

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině
Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



Mgr. Michaela Rajčanová

Peptidové inhibitory imobilizované na magnetické nosiče a Sepharosu aplikované
na separaci žaludečních aspartátových proteinas

Peptide inhibitors immobilized on magnetic particles and Sepharose used
for separation of stomach aspartate proteinases

Disertační práce

Školitel: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 9. 7. 2014

Michaela Rajčanová

Identifikační záznam:

RAJČANOVÁ, Michaela. *Peptidové inhibitory imobilizované na magnetické nosiče a Sepharosu aplikované na separaci žaludečních aspartátových proteinas. [Peptide inhibitors immobilized on magnetic particles and Sepharose used for separation of stomach aspartate proteinases]*. Praha, 2014. 98 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie. Školitel Kučerová, Zdenka.

ABSTRAKT V ČEŠTINĚ

Lidská žaludeční šťáva obsahuje hlavně aspartátové proteinasy: pepsin A a pepsin C. Oba pepsiny jsou produkovány v žaludeční sliznici jako inaktivní pepsinogeny a k jejich aktivaci na příslušné pepsiny dochází v kyselém prostředí žaludku. Hladiny pepsinogenů v krevním séru odrážejí morfologický a funkční stav žaludeční sliznice. Téma dizertační práce je součástí projektu zabývajícího se zejména vypracováním metody pro separaci žaludečních aspartátových proteinas, která by byla vhodná pro diagnostické účely.

Konkrétním předmětem předkládané práce byla příprava nových typů ligandů, která by umožňovala po imobilizaci separaci aspartátových proteinas. Pro studium vazebných vlastností pepsinů byly syntetizovány čtyři heptapeptidy obsahující D-leucinylový zbytek (Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu, Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu, Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu a Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu).

Připravené heptapeptidy imobilizované na agarosové magnetické částice byly použity pro studium jejich interakcí s prasečím pepsinem A a potkaním pepsinem C. Zatímco prasečí pepsin A byl adsorbován na všechny heptapeptidy imobilizované na magnetické částice, potkaní pepsin C se na imobilizované heptapeptidy neadsorboval. Obdobné výsledky byly získány při afinitní chromatografii na heptapeptidech imobilizovaných na Sepharosu. Situace byla komplikovanější v případě separace lidských pepsinů A a C; účinnější separační vlastnosti vykazují magnetické agarosové částice s imobilizovanými peptidy Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu a Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu, kdy první eluční pík obsahuje oba pepsiny, ale druhý eluční pík již samotný pepsin A. Oba lidské pepsiny se podařilo separovat pomocí peptidů Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu- a Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu imobilizovaných na Sepharosu.

ABSTRACT IN ENGLISH

Human gastric juice contains mainly aspartate proteinases: pepsin A and pepsin C. Both pepsins are produced by gastric mucosa as inactive pepsinogens and they are activated to the corresponding pepsins in the acidic environment of the gastric lumen. The levels of pepsinogens in serum reflect the morphological and functional status of gastric mucosa. A subject of this thesis is a part of a long-term investigation that focuses on the elaboration of methods for separation gastric aspartate proteinases that would be suitable for diagnostic purposes.

The preparation of new type ligands was a concrete subject of PhD. thesis that after their immobilization they can enable the separation of aspartate proteinases. Four heptapeptides containing D-leucinyl residue were synthesized (Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu, Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu, Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu and Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu).

The prepared heptapeptides immobilized on agarose magnetic particles were used for the study of their interaction with porcine pepsin A and rat pepsin C. While porcine pepsin A was adsorbed to all heptapeptides immobilized to magnetic particles, rat pepsin C was not retarded. Similar results were obtained using heptapeptides immobilized to Sepharose. The situation was more complicated in the case of the separation of human pepsin A and C. Magnetic agarose particles containing immobilized Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu and Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu heptapeptides were more effective; the first elution peak contained a mixture of pepsin A and C, while the second one only pepsin A. Using the immobilization of Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu- and Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu on Sepharose, both human pepsins were separated.

Klíčová slova:

Lidský pepsin A, lidský pepsin C, separace, magnetické částice, Sepharosa

Human pepsin A, human pepsin C, separation, magnetic particles, Sepharose

Poděkování

Ráda bych poděkovala školitelce Ing. Zdence Kučerové, CSc. a konzultance prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. za odborné rady a pomoc během mého doktorského studia.

OBSAH

ABSTRAKT V ČEŠTINĚ	4
ABSTRACT IN ENGLISH	5
OBSAH	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
ÚVOD	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 Aspartátové proteiny	13
1.1.1 Dělení žaludečních aspartátových proteiny	14
1.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti pepsinů a pepsinogenů	15
1.1.3 Struktura a aktivace pepsinů a pepsinogenů	16
1.1.4 Substrátová specifita pepsinů	18
1.1.5 Patologické změny hladin aspartátových proteiny	19
1.1.6 Metody používané k separaci aspartátových proteiny	20
1.1.7 Stanovení proteolytické aktivity	21
1.2 Afinitní separace	22
1.3 Separace proteinů na magnetických nosičích	24
1.3.1 Magnetické částice	25
1.3.2 Magnetické agarosové částice aktivované glyoxalem	27
1.4 Cíl disertační práce	28
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
2.1 Přístroje a materiál	30
2.1.1 Přístroje a jiné pomůcky	30
2.1.2 Použité chemikálie	31
2.1.3 Biologický materiál, enzymy, proteiny a protilátky	32
2.1.4 Použité peptidy	32
2.2 Syntéza peptidů a jejich charakterizace	33
2.2.1 Syntéza peptidů	33
2.2.2 Charakterizace peptidů	35
2.2.2.1 Stanovení čistoty kapalinovou chromatografií	35
2.2.2.2 Potvrzení molekulové hmotnosti hmotnostní spektrometrií	35
2.2.2.3 Absorpční spektra peptidů	35
2.3 Imobilizace ligandů (heptapeptidů) na CNBr-Sepharosu	36
2.4 Imobilizace ligandů (heptapeptidů) na magnetické agarosové částice	36
2.5 Příprava vzorků pepsinů a pepsinogenů	37
2.5.1 Potkaní a prasečí pepsinogeny a pepsiny	37
2.5.2 Lidské pepsinogeny a pepsiny	38
2.6 Kinetické a inhibiční studium pepsinů a heptapeptidů (inhibitorů)	38
2.6.1 Určení optimální reakční rychlosti	38
2.6.2 Stanovení Michaelisovy konstanty (K_m) a maximální rychlosti (v_{max})	39
2.6.3 Stanovení inhibičních konstant	39

2.7	Vliv rozpouštědel na aktivitu pepsinů	40
2.8	Kapacita nosičů	41
2.8.1	Stanovení kapacity Sepharosy s imobilizovanými heptapeptidy pro prasečí pepsin	41
2.8.2	Stanovení kapacity magnetických agarosových částic s imobilizovanými heptapeptidy pro prasečí pepsin A	41
2.9	Nespecifické interakce s různými nosiči	42
2.9.1	Nespecifické interakce na Sepharose s imobilizovanými heptapeptidy	42
2.9.2	Nespecifické interakce na magnetických agarosových částicích s imobilizovanými heptapeptidy	42
2.10	Interakce prasečích a potkaních pepsinů a pepsinogenů s heptapeptidy imobilizovanými na různých nosičích	43
2.10.1	Interakce prasečích a potkaních pepsinů a pepsinogenů s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharose	43
2.10.1.1	Obecný postup	43
2.10.1.2	Opakovatelnost analýz	44
2.10.2	Interakce prasečích a potkaních pepsinů a pepsinogenů s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích	44
2.10.2.1	Obecný postup	44
2.10.2.2	Interakce prasečího pepsinu A inhibovaného pepstatinem s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích	46
2.10.2.3	Interakce prasečího pepsinogenu s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích	46
2.10.2.4	Opakovatelnost analýz	46
2.11	Interakce lidských pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na různých nosičích	47
2.11.1	Interakce lidských pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharose	47
2.11.1.1	Obecný postup	47
2.11.1.2	Vliv koncentrace lidských pepsinů na množství adsorbovaných lidských pepsinů	47
2.11.1.3	Vliv průtokové rychlosti na průběh chromatografie lidských pepsinů	48
2.11.2	Interakce lidských pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích	48
2.12	Polyakrylamidová SDS elektroforéza a Western blot pepsinů z lidské žaludeční šťávy	48
2.12.1	Polyakrylamidová SDS elektroforéza	48
2.12.2	Western blot	49
2.13	Analytické metody	50
2.13.1	Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA	50
2.13.2	Stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirskeho	51
2.13.3	Stanovení obsahu vody nosičů	52

3 Výsledky	53
3.1 Příprava a Charakterizace heptapeptidů	53
3.1.1 Stanovení čistoty peptidů kapalinovou chromatografií	53
3.1.2 Určení molekulové hmotnosti peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie	54
3.1.3 Absorpční spektra heptapeptidů	57
3.2 Imobilizace připravených heptapeptidů na CNBr-Sepharosu a magnetické agarosové částice	58
3.3 Vliv rozpouštědel na aktivitu pepsinů	59
3.4 Kinetické a inhibiční studium pepsinů a hepta-peptidů (inhibitorů)	61
3.5 Kapacita a obsah vody nosičů	66
3.6 Nespecifické interakce nosičů	67
3.7 Interakce prasečích a potkaních pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích a Sepharose	68
3.7.1 Interakce prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích	69
3.7.2 Interakce prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharosu	74
3.8 Interakce lidských pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích a sepharose	80
3.8.1 Interakce lidských pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích	81
3.8.2 Interakce lidských pepsinů A a C s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharose	83
4 DISKUZE	88
5 ZÁVĚR	92
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	94

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
AV ČR	Akademie věd České republiky
BCA	bicinchoninová kyselina
Boc	N- <i>terc</i> -butyloxykarbonyl
BSA	hovězí sérový albumin
DEAE	diethylaminoethyl
DMF	dimethylformamid
EC	Enzyme Commission
Fmoc	fluorenylmethyloxykarbonyl
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMAC	afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech
K_i	inhibiční konstanta, μM
K_{ic}	inhibiční konstanta pro kompetitivní inhibici, μM
K_{iu}	inhibiční konstanta pro nekompetitivní inhibici, μM
K_m	Michaelisova konstanta, μM
PEG	polyethylenglykol
Pg1 až Pg7	izoenzymy pepsinogenu A a pepsinogenu C
PGA	pepsinogen A
PGC	pepsinogen C (progastrin)
PHEMA	poly(2-hydroxyethylmetakrylát)
PMMA	poly(methylmetakrylát)
PS	polystyren
PTFE	poly(tetrafluoroethylen)
PU	jednotka proteolytické aktivity je množství pepsinu, které přemění za 1 min při 37 °C a pH 2 takové množství hemoglobinu, že vzniklé peptidy způsobí ΔA o 0,001 při 540 nm měřenou metodou BCA
PVA	polyvinylalkohol

RP HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SDS	dodecylsulfát sodný
SPION	supermagnetic iron oxide nanoparticles
TCA	trichloroctová kyselina
TFA	trifluoroctová kyselina
V_{lim}	maximální reakční rychlost, $\Delta A/min$
v_{max}	maximální rychlost, $\Delta A/min$
TEMED	tetramethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
1. LF UK	1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy

ÚVOD

Potravou přijaté proteiny jsou v lidském žaludku štěpeny hlavně hlavními trávicími enzymy: pepsinem A a pepsinem C. Pepsiny jsou produkovány jako neaktivní pepsinogeny (pepsinogen A a pepsinogen C) buňkami žaludeční sliznice a jsou aktivovány až v kyselém prostředí žaludečních šťáv. Koncentrace pepsinogenu A (PGA) a pepsinogenu C (PGC) v krevním séru nebo žaludku přímo souvisí s morfologií a funkcí žaludeční sliznice. Jako důležitý diagnostický ukazatel se jeví poměr PGA/PGC, který klesá u rakoviny žaludku a lze jej také využít k diagnostice gastritidy či peptického vředu.

