzy substrátov BChE. Zvolili sme pritom dva rozdielne substráty, ktoré nám umožnili sledovať typické správanie BChE vo fáze pred dosiahnutím rovnovážneho stavu reakcie (pre-steady-state) a vo fáze rovnovážneho stavu enzýmovej hydrolyzy (steady-state).

*Steady-state fáza enzýmovej hydrolyzy*

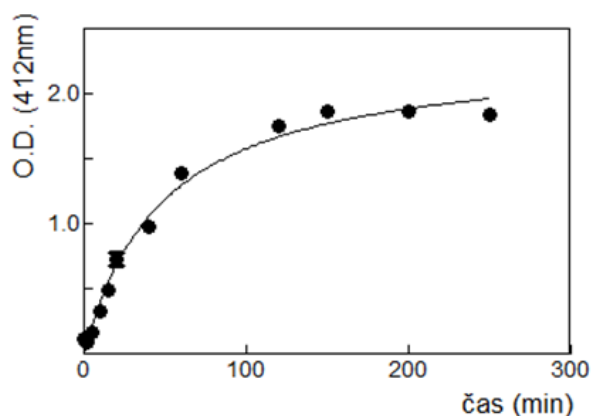
V prvom prípade sme ako substrát použili 1 mmol l<sup>-1</sup> jodid butyryltiocholínu a pozorovali či „ukotvenie“ enzýmu nevedie k zmene priebehu hydrolyzy. Hydrolyza tohto substrátu prostredníctvom BChE prebiehala, podobne ako v prípade „voľného enzýmu“, podľa modelu Michaelisa a Mentenovej. Aktívne miesto enzýmu pozostáva z katalytickej triády a to aminokyselín Ser198, His438



Obr. 1. Titrácia primárnych protilátok 11D8 voči ľudskej butyrylcholinesteráze



Obr. 2. Titrácia vhodnej koncentrácie substrátu jodidu butyrylcholínu pre hydrolyzu kotvenou butyrylcholinesterázou

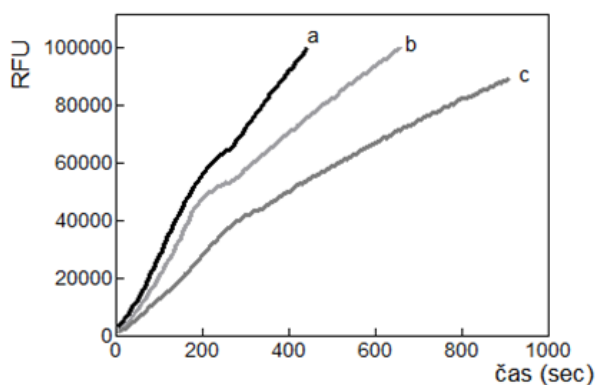


Obr. 3. Steady-state fáza enzymovej hydrolyzy jodidu butyryltiocholínu ukotvenou butyrylcholinesterázou

a Glu325 (cit.<sup>11,12</sup>). Pri enzymovej hydrolyze dochádza k prenosu elektrónov od kyseliny glutámovej cez imidazolový kruh histidínu na hydroxylovú skupinu serínu. Serín tvorí so substrátom Michaelisov komplex a následne štípe esterovú väzbu substrátu<sup>13</sup>. Podstatnou črtou modelu Michaelisa a Mentenovej je vznik steady-state fázy, teda ustáleného a rovnovážneho stavu medzi voľnou formou enzýmu a substrátu a komplexom enzým-substrát. Vzorový príklad časovej závislosti tvorby produktu uvádzame na obr. 3, kde sme pozorovali vznik steady-state fázy, a teda naviazanie BChE prostredníctvom nových primárnych protilátok neovplyvnilo jej kinetické vlastnosti a priebeh enzymovej hydrolyzy.

#### Pre-steady-state fáza enzymovej hydrolyzy

Pri sledovaní vplyvu „ukotvenia“ enzýmu na jeho enzymovú aktivitu sme ako druhý substrát použili 1 mmol l<sup>-1</sup> indoxylacetát, u ktorého BChE vykazuje zvlášť-



Obr. 4. Pre-steady state fáza enzymovej hydrolyzy (hysteretické správanie butyrylcholinesterázy) pri rôznej koncentrácii substrátu. a – 1 mmol l<sup>-1</sup> indoxylacetát, b – 0,5 mmol l<sup>-1</sup> indoxylacetát, c – 0,3 mmol l<sup>-1</sup> indoxylacetát

ne hysteretické správanie. Toto správanie sa vyznačuje niekoľkominútovou lag fázou pred dosiahnutím fázy steady-state<sup>14</sup>. Hysteretické správanie BChE je v dôsledku prítomnosti viacerých foriem enzýmu, ktoré sú navzájom v rovnováhe, pričom len jedna z nich je katalyticky aktívna<sup>15</sup>. Pri hydrolyze substituovaných benzoylcholinov je hysteréza komplexnejšia a lag fáza je navyše prekrytá tlmenými osciláciami<sup>14</sup>. Táto kinetická zvláštnosť je dôsledkom existencie rôznych konformačných izomérov a/alebo agregátov substrátu (miciel)<sup>15</sup>. Hysteretické správanie sme pozorovali aj v našich experimentoch. Na obr. 4 možno sledovať komplexnú hysterézu, ktorú v fáze pre-steady state reprezentuje indukčná lag fáza a oscilácie.