V poslední době je věnována pozornost vývoji magnetických separačních technik k izolaci a separaci proteinů. Zejména magnetické afinitní metody využívající reverzibilní a specifické vazby ligandu imobilizovaného na magnetickém nosiči a proteinu. Tyto metody mají řadu výhod jako je jednoduchost a rychlost ve srovnání s dalšími separačními technikami.

Téma disertační práce bylo součástí následujících grantů:

- Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (grant MSM 0021620806)
- Project CEH LC 06044
- The Czech Science Foundation (grant 203/09/0857)
- PRVOUK-P24/LF1/3
- Grant Agency of Charles University (SVV-2011-262507, SVV-2012-264507 and SVV-2013-266509).

Konkrétním cílem disertační práce bylo najít rychlou a účinnou metodu k separaci lidského pepsinu A a pepsinu C s využitím vazby mezi heptapeptidy (specifické inhibitory pepsinů) imobilizovanými na nosičích a pepsiny, která by pomohla k diagnóze raného stádia rakoviny žaludku.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ASPARTÁTOVÉ PROTEINASY

Proteasy (peptidové hydrolasy; EC 3.4) jsou enzymy, které štěpí proteiny.¹ Dělí se podle toho, v jaké části polypeptidového řetězce působí: na exopeptidasy (peptidasy) a endopeptidasy (proteolytické enzymy nebo proteinasy).² Exopeptidasy katalyzují hydrolytické odštěpení aminokyseliny na koncích polypeptidového řetězce. Endopeptidasy katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb uvnitř řetězce a tvoří tak peptidy o různé délce.^{3,4}

Endopeptidasy se dále dělí podle jejich katalytických mechanismů do šesti skupin: serinové proteinasy, cysteinové proteinasy, aspartátové proteinasy, metaloproteinasy, threoninové proteinasy⁵ a glutamové proteinasy⁶.

Aspartátové proteinasy byly původně označovány jako kyselé proteasy, protože optimální pH štěpení je v kyselé oblasti.⁷ Společnými rysy jsou strukturní podobnost, katalytický mechanismus a inhibice specifickými inhibitory.⁴ Hlavní tři specifické inhibitory jsou pepstatin A, methylester diazoacethylnorleucinu a 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxy) propan. Pepstatin A nekovalentně interaguje s aktivním místem aspartátových proteinas a tím zamezuje přístupu substrátu do aktivního místa enzymy. Jedná se o obecný kompetitivní inhibitor aspartátových proteinas izolovaný z kultur rodu *Streptomyces*, který se používá při studiích enzymových aktivit, biologických funkcí a také v afinitní chromatografii.⁸⁻¹⁰ Methylester diazoacethylnorleucinu je specifický inhibitor aspartátových proteinas, který se kovalentně váže na aspartátový zbytek v aktivním centru v pozici 215 aminokyselinového řetězce.^{4, 11} Posledním z nejznámějších specifických inhibitorů je 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxy) propan, který se kovalentně váže na aspartátový zbytek v aktivním centru v pozici 32 aminokyselinového řetězce aspartátových proteinas.

1.1.1 DĚLENÍ ŽALUDEČNÍCH ASPARTÁTOVÝCH PROTEINAS

Pepsin A (EC 3.4.23.1) (cit. ^{7, 12-14})

Pepsin A je produkován jako inaktivní proenzym PGA hlavními a hlenovými buňkami sliznice těla žaludku dospělých obratlovců (Tab. 1.1). Po přijetí potravy z PGA vzniká pepsin A v kyselém prostředí žaludeční šťávy. PGA se dostává v malém množství do krevního séra a taky do moče a nachází se pouze v buňkách fundu a těla žaludku. Optimální pH pro pepsin A je 1,8–2,2.

Pepsin B (EC 3.4.23.2) (cit. ¹⁵)

Pepsin B neboli kathepsin E je minoritní složkou žaludeční šťávy dospělých obratlovců. Je vylučován jako inaktivní proenzym pepsinogen B a z něj vzniká aktivní pepsin B.

Pepsin C (EC 3.4.23.3) (cit. ¹⁶)

Triviální název pro pepsin C je gastriksin. Je produkován jako inaktivní proenzym PGC (progastriksín) hlavními buňkami celé žaludeční sliznice obratlovců a sekrečních žláz, buňkami v krčku fundu, pylorických žláz v antru a Brunnerovými žlázami v proximálním duodenu^{12, 13}. PGC se vyskytuje také mimo žaludek (Tab. 1.1), ale není detekovatelný v moči. Jeho pH optimum je 3.

Chymosin (EC 3.4.23.4) (cit. ⁴)

Chymosin je neonatální žaludeční proteasa, která se vyskytuje v žaludeční šťávě po narození. Specificky štěpí mléčný protein kasein a vyvolává tak koagulaci.

Tab. 1.1 Výskyt PGA a PGC v lidských tkáních a tekutinách

	PGA	PGC
Tělo žaludku	ano	ano
Antrum	ne	ano
Dvanácterník	ne	ano
Lačník	ne	ano
Krev	ano	ano
Moč (dospělý)	ano	ano/ne
Moč (novorozenec)	ano	ano
Pankreas	ano	ano
Prostata	ne	ano
Sperma	ne	ano
Semenný váček	ne	ano

1.1.2 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI PEPSINŮ A PEPSINOGENŮ

Relativní molekulová hmotnost pepsinů je kolem 35000 a pepsinogenů kolem 40000. Relativní molekulová hmotnost lidského pepsinu A je 34628 a lidského pepsinu C je 35461.

Pepsiny se vyznačují velmi nízkým optimálním pH. Pepsin A vykazuje největší aktivitu při pH 1,2–2,2 a pepsin C kolem pH 3. Pepsiny jsou stabilní při pH 1–6, pepsinogeny při pH 6–9. Pepsiny jsou denaturovány při pH vyšším než 7. K reverzibilní denaturaci pepsinogenů dochází při pH kolem 9 a k ireverzibilní denaturaci při pH vyšším než 12.

Izoelektrický bod pepsinogenů je 3,7 a pepsinů menší než 1 (cit. ²). Nižší izoelektrický bod u pepsinů je z důvodu ztráty devíti z deseti lisylových zbytků, dvou ze tří histidylových zbytků a dvou ze čtyř arginylových zbytků během aktivace.

Pepsiny jsou stabilní do teploty 45 °C; při vyšších teplotách dochází k denaturaci pepsinu A, zatímco pepsin C je teplotně stabilnější. Při teplotě vyšší než 65 °C jsou denaturovány oba pepsiny.

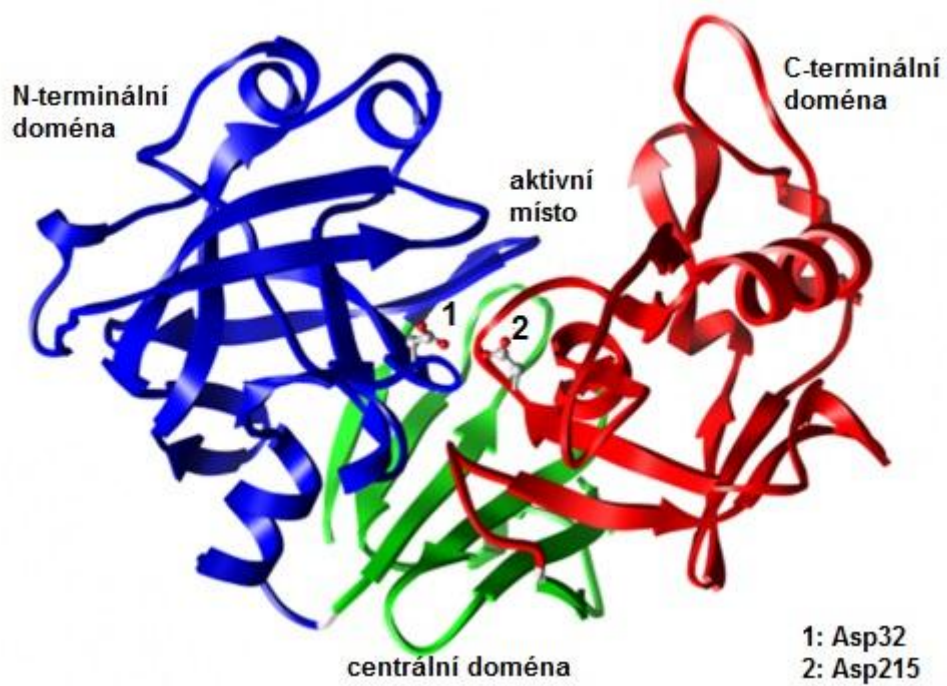
1.1.3 STRUKTURA A AKTIVACE PEPSINŮ A PEPSINOGENŮ

Kompletní primární struktura je známá pro více než 50 pepsinogenů.¹⁶ První kompletní aminokyselinovou strukturu prasečího pepsinu A určil Tang a spol. v roce 1973. (cit. ¹⁷) Jeho objev byl potvrzen v roce 1975. (cit. ^{8,18,19})

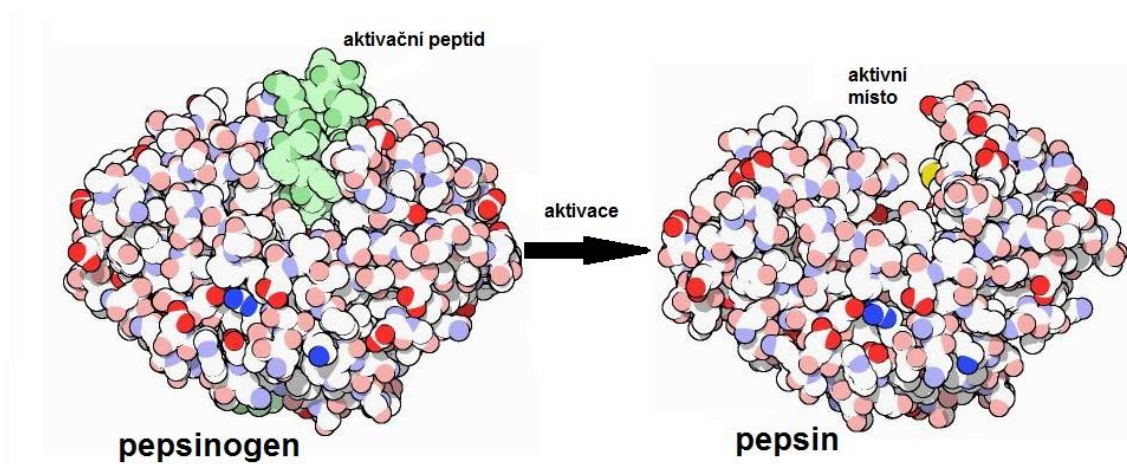
Molekula lidského PGA a PGC je tvořena polypeptidovým řetězcem, který se skládá ze 373 aminokyselinových zbytků u PGA a ze 372 aminokyselinových zbytků u PGC. Molekula obsahuje tři intramolekulární disulfidické můstky.²⁰ Primární struktura zymogenů je tvořena třemi oblastmi: signální peptid (presekvence) z 20 aminokyselin, aktivační peptid (prosegment) složený ze 40–60 aminokyselin a hlavní řetězec. Hlavní řetězec se skládá z více kyselých (28 Asp, 13 Glu) než bazických zbytků (2 Arg, 1 Lys, 1 His). Karboxylové skupiny z hlavního řetězce jsou při neutrálním pH negativně nabitě, kladný náboj lysinu a argininu kompenzuje náboj karboxylu a tím dochází k stabilizaci molekuly pepsinogenu.^{4, 16, 20}

Jsou známy trojrozměrné struktury prasečího PGA a pepsinu A a také lidského PGA a PGC. Struktury všech zymogenů jsou podobné. Podobnost mezi prasečím a lidským PGA je mnohem větší než podobnost mezi lidským PGA a lidským PGC.^{16, 20}

Terciární struktura^{2, 20} je tvořena čtyřmi α -helixy a dvěma doménami, které jsou shodné a zrcadlově obrácené (Obr. 1.1). Domény jsou tvořeny převážně β -strukturami. Mezi N-koncovou doménou (1. až 175. aminokyselinový zbytek) a C-koncovou doménou (176. až 326. aminokyselinový zbytek) je rozsedlina, ve které se nachází aktivní místo enzymu.



Obr. 1.1 Terciární struktura pepsinu



Obr. 1.2 Aktivace pepsinogenu na aktivní pepsin odštěpením aktivačního peptidu z aktivního místa

Pepsinogeny jsou skladovány v sekrečních granulích a vlivem stimulujících faktorů jsou vylučovány procesem exocytózy do žaludku. Syntéza a sekrece pepsinogenů je regulována mechanismy pozitivní a negativní zpětné vazby. Sekreci pepsinogenů inhibuje např. atropin, histamin a extrémní teplota těla.⁷

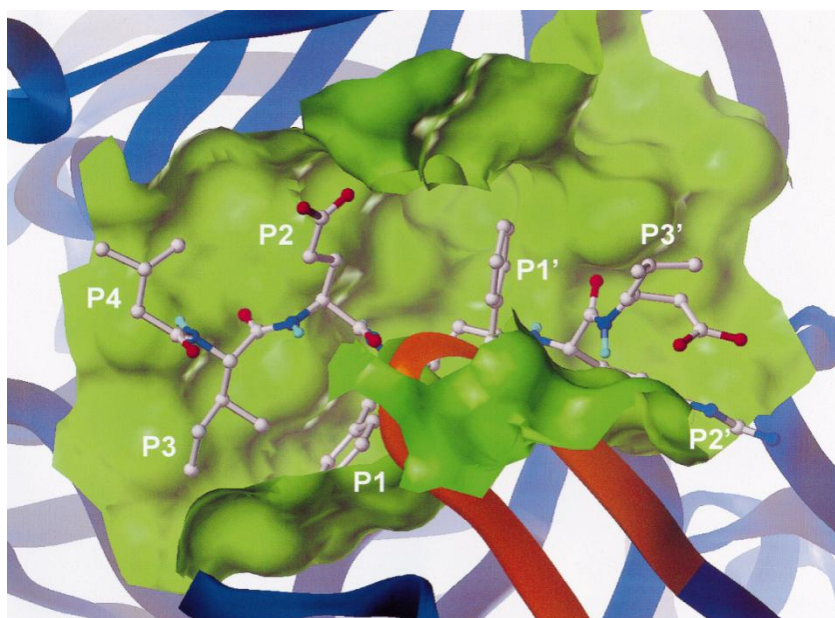
Aktivní místo obsahuje dva zbytky kyseliny asparagové Asp32 a Asp215. Okolí aktivního místa tvoří vazebné místo, které je tvořeno sedmi aminokyselinami s označením S₄, S₃, S₂, S₁, S₁' , S₂' a S₃' . Aktivační peptid zakrývá aktivní místo v rozsedlině (Obr. 1.2) a tím blokuje vstup substrátu do aktivního místa při neutrálním pH. Je tvořen 47 aminokyselinovými zbytky u lidského PGA a 43 aminokyselinovými zbytky u lidského PGC. Aktivační peptid je navázán do rozsedliny zejména elektrostatickými silami (4 elektrostatické interakce v prasečím PGA, 7 elektrostatických interakcí v lidském PGC).^{4, 16, 20}

Při neutrálním pH jsou zymogeny stabilizovány v inaktivní formě elektrostatickými interakcemi mezi kladnými náboji bazických aminokyselin aktivačního peptidu a zápornými náboji dikarboxylových aminokyselin v enzymu. Aktivace je zahájena vodíkovými ionty. Při nízkém pH jsou karboxylové kyseliny protonizovány, elektrostatické vazby jsou oslabeny a molekula zymogenu podstupuje konformační změny odsunutím aktivačního peptidu z rozsedliny. Aktivní centrum je odkryto a enzym se stává aktivním. Proteolýza závisí na pH, iontové síle, koncentraci zymogenu a specifitě jednotlivých enzymů.²¹

1.1.4 SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA PEPSINŮ

Povaha aktivního místa (viz 1.1.3.) dává malým substrátům možnost natočení. Proto se pro výzkum specifity mechanismu hodí lépe substrát dostatečně velký a většinou syntetický. Z přirozených substrátů se používají hemoglobin, kasein nebo albumin. Aspartátové proteiny mají stejné uspořádání aspartátových zbytků a proto mají všechny enzymy této skupiny stejný katalytický mechanismus. Specifita je charakterizována aminokyselinovými zbytky v okolí štěpené peptidové vazby a aminokyselinovými zbytky, jenž se účastní interakce aktivního místa enzymu se substrátem. Aminokyselinové zbytky

aktivního místa se popisují písmenem S a aminokyselinové zbytky substrátu navázaného v aktivním místě písmenem P (Obr. 1.3). Nejčastěji jsou pepsinem štěpeny vazby obsahující dvě aromatické aminokyseliny v pozici P_1 a P_1' . Vazby štěpené prasečím pepsinem A: Phe-Tyr, Phe-His, Phe-Ala, Phe-Trp, Phe-Phe, Met-His, Trp-Glu, Trp-Ile, Tyr-Met.¹⁶ Lidský pepsin A a pepsin C mají velmi podobnou substrátovou specifitu. Liší se pouze tím, že pepsin C preferuje tyrosinový zbytek v pozici P_1 a v pozici P_1' může být jakýkoliv aminokyselinový zbytek.^{22, 23}



Obr. 1.3 Model substrátu-heptapeptidu (P_4 , P_3 , P_2 , P_1 , P_1' , P_2' , P_3') navázaného v aktivním místě (zelená barva) pepsinu²⁴

1.1.5 PATOLOGICKÉ ZMĚNY HLADIN ASPARTÁTOVÝCH PROTEINAS

PGC je kompletně reabsorbován a metabolizován ledvinami, zatímco PGA pouze ze dvou třetin. Proto je možné v krvi stanovit PGC i PGA; v moči pouze PGA. Hladina PGA

a PGC v séru a jejich poměr PGA/PGC přímo souvisí s morfológií a funkcí žaludeční sliznice. U zdravých jedinců je koncentrace PGA vždy vyšší než koncentrace PGC. U zdravých jedinců je poměr PGA/PGC 3:1. (cit. ⁷) Poměr PGA/PGC je důležitější diagnostický ukazatel než absolutní hodnoty pepsinogenů. Hladiny pepsinogenů se mění s pohlavím, věkem, váhou a národností.

Vztah mezi patologickými změnami žaludku a koncentrací pepsinogenů je častým zájmem studia. U peptického vředu (duodenálního nebo žaludečního) jsou zvýšené koncentrace PGA i PGC. Riziko duodenálního vředu stoupá u zdravých lidí se zvýšenou hladinou PGA v séru. Gastritida je zánět žaludku existující ve více formách. Povrchová gastritida je spojená se zvýšenou hladinou PGA i PGC, naopak snížená hladina PGA je u chronické a střední atrofické gastritidy.²⁵ Poměr PGA/PGC klesá v případě povrchové, mírné a střední gastritidy. Poměr PGA/PGC je vhodný marker zejména ke sledování atrofické chronické gastritidy.^{13, 26-28}

Nejzávažnější nemocí je rakovina žaludku. Ve většině případů je spojena s velmi nízkou hladinou PGA²⁹, což se jeví jako dobrý subklinický marker tohoto onemocnění. Ačkoliv rakovinné buňky produkují víc PGC než PGA, zvýšení hladiny PGC v séru nebylo pozorováno. Z tohoto důvodu také klesá poměr PGA/PGC a je menší než 1. Toto se projeví již v raných stádiích rakoviny, kdy ještě není možno jinou metodou rakovinu zjistit.^{30, 31} V současné době se poměr PGA/PGC používá jako rizikový marker rakoviny žaludku.^{14, 32, 33}

1.1.6 METODY POUŽÍVANÉ K SEPARACI ASPARTÁTOVÝCH PROTEINAS

Dosud není vyvinuta jednoduchá a rychlá metoda k separaci pepsinů či pepsinogenů. Mezi metody, které byly dosud použity, patří iontově výměnná chromatografie: opakované dělení pepsinogenů na DEAE-celulose (diethylaminoethyl), což je velice zdoluhavá metoda.³⁴ Hojně se k oddělení pepsinů nebo pepsinogenů využívá kapalinové chromatografie.³⁵⁻³⁷ Jednotlivé izoenzymogeny PGA a PGC byly děleny

elektroforeticky na agarovém a polyakrylamidovém gelu^{26, 38} nebo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Stále využívanější se stávají afinitní metody jako je bioafinitní chromatografie³⁹ a afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech (IMAC)⁴⁰⁻⁴² nebo afinitní kapilární elektroforéza.⁴³

1.1.7 STANOVENÍ PROTEOLYTICKÉ AKTIVITY

Měřítkem aktivity aspartátových proteinas je množství peptidů uvolněných za určitý časový interval. Nejstarší metody jsou založeny na spektrofotometrickém stanovení peptidů v reakční směsi po vysrážení a odstranění nezreagovaného proteinového substrátu (příkladem je metoda podle Ansona a Mirskeho⁴⁴). Začaly se také více uplatňovat syntetické substráty. Nejčastěji se jejich štěpením uvolní chromofor, který se měří spektrofotometricky při odpovídající vlnové délce. Vhodným substrátem pro pepsin je oktapeptid Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO₂)-Ala-Leu (detekce při 300 nm).³

Nejpoužívanějším způsobem stanovení proteolytické aktivity je metoda podle Ansona a Mirskeho.⁴⁴ Metoda je založena na proteolytickém štěpení hemoglobinu pepsinem, při kterém dochází ke vzniku menších peptidů. Reakce je ukončena přidáním trichloroctové kyseliny. Dojde k vysrážení nerozštěpeného substrátu a v roztoku zůstávají pouze vzniklé peptidy. Peptidy jsou následně stanoveny měřením při vlnové délce 280 nm nebo BCA metodou. Množství uvolněných peptidů za přesně stanovenou dobu je přímo úměrné aktivitě pepsinu ve vzorku.