## Záver

V predloženom článku popisujeme metódu s využitím nových vysoko selektívnych a špecifických protilátok voči ľudskej BChE, ktoré umožňujú prácu s „čistým“ proteínom. Nami navrhnutá metóda je veľmi jednoduchá, spoľahlivá a nemeň správanie enzýmu a priebeh enzymovej hydrolyzy. Taktiež táto metóda poskytuje možnosť priebežného sledovania aktivity BChE v kapilárnej krvi (a teda v malých objemoch biologického materiálu), čo môže mať využitie v rôznych aspektoch.

Prvým je prínos tejto metódy v objasnení vzťahu medzi BChE a mnohými patologickými stavmi, vyvinutiu efektívnejších diagnostických a farmakoterapeutických postupov. Pomocou sledovania aktivity enzýmu môžeme odhaliť prípadný deficit BChE a uchrániť nositeľov mutantných foriem BChE pred predávkovaním a toxickým účinkom napr. kyseliny acetylsalicylovej. Súčasne testovanie aktivity BChE pred operačným zákrokom s použitím svalového myorelaxansu sukcinylcholínu by obmedzilo prípady so zástavou dýchania u pacientov s nízkou BChE aktivitou<sup>16</sup>. Popísaná metóda nachádza využitie aj v poľnohospodárstve. Bežne používané pesticídy inhibujú aktivitu BChE a ich malé dávky vedú pri vystavení organizmu k chronickým ochoreniam. Práve BChE je jediný biomarker pri intoxikácii organofosfátmi<sup>17</sup>.

*Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA 1/0855/15.*

## LITERATÚRA

- Hawkins R. D., Gunter J. M.: *Biochem. J.* 40, 192 (1946)
- Lockridge O.: *Pharmacol. Ther.* 148, 34 (2015).
- Casida J. E., Quistad G. B.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 983 (2004)
- Lockridge O., Schopfer L. M., Winger G., Woods J. H.: *J. Med. Chem. Biol. Radiol. Def.* 3, 5095 (2005)
- Hrabovska A., Bernard V., Krejci E.: *PLoS One* 5, e12892 (2010).
- Mrvova K., Obzerova L., Girard E., Krejci E., Hrabovska, A.: *Chem. Biol. Interact.* 203, 348 (2013).

7. Dingova D., Leroy J., Check A., Garaj V., Krejci E., Hrabovska A.: *Anal. Biochem.* 462, 67 (2014).
8. Jensen F. S., Skovgaard L. T., Viby-Mogensen J.: *Acta Anaesthesiol. Scand.* 39, 157 (1995).
9. Brock A., Brock V.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50, 401 (1990).
10. Saxena A., Redman A. M., Jiang X., Lockridge O., Doctor B. P.: *Chem. Biol. Interact.* 119-120, 61 (1999).
11. Blong R. M., Bedows E. Lockridge O.: *Biochem. J.* 327, 747 (1997).
12. Altamirano C. V., Lockridge O.: *Biochemistry (Mosc.)* 38, 13414 (1999).
13. Masson P., Lockridge O.: *Arch. Biochem. Biophys.* 494, 107 (2010).
14. Masson P., Froment M. T., Fort S., Ribes F., Bec N., Balny C., Schopfer L. M.: *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1597, 229 (2002).
15. Hrabovská A., Debouzy J. C., Froment M. T., Devínský F., Pauliková I., Masson P.: *FEBS J.* 273, 1185 (2006).
16. Yen T., Nightingale B. N., Burns J. C., Sullivan D. R., Stewart P. M.: *Clin. Chem.* 49, 1297 (2003).
17. Lockridge O., Masson P.: *Neurotoxicology* 21, 113 (2000).

**K. Targošová, M. Kučera, and A. Hrabovská**  
(*Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava*): **Using of ELISA Method for Studying Cholinesterase Enzyme Hydrolysis in Biological Materials**

The aim of this project was to design ELISA assay using new antibodies against human butyrylcholinesterase, which enable one to work with “pure” enzyme. The amount of primary antibodies, human plasma and substrate were determined from the saturation curves. For the detection, 1 mM butyrylthiocholine substrate in presence of Ellman’s reagent (0.5 mM DTNB) and 5 mM HEPES, pH 7.4 or 1 mM indoxylacetate in 0.1mM phosphate buffer saline, pH 7.4 were used. This method makes it possible to study both steady-state and pre-steady-state phases in butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolyzes. In conclusion, we propose a simple and reliable method to study butyrylcholinesterase activity in a small amount of biological samples, while captured „pure“ enzyme can be used for studying the enzyme kinetics and activity changes in selected pathological models.