Kyselina bicinchoninová⁴⁵ (BCA) se používá jako hlavní reagensie ke stanovení koncentrace proteinů BCA metodou. Metoda je založena na redukci Cu²⁺ na Cu⁺ proteinem v alkalickém prostředí (biuretová reakce) a na vysoce citlivé kolorimetrické detekci rozpustného komplexu ve vodě. Komplex je tvořen jedním iontem Cu⁺ a dvěma molekulami BCA a tato reakce poskytuje purpurové zbarvení nejlépe detekovatelné při 562 nm. Intenzita tohoto zbarvení je závislá na celkové koncentraci proteinů.⁴⁶

1.2 AFINITNÍ SEPARACE ⁴⁶⁻⁴⁹

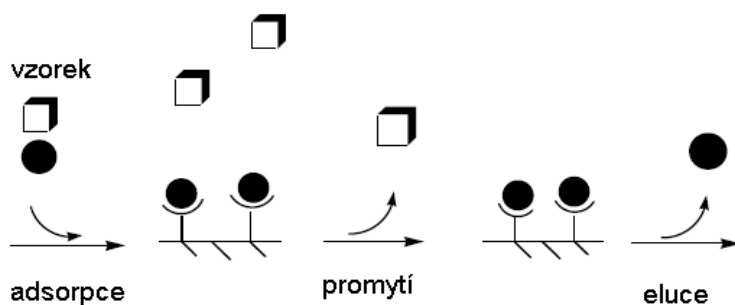
K obohacení nebo čištění proteinů ze směsi jiných proteinů nebo z biologických vzorků je používáno mnoho metod. K nejúčinnějším metodám patří metody využívající afinitního principu separace.

Afinitní separace je metoda, při níž určitá molekula (afinant neboli ligand) vázaná na matici reaguje specificky a reverzibilně s určitým proteinem, respektive jeho specifickým místem. Afinitní sorpce se může uplatnit všude, kde nějaký ligand specificky interaguje s biomolekulou. Metoda má proti klasickým postupům čištění proteinů řadu výhod jako je jednokrokový postup, velké výtěžky a rychlost a snadnost dělení.

Ligand je kovalentně navázán na vhodném nosiči. Vzorek, který obsahuje protein, je přidán k modifikovanému nosiči. Specifickými interakcemi je navázán požadovaný protein a ostatní látky se nezachytí. Následuje promytí, kdy se uvolní nenavázaný protein, nečistoty či jiné proteiny. K uvolnění izolovaného proteinu z komplexu do roztoku dochází vhodnou eluční metodou. (Obr. 1.4)

Afinitní techniky obecně používají např. biospecifické interakce, díky nimž může být protein separován od jiných proteinů. Biospecifické interakce zahrnují vodíkové vazby, hydrofobní interakce, Londonovy disperzní síly a coulombické interakce.

Tyto metody mají mnoho způsobů využití: 1) čištění enzymů, protilátek, antigenů, vazebných, receptorových, komplementárních a transportních proteinů; 2) separace buněk a virů, denaturovaných a chemicky modifikovaných proteinů od nativních proteinů, nukleových kyselin a nukleotidů, 3) zakoncentrování roztoků proteinů; 4) skladování nestálých proteinů ve vázané (imobilizované) formě; 4) výzkum kinetických a vazebných mechanismů a stanovení disociačních a jiných konstant.



Obr. 1.4 Základní princip afinitní sorpce⁴⁸

Stacionární fáze se obvykle připravují kovalentní vazbou afinitního ligandu na pevný nosič. Používají se stabilní hydrofilní makroporézní nebo neporézní matrice. Jejich významné charakteristiky jsou velikost částic, distribuce velikosti pórů, přístupný povrch a flexibilita polymeru. Matrice musí co nejméně interagovat s analytem (minimální nespecifické interakce) a být teplotně, chemicky a mechanicky stabilní. Důležitá je rovněž pH stabilita. Nosič musí obsahovat velké množství chemických skupin, které mohou být aktivovány tak, aby umožnily kovalentní připojení ligandu.

Imobilizace biomolekul na anorganické, organické a polymerní povrchy jsou obvykle založeny na kovalentní vazbě, fyzikální adsorpci, zachycení v semipermeabilní membráně a v polymerních mikročásticích a hydrogelech. Nejčastější je imobilizace pomocí kovalentní vazby. Jako ligandy mohou být použity všechny látky schopné biospecifické reverzibilní vazby. Nízkomolekulární ligandy jsou stabilnější a stéricky lépe dosažitelné než vysokomolekulární ligandy.

Nosič bývá často dodáván výrobcem v aktivované formě, jinak je nutné jej ještě před navázáním ligandu aktivovat. Nejběžnější aktivační reakce jsou: bromkvanová metoda, aktivace bisoxiranem (zavedení epoxy skupin), aktivace divinylsulfonem, aktivace organickými sulfonylchloridy nebo glyoxalem.

Protože po imobilizaci afinitního ligandu na tuhý nosič zůstane na nosiči vždy část skupin aktivních, je nutné je zablokovat. Na nezreagované aktivní skupiny nosiče se váže

vhodná látka, např. glycin, která by neměla ovlivňovat sorpci a desorpci analytu. Dalším způsobem inaktivace je odstranit zbytkové aktivní skupiny hydrolýzou.

Afinitní sorpce se nemusí omezovat jen na kolonové metody, někdy může být vhodnější vsádkový způsob.^{46, 47} Pokud chceme získat malé množství proteinu ze směsi, je lepší přidat specifický sorbent přímo do směsi. U kolonových metod dochází k stoupání tlaku a tím k poklesu průtoku vlivem ucpávání kolony nanášením nepřečištěných vzorků. Vsádkovou metodou lze dosáhnout větších výtěžků, použít důkladnější míchání a snadněji se kontroluje čas i teplota. Typickými sorbenty pro vsádkovou sorpci jsou hydroxyapatit, iontoměnič, afinitní sorbenty, hydrofobní sorbenty, imunisorbenty a magnetické sorbenty.

1.3 SEPARACE PROTEINŮ NA MAGNETICKÝCH NOSIČÍCH

K separaci a purifikaci proteinů a peptidů se používají různé metody (chromatografie, elektroforéza, ultrafiltrace, precipitace). V poslední době je věnována zvýšená pozornost vývoji a aplikaci magnetických separačních technik, které používají malé magnetické částice.

Krátký pohled do historie magnetických částic ukazuje, že čisté magnetické oxidy železa (jako je magnetit) byly použity k adsorpci a odstranění rozpuštěných a koloidních biologických látek z odpadních vod již ve 40. letech 20. století.⁵⁰ Poté až v roce 1974 byly popsány aplikace magnetických částic k selektivní separaci biomolekul Dunnilem a Lillym⁵¹, kteří použili mikronových magnetických částic jako nosičů pro imobilizované enzymy a jako bioafinitních adsorbentů. Brzy se objevily první komerční magnetické nosiče. Použití separací na magnetických částicích se rychle rozšířilo do dalších oborů a různých oblastí využití.

Magnetické separační techniky mají několik výhod ve srovnání se standardními separačními metodami. Pracovní postup je obvykle velmi jednoduchý (méně manipulačních kroků). Všechny kroky čištění se mohou provádět v jediné nádobě. Není

potřeba drahého vybavení (kapalinového chromatografu nebo centrifugy). Separační proces může být proveden přímo v surových vzorcích. V některých případech (např. při izolaci intracelulárních proteinů) je dokonce možné spojit rozklad a separační kroky a tak zkrátit celkový separační čas. Magnetická separace je šetrná k izolovaným proteinům. Lze ji použít také k zakoncentrování zředěného roztoku proteinů. Magnetické separační techniky jsou základem různých automatizovaných metod, např. imunoanalytické systémy pro stanovení různých druhů analytů (proteinů či peptidů).

1.3.1 MAGNETICKÉ ČÁSTICE

Z fyzikálního hlediska by ideální magnetické částice vhodné k separacím peptidů a proteinů měly být neporézní, supermagnetické, mít velký specifický povrch (20–100 m²/g), stejnou velikost a měly by být snadno oddělitelné magnetickým polem.⁵⁰

Velikost částic se pohybuje v rozmezí od nanometrů až do stovek mikrometrů. Optimální velikost částic se volí podle aplikace a biomolekuly, která bude separována. Například při separaci proteinů by velikost částic měla být podobná jako velikost proteinu. Měl by se najít vhodný kompromis mezi specifickým povrchem a magnetickými vlastnostmi částic. Větší částice mají menší specifický povrch a příliš malé částice zase menší magnetické vlastnosti. Kulatý tvar magnetických částic je nejvhodnější díky jeho dobrým hydrodynamickým vlastnostem, které jsou požadovány k snadné manipulaci s magnetickými částicemi.⁵²

Magnetické částice mohou být vyrobeny v laboratoři nebo jsou již komerčně dostupné. Komerčně dostupné magnetické částice se dají pořídit u mnoha firem, které nabízejí magnetické částice z různých materiálů a v mnoha velikostech. Přehledné seznamy magnetických částic dostupných na trhu lze najít v článcích^{50, 52, 53} Komerční magnetické částice jsou dostupné buď s imobilizovanými ligandy (protein A, protein G, streptavidin, protilátky, trypsin, histidin aj.) nebo s funkčními skupinami (nejběžnější jsou -COOH, -OH a -NH₂) na povrchu magnetických částic. Magnetické částice bývají často dodávány

výrobce v aktivované formě (tosyl, glyoxal, epoxy), jinak je nutné je ještě před navázáním ligandu aktivovat.

Magnetické částice používané pro afinitní separaci peptidů a proteinů se skládají z magnetického jádra, které je pokryto obalem z různých materiálů, na jehož povrchu může být imobilizován ligand.

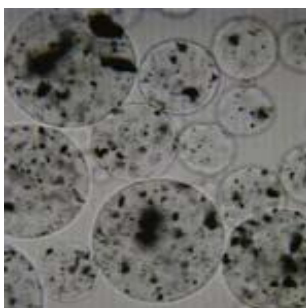
Jádro magnetické částice je tvořeno z magnetických anorganických materiálů, díky kterým je umožněna snadná manipulace s magnetickými částicemi pomocí magnetického pole (užitím vhodného magnetického separátoru). Mezi nejvýznamnější magnetické anorganické materiály patří oxidy železa: magnetit (Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), dále pak ferity ($\text{MO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{M}=\text{Mn}, \text{Co}, \text{Zn}, \text{Cu}$).^{54, 55} Oxidy železa jsou preferované z hlediska využití v bioaplikacích, protože jsou odolné vůči oxidaci víc než železo. Magnetit a maghemit⁵⁶ vykazují feromagnetické vlastnosti, ale částičky z tohoto materiálu o velikosti menší než 30 nm jsou supermagnetické. Těmto malým částičkám se říká SPION (supermagnetic iron oxide nanoparticles).⁵⁷ Supermagnetické částice po vytažení z magnetického pole nevykazují žádný magnetismus a dochází k jejich rychlé distribuci v suspenzním médiu, díky čemuž jsou vhodné k většině separací proteinů a peptidů.^{58, 59}

Protože samostatné magnetické částičky jsou velmi nestabilní a dochází rychle k jejich oxidaci, tak je potřeba magnetické jádro obalit materiálem, který je vůči okolí odolný.⁶⁰ Obal magnetické částice je inertní vrstva z materiálu, který zajišťuje stabilitu jádra, chrání jádro vůči nesespecifickým interakcím a umožňuje připojení příslušných funkčních skupin vhodných k vazbě s ligandem. Materiály využívané jako obaly magnetických částic můžeme rozdělit do čtyř skupin: syntetické polymery, biopolymery, anorganické materiály a ostatní materiály. Mezi syntetické polymery patří především polyakrylamid, polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA), polystyren (PS), poly(methylmetakrylát) (PMMA), poly(2-hydroxyethylmetakrylát) (PHEMA).⁶¹ Z biopolymerů jsou nejčastěji využívány celulóza⁶², agarosa⁶³, chitin, chitosan⁶⁴, alginát^{65, 66} nebo dextran. Mezi anorganické materiály, kterými mohou být potažena magnetická jádra, patří silikagel⁶⁷, zlato nebo porézní sklo. Mezi ostatní materiály je možné zařadit kyselinu citronovou a fosfátové sloučeniny⁶⁸ (fosforečná kyselina, bisfosfonát).

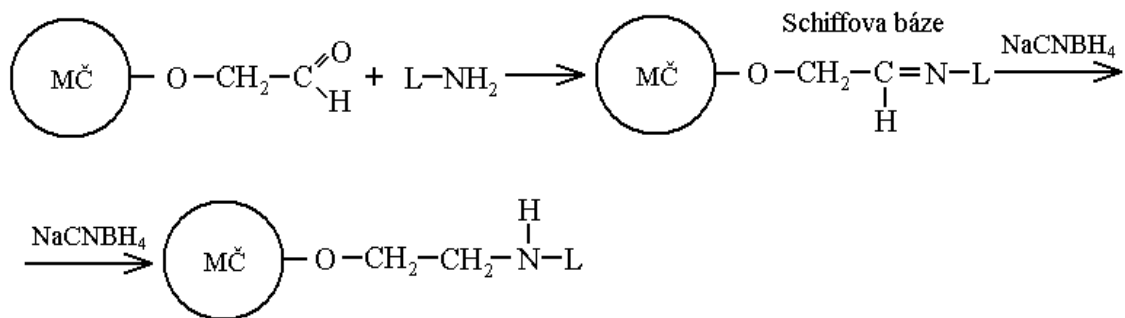
Magnetické částice jsou z roztoků či vzorků oddělovány magnetickými separátory. Nejjednodušší způsob je použití magnetu. Komerčně dostupné laboratorní magnetické separátory jsou obvykle vyrobeny z magnetů upevněných v nemagnetickém materiálu. Jedná se o pera, stojánky (pro mikrozkušavky typu Eppendorf, zkumavky, kyvety atd.) a jiné.⁶⁹ Průtokové magnetické separátory jsou finančně nákladnější a jsou vhodné k použití v hustých vzorcích, příkladem je vysoce gradientový magnetický separátor.^{50, 70}

1.3.2 MAGNETICKÉ AGAROSOVÉ ČÁSTICE AKTIVOVANÉ GLYOXALEM

Jádro každé magnetické částice obsahuje malé mikrokuličky o velikosti 1–15 μm z oxidu železnato-železitého (magnetit; Fe_3O_4) (Obr. 1.5). Obsah magnetitu v každé částici je asi 5 %. Magnetické jádro je obaleno 4% nebo 6% agarosou.⁷¹ Agarosa je zesíťovaná epichlorhydrinem kvůli větší odolnosti vůči experimentálním podmínkám. Agarosa je aktivovaná glyoxalem, jehož aldehydová skupina tvoří ochotně Schiffovu bázi s amino skupinou ligandu. Schiffova báze je značně nestabilní a proto je redukována kyanoborhydridem sodným, čímž se vytvoří stabilní kovalentní vazba ligandu k částici. (Obr. 1.6). Magnetické částice mají velikost v rozmezí 20 až 75 μm .



Obr. 1.5 Magnetitové mikročástice v 6% agarosové částici (zvětšení 400 krát)⁷²



Obr. 1.6 Schéma reakce imobilizace ligandu na magnetickou částici⁷²

MČ: magnetická částice, NaCNBH₄: kyanoborhydrid sodný, L: ligand

1.4 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Téma dizertační práce je součástí dlouhodobého výzkumu na Ústavu patologické fyziologie 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (1. LF UK), který studuje vztah aspartátových proteinas v lidské žaludeční šťávě či sliznici a závažných žaludečních onemocnění. Určení vzájemného poměru PGA a PGC je důležitým parametrem pro diagnostiku gastritidy, peptického vředu či raného stádia rakoviny žaludku.

Cílem předkládané disertační práce bylo vyvinout metodu, kterou by bylo možné rychle a jednoduše separovat lidský pepsin A a pepsin C z žaludeční šťávy nebo z krve (po aktivaci pepsinogenů).

Separaci provést afinitními metodami s využitím imobilizovaných heptapeptidů, o kterých bylo předpokládáno, že budou inhibitory lidských pepsinů.

Vybrané heptapeptidy syntetizovat a specifikovat je enzymologickými kinetickými parametry (K_m a K_i).

Heptapeptidy imobilizovat na magnetické nosiče nebo na Sepharosu.

Tyto nosiče porovnat z pohledu více parametrů: např. čas analýzy, finanční hledisko, nespecifické sorpce, kapacita nosičů apod.

Optimalizovat podmínky separace pepsinů a zjistit nejlepší adsorpční a eluční podmínky.

Studovat vazebné vlastnosti syntetizovaných heptapetidů k prasečímu pepsinu A, potkanímu pepsinu C, lidským pepsinům A a C.

Stanovit imunoanalytickými metodami pepsiny v jednotlivých frakcích získaných ze separace a vybrat nejlepší metodu pro separaci lidského pepsinu A a pepsinu C.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 PŘÍSTROJE A MATERIÁL

2.1.1 PŘÍSTROJE A JINÉ POMŮCKY

- analytické váhy AB104 (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- laboratorní váhy PCB 2500-2 (Kern, Německo)
- mikrodestičkový fotometr Multiskan MS MCC/340 (Labsystems, Finsko)
- spektrofotometr Bio-Photometer (Eppendorf, Německo)
- spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA)
- nízkotlaká chromatografie (Bio-Rad, USA): BioLogic LP Data View software, sběrač frakcí typ 2110, Proportioning valve/Mixer module, UV detektor (280 nm), vodivostní detektor, MV-6 Sample Inject Valve, SV-5 Buffer Select Valve, kolona Econo-Column Chromatography 1 x 10 cm, adaptér Econo-Column Flow Adaptor
- elektroforéza Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
- zdroj PAC 3000 (Bio-Rad, USA)
- Mini Trans-Blot systém (Bio-Rad, USA)
- magnetické pero PickPen 1-M (Bio-Nobile, Finsko)
- Milli-Q systém pro výrobu redestilované vody (Millipore Corporation, USA)
- AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet International, USA)
- 2D třepačka PMR-30 Grant-Bio (Labnet International, USA)
- magnetická míchačka HI 190 M (Hanna instruments, USA)
- třepačka MS1 Minishaker (IKA, Německo)
- rotátor Multi Bio RS-24 (Biosan, Litva)
- pH metr 3305 (Jenway, Velká Británie)

- pH elektroda SenTix 20 (WTW, Německo)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)
- HPLC Agilent technologies 1200 series (Agilent, USA): kolona Vydac C18, 5 μm , 250 \times 4,6 mm (Grace Vydac, USA), detektor diodového pole, ChemStation Software
- hmotnostní spektrometr Micromass Q-ToF micro (Waters, USA)
- Puradisc 13 Syringe PTFE (poly(tetrafluoroethylen)) Filter 1 μm , (Whatman, USA)
- Amicon Ultra 0.5 ml Centrifugal Filter Unit with Ultracel 10 kDa membrane (Merck Millipore, USA)

2.1.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- magnetické glyoxalové 4% agarosové částice, 20–75 μm (BioScience Bead Division of CSS. Inc., USA)
- Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4 Fast Flow (Sigma-Aldrich, USA)
- N,N-dimethylformamid, piperidin, kyselina trifluoroctová, 1-hydroxybenztriazol, N,N'-diisopropylkarbodiimid, kyselina mravenčí, Tween 20, dodecylsulfát sodný (SDS), akrylamid, N,N'-metylen bis(akrylamid), N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), kyanoborhydrid sodný, methanol, pepstatin A, Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) (Sigma-Aldrich, USA)
- triisopropylsilan, *tert*-butylmethylether (Alfa Aesar, Německo)
- Fmoc-Rink-Amid MBHA resin, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-L-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Boc-L-Val-OH (Iris Biotech GmbH, Německo)
- kyselina chlorovodíková, kyselina trichloroctová, octan sodný, kyselina octová, 1, 4-dioxan, chlorid sodný, propan-2-ol, merkaptoethanol (Ing. Petr Lukeš, ČR)
- BCA Protein Assay Reagent A, standard BSA (hovězí sérový albumin) (Pierce, USA)
- acetonitril (ACN), glycin (Lach-Ner, ČR)
- hydrogenuhličitan sodný (Lachema, ČR)

- nitroceluloseová membrána, filtrační papír, Precision Plus Protein Dual Color Standard, 2x Laemmliho vzorkový pufr (Bio-Rad, USA)
- substrát Luminata Classico Western HRP (Merck Millipore, USA)
- FOMAFIX koncentrát rychloustalovače, FOMA LP-T koncentrát vývojky (FOMA BOHEMIA, ČR)
- filmy CP-BU NEW, 13 x 18 cm (Agfa, Belgie)

2.1.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL, ENZYMY, PROTEINY A PROTILÁTKY

- žaludeční sliznice potkana (1. LF UK, ČR)
- žaludeční sliznice prasete (Agroprim VŠETICE a.s., ČR)
- lyofilizovaný extrakt žaludeční sliznice potkana (1. LF UK, ČR)
- lidská lyofilizovaná žaludeční šťáva (1. LF UK, ČR)
- extrakt lidské žaludeční sliznice (1. LF UK, ČR)
- prasečí pepsin A (Sigma-Aldrich, USA)
- α -chymotrypsin (Sigma-Aldrich, USA)
- hovězí albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- trypsin (Sigma-Aldrich, USA)
- hemoglobin z hovězí krve (Sigma-Aldrich, USA)
- protilátky primární: kozí polyklonální protilátka proti lidskému pepsinu A (sc-51183) a kozí polyklonální protilátka proti lidskému pepsinu C (sc-51185) (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- protilátka sekundární: Donkey Anti-Goat IgG Horseradish Peroxidase affinity purified F(ab')₂ fragments (705-036-147) (Jackson ImmunoResearch Europe, UK)

2.1.4 POUŽITÉ PEPTIDY

- vyrobené firmou Vidia na zakázku (Vidia, ČR):

- Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu
- Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu
- vyrobené ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR (Akademie věd České republiky, ČR):
 - Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu
 - Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu

2.2 SYNTÉZA PEPTIDŮ A JEJICH CHARAKTERIZACE

2.2.1 SYNTÉZA PEPTIDŮ

Peptidy Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu (dále jen peptid -Phe-Phe-) a Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu (dále jen peptid -Tyr-Phe-) byly vyrobeny na automatickém syntetizátoru peptidů komerční firmou Vidia (Praha, Česká republika).

Peptidy Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu (dále jen peptid -Tyr-Tyr-) a Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu (dále jen peptid -Phe-Tyr-) byly vyrobeny ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR manuálně syntézou na pevné fázi dle N^α-Fmoc chemického protokolu.⁷³

Syntéza byla provedena v polypropylenových stříkačkách s teflonovou fritou. Stříkačka byla naplněna 200 mg pryskyřice (Fmoc-Rink-Amid MBHA resin), po nabobtnání v dimethylformamidu (DMF) byla pryskyřice promyta DMF. Chránící skupiny Fmoc- z pryskyřice byly odstraněny 20% v/v roztokem piperidinu v DMF (5 min třepat s 20% v/v roztokem piperidinu v DMF, 2 krát promytí DMF a 20 min třepat znovu s 20% v/v roztokem piperidinu v DMF) a následně byla pryskyřice promyta (3 krát nasátí DMF do stříkačky, 3 krát 20% v/v roztokem propan-2-olu a DMF střídavě, 3 krát DMF). Aminokyseliny s ochráněnou aminoskupinou (Fmoc-chránící skupina byla na všech aminokyselinách kromě poslední aminokyseliny v peptidu, která obsahovala Boc- chránící

skupinu) byly postupně navázány na pryskyřici podle pořadí aminokyselin v příslušného peptidu (od C-konce peptidu), který byl syntetizován:

- Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu: Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-L-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Boc-L-Val-OH
- Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu: Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-L-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-D-Pro-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Boc-L-Val-OH.

Hmotnost příslušné aminokyseliny byla vypočtena jako čtyřnásobek vzhledem k navážce pryskyřice (vazebná kapacita pryskyřice je 0,65 mmol/g) a aminokyselina byla rozpuštěna v 1,25 ml DMF. K roztoku aminokyseliny byly přidány vazebné reagenty v poměru k látkovému množství navážené pryskyřice: N,N'-diisopropylkarbodiimid (7 ekvivalentů, 2 M roztok N,N'-diisopropylkarbodiimidu v DMF) a hydroxybenztriazol (5 ekvivalentů) a 2 µl roztoku bromfenolové modři (1% m/v bromfenolová modř v DMF). Takto připraveným roztokem byla naplněna stříkačka s pryskyřicí a inkubace probíhala za třepání 1 h při laboratorní teplotě. Poté byla pryskyřice promyta a z koncové aminokyseliny byla odštěpena chránící skupina Fmoc- roztokem piperidinu (20% v/v roztok v DMF). Stejně bylo postupováno od C-konce peptidu k N-konci. Aminoskupina poslední přidané aminokyseliny byla chráněná Boc- chránící skupinou.

Roztokem obsahujícím trifluoroctovou kyselinu (TFA)/destilovanou vodu/ triisopropylsilan (95:2,5:2,5) byla odštěpena Boc- skupina, celý peptid z pryskyřice a všechny chránící skupiny postranních řetězců inkubací 3,5 h při laboratorní teplotě. Roztok byl vysušen dusíkem v Erlenmeyerově baňce, poté byl peptid vysrážen *tert*-butylmethyletherem a poté vysušen v exsikátoru.

2.2.2 CHARAKTERIZACE PEPTIDŮ

2.2.2.1 Stanovení čistoty kapalinovou chromatografií

Čistota vyrobených peptidů byla stanovena pomocí RP HPLC (vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi) na přístroji Agilent technologies 1200 series kolonou Vydac C-18 column (5 μm , 250 \times 4,6 mm) při průtokové rychlosti 1 ml/min a gradientu acetonitrilu (5–70% v/v ACN/H₂O za 60 min) obsahujícího 0,1% v/v TFA. Vzorek (0,1 mg peptidu) byl rozpuštěn v 5% v/v roztoku ACN obsahujícího 0,1% v/v TFA. Gradientová eluce byla detekována detektorem diodového pole při 220 nm.

2.2.2.2 Potvrzení molekulové hmotnosti hmotnostní spektrometrií

Hmotnostní spektra peptidů byla získána na hmotnostním spektrometru Micromass Q-ToF (Waters) s elektrosprejovou ionizací v pozitivním módu. Měření bylo provedeno na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR Mgr. Lenkou Monincovou.

2.2.2.3 Absorpční spektra peptidů

Absorpční spektra peptidů byla změřena na spektrofotometru NanoDrop 1000. Z roztoku peptidu (0,1 mg peptidu v 30 μl 29% v/v roztoku DMF v 0,1 M NaHCO₃) bylo odpipetováno 2 μl a změřeno absorpční spektrum v rozsahu 240–350 nm proti blanku (29% v/v roztok DMF v 0,1 M NaHCO₃).

2.3 IMOBILIZACE LIGANDŮ (HEPTAPEPTIDŮ) NA CNBr-SEPHAROSU

Bylo naváženo 0,5 g Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4 Fast Flow. Tento nosič byl smíchán s 50 ml 1 mM HCl a při laboratorní teplotě inkubován 2 h. Gel byl po nabobtnání promyt 50 ml roztoku 0,1 M NaHCO₃ s 0,5 M NaCl. Příslušný peptid (7 mg) byl rozpuštěn v 400 µl DMF a 1 ml roztoku 0,1 M NaHCO₃ s 0,5 M NaCl. Nosič byl smíchán s roztokem peptidu a třepán při 4 °C 20 h. Nosič byl promyt 50 ml roztoku 0,1 M NaHCO₃ s 0,5 M NaCl. Aktivní skupiny na nosiči byly zablokovány glycinem (0,2 M roztok glycinu v 0,1 M NaHCO₃, 2 h při laboratorní teplotě). Nosič byl poté promyt 100 ml následujících roztoků: destilované vody; 0,15 M NaCl; 1 M NaCl a 0,15 M NaCl. Imobilizovaný nosič byl skladován v lednici v 0,3% m/v roztoku azidu sodného v 0,15 M NaCl.

2.4 IMOBILIZACE LIGANDŮ (HEPTAPEPTIDŮ) NA MAGNETICKÉ AGAROSOVÉ ČÁSTICE

Usazené magnetické částice (Magnetic Glyoxal 4% Agarose Beads, velikost 20–75 µm) o objemu 500 µl byly promyty třikrát 2 ml vazebným pufrem. Vazebný pufr obsahoval 0,02 M Na₂HPO₄·12H₂O; 0,20 M NaCl a 0,05 M NaBH₃CN. K magnetickým částicím byl přidán roztok obsahující 7 mg příslušného peptidu v 400 µl DMF a 1000 µl vazebného pufru a směs byla třepána 20 h při laboratorní teplotě.

Nezreagované -CHO skupiny na magnetických částicích byly blokovány roztokem glycinu (10 mg glycinu v 1,5 ml destilované vody). Směs byla třepána 2 h při laboratorní teplotě. Poté byl odebrán supernatant. Magnetické částice byly promyty 10 krát 1 ml destilované vody. Takto připravené magnetické částice s imobilizovaným ligandem byly skladovány v pufre v 0,3% m/v roztoku azidu sodného v 0,15 M NaCl v lednici.

Stanovení množství navázaného ligandu bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Byla změřena absorbance při 260 nm a 280 nm tří roztoků každého peptidu o různých koncentracích (0–1 mM). Při imobilizaci peptidů na magnetické částice bylo odebráno po 20 μ l supernatantu (bez magnetických částic) těsně po smíchání a pak po inkubaci. K odebranému supernatantu bylo přidáno 200 μ l roztoku, ve kterém se rozpouštěly peptidy (29% v/v roztok DMF ve vazebném pufru). V jednotlivých vzorcích byla změřena absorbance proti blanku (29% v/v roztok DMF ve vazebném pufru). Z rozdílu absorbance před reakcí a po reakci a z kalibrační křivky bylo určeno přibližné množství imobilizovaného peptidu.

2.5 PŘÍPRAVA VZORKŮ PEPSINŮ A PEPSINOGENŮ

2.5.1 POTKANÍ A PRASEČÍ PEPSINOGENY A PEPSINY

Žaludky z potkanů (použita kontrolní zvířata z biologických pokusů prováděných na Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK v Praze) byly ihned po resekci promyty 50 mM Tris pufrém pH 7,2. Oddělená žaludeční sliznice byla promyta 50 mM Tris pufrém pH 7,2 a homogenizována v tomto pufru (1 g tkáň/4 ml pufru). Extrakt byl odstředován 1 h při 14000 \times g a teplotě 4 $^{\circ}$ C. Získaný supernatant byl uchováván při teplotě -18 $^{\circ}$ C. Před analýzou byl extrakt žaludeční sliznice potkana naředěn v příslušném poměru 0,1 M acetátovým pufrém pH 3,5; snížením pH pod pH 4 došlo k aktivaci PGC na pepsin C. Takto upravený extrakt byl před aplikací na afinitní sorbent přefiltrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 μ m).

Stejný postup přípravy extraktu je také v případě prasečích žaludků, které byly získány z jatek Všetice (Agroprim VŠETICE a.s.) a přepravovány chlazené ledem.

2.5.2 LIDSKÉ PEPSINOGENY A PEPSINY

Lidská žaludeční šťáva, získaná na 4. interní klinice 1. LF UK v Praze, byla lyofilizována a uchovávána dlouhodobě při teplotě 4 °C. Před použitím byl lyofilizovaný vzorek rozpuštěn v příslušné mobilní fázi či pufru (0,1 M acetátový pufr pH 3,5) a před-filtrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 µm).

Části lidských žaludků byly získané při operacích pacientů 1. chirurgické kliniky 1. LF UK v Praze v minulých letech. Resektáty byly promyty 50 mM Tris pufrém pH 7,2. Oddělená sliznice byla homogenizována v 50 mM Tris pufru pH 7,2 (1 g tkáň do 4 ml pufru). Extrakt byl odstředován 60 min při 14000 × g a teplotě 4 °C. Supernatant byl dlouhodobě uchováván ve zmraženém stavu při teplotě -18 °C.

2.6 KINETICKÉ A INHIBIČNÍ STUDIUM PEPSINŮ A HEPTAPEPTIDŮ (INHIBITORŮ)

2.6.1 URČENÍ OPTIMÁLNÍ REAKČNÍ RYCHLOSTI

Roztok enzymu:

0,01 mg prasečího pepsinu A v 1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

Roztok substrátu:

2% m/v roztok hemoglobinu (0,25 g hemoglobinu v 10 ml destilované vody a 2,5 ml 0,3 M HCl)

Byla měřena závislost tvorby produktu na reakčním čase, kdy probíhá enzymová reakce mezi enzymem (prasečí pepsin) a substrátem (hovězí hemoglobin) a byl vybrán vhodný reakční čas. Roztok hemoglobinu (250 µl) byl temperován 10 min ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Bylo přidáno 50 µl roztoku enzymu. Přesně po 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13 minutách byla reakce ukončena přidáním 500 µl 0,3 M trichloroctové kyseliny (TCA).

Roztok byl odstředěn v centrifuze 12 min při $12\,000 \times g$ a teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odpipetován do nové mikrozkuhavky a promíchán se. V roztoku byla stanovena koncentrace peptidů BCA metodou.

2.6.2 STANOVENÍ MICHAELISOVY KONSTANTY (K_m) A MAXIMÁLNÍ RYCHLOSTI (v_{max})

Roztoky enzymů:

- 0,2 mg prasečího pepsinu v 1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5
- 4 mg lyofilizovaného extraktu žaludeční sliznice potkana v 1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

Roztoky substrátu:

0,32; 0,65; 1,29; 2,54; 5,05; 9,61 a 18,24 g hemoglobinu/l reakční směsi, každý roztok byl okyselený konc. HCl na pH 2

Byla naměřena závislost reakční rychlosti jednotlivých enzymů (prasečí pepsin A nebo potkaní pepsin C) na koncentraci substrátu (hovězí hemoglobin).

Roztok hemoglobinu (250 μl) byl temperován 10 min ve vodní lázni při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bylo přidáno 50 μl roztoku enzymu. Přesně po 6 min byla reakce ukončena přidáním 500 μl 0,3 M TCA. Roztok byl odstředěn v centrifuze 12 min při $12\,000 \times g$ a teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odpipetován do nové mikrozkuhavky a promíchán se. V roztoku byla stanovena koncentrace peptidů BCA metodou. K výpočtu K_m a v_{max} byla použita linearizace podle Lineweavera a Burkea.

2.6.3 STANOVENÍ INHIBIČNÍCH KONSTANT

Roztoky enzymů:

- 0,2 mg prasečího pepsinu A v 1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5
- 4 mg lyofilizovaného extraktu žaludeční sliznice potkana v 1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

Roztoky substrátu:

1,5; 2,2; 3,4 a 4,3 g hemoglobinu/l reakční směsi, každý roztok byl okyselený HCl na pH 2

Roztoky inhibitorů:

3,6 a 7,1 mg peptidu/l reakční směsi

Byla naměřena závislost reakční rychlosti jednotlivých enzymů (prasečí pepsin A nebo potkaní pepsin C) na koncentraci substrátu (hovězí hemoglobin) a s roztoky inhibitorů (peptidy -Phe-Phe-, -Tyr-Phe-, Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr-) o koncentracích 0; 3,6 a 7,1 mg/l reakční směsi.

Roztok hemoglobinu (250 μ l) byl temperován 10 min ve vodní lázni při teplotě 37 $^{\circ}$ C. Přidá se 50 μ l roztoku inhibitoru a poté 50 μ l roztoku enzymu. Přesně po 6 min se reakce ukončí přidáním 500 μ l 0,3 M TCA. Roztok se odstředí v centrifuze 12 min při 12 000 \times g a teplotě 5 $^{\circ}$ C. Supernatant se odpipetuje do nové mikrozkušavky a promíchá se. V roztoku se stanoví koncentrace peptidů BCA metodou. K výpočtu K_i byla použita linearizace podle Lineweavera a Burkea a rovnice příslušných typů inhibicí.

2.7 VLIV ROZPOUŠTĚDEL NA AKTIVITU PEPSINŮ

Vzorky:

- prasečí pepsin A: 0,2 mg /ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5
- potkaní pepsin C: 2 mg lyofilizovaného extraktu potkaní žaludeční sliznice /ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

Roztoky rozpouštědel:

10% v/v, 20% v/v, 30% v/v, 40% v/v a 50% v/v propan-2-ol, acetonitril a 1,4-dioxan v 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

Bylo smícháno 50 μ l vzorku (prasečí nebo potkaní pepsin) s 450 μ l roztoku rozpouštědla a po 5 min stanovena proteolytická aktivita modifikovanou metodou dle Ansona a Mirskeho⁴⁴.

2.8 KAPACITA NOSIČŮ

2.8.1 STANOVENÍ KAPACITY SEPHAROSY S IMOBILIZOVANÝMI HEPTAPEPTIDY PRO PRASEČÍ PEPSIN

Roztok prasečího pepsinu A (2 mg/ml acetátového pufru pH 3,5) byl aplikován na kolonu (1,0×1,3 cm) tak dlouho, dokud nebylo dosaženo jejího úplného nasycení (proteolytická aktivita prasečího pepsinu A a stanovené množství proteinů v odebíraných frakcích vykazovaly konstantní hodnotu), což bylo dosaženo asi po 35 ml aplikovaného roztoku enzymu. Poté byla kolona promyta 10 ml adsorpční mobilní fází (0,1 M acetátový pufr pH 3,5). Adsorbovaný prasečí pepsin A byl desorbován eluční mobilní fází po 20 ml (20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a 20% v/v propan-2-ol v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2).

Množství prasečího pepsinu A v eluátu bylo stanoveno metodou BCA. Kapacita byla vyjádřena v miligramech prasečího pepsinu adsorbovaného na 1 ml sorbentu (objem kolony).

2.8.2 STANOVENÍ KAPACITY MAGNETICKÝCH AGAROSOVÝCH ČÁSTIC S IMOBILIZOVANÝMI HEPTAPEPTIDY PRO PRASEČÍ PEPSIN A

Na 50 μ l magnetických částic bylo nanášeno 1,5 mg prasečího pepsinu A v 500 μ l acetátového pufru pH 3,5, čímž byly magnetické částice nasyceny. Poté byly promyty 3 krát 500 μ l adsorpčním pufrem (0,1 M acetátový pufr pH 3,5). Adsorbovaný prasečí pepsin A byl desorbován elučními roztoky: 3 krát 500 μ l 20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a 3 krát 500 μ l 20% v/v propan-2-ol v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2.

Množství prasečího pepsinu A v eluátu bylo stanoveno metodou BCA. Kapacita magnetických částic byla vyjádřena v miligramech pepsinu adsorbovaného na 1 ml nosiče.

2.9 NESPECIFICKÉ INTERAKCE S RŮZNÝMI NOSIČI

2.9.1 NESPECIFICKÉ INTERAKCE NA SEPHAROSE S IMOBILIZOVANÝMI HEPTAPEPTIDY

Vzorky:

- 1 mg α -chymotrypsinu/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5
- 1 mg trypsinu/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5
- 1 mg albuminu/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5

Dávkován 1 ml vzorku, průtoková rychlost 1 ml/min, rozměry kolony 1,0 × 1,3 cm

Adsorpční mobilní fáze: 0,1 M acetátový pufr pH 3,5

Eluční mobilní fáze:

20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5

20% v/v propan-2-ol v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2

V jednotlivých frakcích byla stanovena koncentrace proteinů BCA metodou.

2.9.2 NESPECIFICKÉ INTERAKCE NA MAGNETICKÝCH AGAROSOVÝCH ČÁSTICÍCH S IMOBILIZOVANÝMI HEPTAPEPTIDY

Vzorky:

- 0,2 mg α -chymotrypsinu/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5
- 0,2 mg trypsinu/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5
- 0,2 mg albuminu/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5

Množství magnetických částic 50 μ l, dávkováno 500 μ l vzorku

Promytí: 3 krát 500 μ l 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

Eluce: 3 krát 500 μ l 20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5

3 krát 500 μ l 20% v/v propan-2-ol v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2

V jednotlivých frakcích byla stanovena koncentrace proteinů BCA metodou.

2.10 INTERAKCE PRASEČÍCH A POTKANÍCH PEPSINŮ A PEPSINOGENŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA RŮZNÝCH NOSIČÍCH

2.10.1 INTERAKCE PRASEČÍCH A POTKANÍCH PEPSINŮ A PEPSINOGENŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA SEPHAROSE

2.10.1.1 Obecný postup

Používané vzorky aspartátových proteinas:

- prasečí pepsin A
- extrakt žaludeční sliznice potkana (potkaní pepsin C)
- prasečí pepsin A inhibovaný pepstatinem
- extrakt žaludeční sliznice prasete (prasečí PGA)

Roztoky použité při zjišťování optimálních podmínek interakcí prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C:

- Adsorpční mobilní fáze: 0,1 M acetátový pufr pH 2,50–4,25; 0,1 M acetátový pufr pH 3,5 obsahující 0,5 M NaCl; 0,1 M acetátový pufr pH 3,5 obsahující 1 M NaCl
- Eluční mobilní fáze: 0,05 M fosfátový pufru pH 6,2; 0,05 M fosfátový pufru pH 8; 20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 20% v/v ACN v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 20% v/v 1, 4-dioxan v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 20% v/v propan-2-ol v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; 20% v/v ACN v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; 20% v/v 1, 4-dioxan v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; 0,1 M acetátový pufr pH 3,5–6,2; 0,05 M fosfátový pufru pH 6,2 obsahující 0–40% v/v propan-2-ol; 0,1 M acetátový pufr pH 3,5 obsahující 0–20% v/v propan-2-ol

Kolony Econo-Column Chromatography byly naplněny připravenými sorbenty

a rozměry naplněných kolon byly 1,0×1,3 cm. Před každou analýzou byla kolona promyta adsorpční mobilní fází (20 ml 0,1 M acetátový pufr pH 3,5). Poté byl aplikován 1 ml roztoku vzorku a kolona byla promyta adsorpční mobilní fází do vymytí všech neadsorbovaných látek (5 ml). Adsorbované proteiny byly desorbovány eluční mobilní fází (10 ml 20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a 10 ml 20% v/v propan-2-ol v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2). Průtoková rychlost analýz byla 1 ml/min a jednotlivé frakce byly sbírány po 1 ml. V průběhu analýz byla UV detektorem měřena absorbance při vlnové délce 280 nm a vodivostním detektorem měřena aktuální vodivost (mS/cm). Hodnota pH byla v každé frakci okamžitě upravena 1 M HCl na pH 2 a ve frakcích bylo stanoveno množství proteinů metodou BCA a jejich proteolytická aktivita modifikovanou metodou podle Ansona a Mirskeho⁴⁴. Dlouhodobě byly kolony skladovány při teplotě 4 °C. Odlišné podmínky analýz od obecného postupu jsou uvedeny u jednotlivých kapitol (př. adsorpční či eluční mobilní fáze, průtoková rychlost).

2.10.1.2 Opakovatelnost analýz

Vzorek: 2 mg prasečího pepsinu A/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5, vzorek byl před aplikací na afinitní sorbent přefiltrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 µm)

Pokus byl zopakován desetkrát za stejných experimentálních podmínek.

2.10.2 INTERAKCE PRASEČÍCH A POTKANÍCH PEPSINŮ A PEPSINOGENŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA MAGNETICKÝCH AGAROSOVÝCH ČÁSTICÍCH

2.10.2.1 Obecný postup

Používané vzorky aspartátových proteinas:

- prasečí pepsin A

- extrakt žaludeční sliznice potkana (potkaní pepsin C)
- prasečí pepsin A inhibovaný pepstatinem
- extrakt žaludeční sliznice prasete (prasečí PGA)

Roztoky použité při zjišťování optimálních podmínek interakcí prasečího a potkaního pepsinu:

- Adsorpční roztok: 0,1 M acetátový pufr pH 2,50–4,25; 0,1 M acetátový pufr pH 3,5 obsahující 0,5 M NaCl; 0,1 M acetátový pufr pH 3,5 obsahující 1 M NaCl
- Eluční roztok: 0,05 M fosfátový pufr pH 6,2; 0,05 M fosfátový pufr pH 8; 20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 20% v/v ACN v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 20% v/v 1,4-dioxan v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 20% v/v propan-2-ol v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; 20% v/v ACN v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; 20% v/v 1,4-dioxan v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2

Do mikrozkušavky typu Eppendorf bylo odměřeno 50 μ l usazených magnetických částic, ke kterým bylo přidáno 500 μ l připraveného roztoku vzorku. Směs byla 5 min třepána za lab. teploty. Magnetické částice byly vyjmuty pomocí magnetického pera do další mikrozkušavky typu Eppendorf. Promytí 500 μ l 0,1 M acetátového pufru pH 3,5 bylo opakováno třikrát. Eluce 3 krát 500 μ l 20 % v/v roztoku rozpouštědla v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a 3 krát 500 μ l 20% v/v rozpouštědla v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2. Všechny kroky (adsorpce vzorku, promytí a eluce) byly prováděny v 5 min intervalech. Hodnota pH byla v každé frakci okamžitě upravena 1 M HCl na pH 2. Ve všech frakcích bylo stanoveno množství proteinů BCA metodou a proteolytická aktivita modifikovanou metodou dle Ansona a Mirského⁴⁴. Odlišné podmínky analýz od obecného postupu jsou uvedeny u jednotlivých kapitol (př. koncentrace vzorku, adsorpční či eluční roztok).

2.10.2.2 Interakce prasečího pepsinu A inhibovaného pepstatinem s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích

Vzorek: 0,2 mg prasečího pepsinu a 0,2 mg pepstatinu /ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5, směs byl přes noc inkubována při 4 °C, směs byla před aplikací na afinitní sorbent přefiltrována (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 µm)

2.10.2.3 Interakce prasečího pepsinogenu s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích

Vzorek: 1 ml extraktu žaludeční sliznice prasete v 11 ml 0,1 M acetátového pufru pH 6,2, vzorek byl před aplikací na afinitní sorbent přefiltrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 µm),

Promytí: 3 krát 500 µl 0,1 M acetátového pufru pH 6,2

Eluce: 3 krát 500 µl 20% v/v propan-2-olu v 0,1 M acetátovém pufru pH 6,2

3 krát 500 µl 20% v/v propan-2-olu v 0,1 M fosfátovém pufru pH 8,0

2.10.2.4 Opakovatelnost analýz

Vzorek: 0,2 mg prasečího pepsinu/1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

Pokus byl zopakován desetkrát za stejných experimentálních podmínek.

2.11 INTERAKCE LIDSKÝCH PEPSINŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA RŮZNÝCH NOSIČÍCH

2.11.1 INTERAKCE LIDSKÝCH PEPSINŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA SEPHAROSE

2.11.1.1 Obecný postup

Rozměry naplněných kolon byly $1,0 \times 1,3$ cm. Před každou analýzou byla kolona promyta adsorpční mobilní fází (20 ml 0,1 M acetátový pufr pH 3,5). Poté byl aplikován 1 ml roztoku vzorku (2 mg lidské lyofilizované žaludeční šťávy/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5) a kolona byla promyta adsorpční mobilní fází do vymytí všech neadsorbovaných látek (5 ml). Adsorbované proteiny byly desorbovány eluční mobilní fází (10 ml 20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a 10 ml 20% v/v propan-2-ol v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2). Průtoková rychlost analýz byla 1 ml/min a jednotlivé frakce byly sbírány po 1 ml. V průběhu analýz byla UV detektorem měřena absorbance při vlnové délce 280 nm a vodivostním detektorem měřena aktuální vodivost (mS/cm). Hodnota pH byla v každé frakci okamžitě upravena 1 M HCl na pH 2 a ve frakcích bylo stanoveno množství proteinů metodou BCA a jejich proteolytická aktivita modifikovanou metodou podle Ansona a Mirskeho⁴⁴. Dlouhodobě byly kolony skladovány při teplotě 4 °C. Odlišné podmínky analýz od obecného postupu jsou uvedeny u jednotlivých kapitol.

2.11.1.2 Vliv koncentrace lidských pepsinů na množství adsorbovaných lidských pepsinů

Vzorek: 2; 4 a 6 mg lidské lyofilizované žaludeční šťávy /ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5, vzorek byl před aplikací na afinitní sorbent přefiltrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 μ m)

2.11.1.3 Vliv průtokové rychlosti na průběh chromatografie lidských pepsinů

Průtoková rychlost: 0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 ml/min

2.11.2 INTERAKCE LIDSKÝCH PEPSINŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA MAGNETICKÝCH AGAROSOVÝCH ČÁSTICÍCH

Do mikrozkuhavky typu Eppendorf bylo odměřeno 50 μ l usazených magnetických částic s imobilizovanými heptapeptidy, ke kterým bylo přidáno 500 μ l připraveného roztoku vzorku (0,2 mg lidské lyofilizované žaludeční šťávy/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5). Směs byla 5 min třepána za laboratorní teploty. Magnetické částice byly vyjmuty pomocí magnetického pera do další mikrozkuhavky typu Eppendorf. Promytí 500 μ l 0,1 M acetátového pufru pH 3,5 bylo opakováno třikrát. Eluce 3 krát 500 μ l 20% v/v roztoku rozpouštědla v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a 3 krát 500 μ l 20% v/v rozpouštědla v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2. Všechny kroky (adsorpce vzorku, promytí a eluce) byly prováděny v 5 minutových intervalech. Hodnota pH byla v každé frakci okamžitě upravena 1 M HCl na pH 2. Ve všech frakcích bylo stanoveno množství proteinů BCA metodou a proteolytická aktivita modifikovanou metodou dle Ansona a Mirskeho⁴⁴.

2.12 POLYAKRYLAMIDOVÁ SDS ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOT PEPSINŮ Z LIDSKÉ ŽALUDEČNÍ ŠŤÁVY

2.12.1 POLYAKRYLAMIDOVÁ SDS ELEKTROFORÉZA

- Aparatura: Mini-PROTEAN tetra Cell od firmy Bio-Rad se skly o rozměru 7,5 cm \times 10 cm a tloušťce gelu 1 mm
- Separační gel (T 10%, C 3,4%): 1,25 ml 50% roztoku akrylamidu/BIS (29:1), 2,35

- ml 1 M Tris-HCl pH 8,8, 62,5 µl 10% SDS, 2,45 ml destilované vody, 1,56 µl TEMED a 156 µl 10% persíranu amonného
- Zaostrňovací gel (T 4%, C 3,4%): 250 µl 50% roztoku akrylamidu/BIS (29:1), 1,05 ml 0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 31,25 µl 10% SDS, 1,58 ml destilované vody, 1,25 µl TEMED a 250 µl 10% persíranu amonného
 - Vzorkový pufr: Laemmliho vzorkový pufr (Bio-Rad) o složení 31,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% v/v glycerol, 0,005% bromfenolová modř a 5% v/v 2-merkapt ethanol
 - Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % m/v SDS, pH 8,3
 - Proteinový standart: 5 µl Precision Plus Protein Dual Color Standard od Bio-Rad
 - Příprava vzorků pro SDS elektroforézu: k analýze byly použity frakce elučních píků ze separací lidské lyofilizované žaludeční šťávy afinitní technikou na peptidech imobilizovaných na magnetických agarosových částicích a Sepharose, které byly zahuštěny na centrifugačních jednotkách (Merck Millipor), zahuštěné vzorky byly smíchány se redukujícím vzorkovým pufrem (2:1 v/v), vzorky byly 10 min inkubovány při 95 °C a 30 µl vzorku bylo aplikováno na elektroforézu
 - Podmínky SDS elektroforézy: 125 V; 70–80 min; laboratorní teplota

2.12.2 WESTERN BLOT

Použité roztoky:

- Transferový pufr: 12 mM Tris, 96 mM glycin, 20 % v/v ethanol, pH 8,3
- 10× koncentrovaný TBS: 20 mM Tris báze, 137 mM NaCl, pH 7,6
- Promývací roztok: 200 ml TBS (10× konc.), 2 ml Tween 20, doplnit redestilovanou vodou do objemu 2 l
- Blokovací roztok: 5% m/v nízkotučné mléko v promývacím roztoku
- Roztok primární protilátky na jednu membránu: 30 µl protilátky v 6 ml blokovacího roztoku (ředění 1:200)

- Roztok sekundární protilátky na jednu membránu: 2 µl protilátky v 30 ml blokovacího roztoku (ředění 1:15000)

Sendvič byl sestaven z gelu z polyakrylamidové SDS elektroforézy (bez zaostřovacího gelu), nitrocelulosové membrány (namočena předem na 30 s do destilované vody a poté do transferového pufru na 10 min), 2 filtračních papírů a dvou těsnění. Na zdroji blotovacího zařízení Mini Trans-Blot bylo nastaveno elektrické napětí 25 V a čas 90 min. Volná místa na membráně byla zablokována blokovacím roztokem po dobu 60 min při teplotě 5 °C za stálého třepání. Poté byla membrána inkubována s 6 ml roztoku primární protilátky (kozí protilátka proti lidskému pepsinu A nebo C) po dobu asi 10 h při teplotě 5 °C za stálého třepání. Po odstranění roztoku primární protilátky byla membrána promyta za stálého třepání 5 krát 5 min v 50 ml promývacího roztoku. Membrána byla inkubována v 30 ml roztoku sekundární protilátky (oslí proti-kozí IgG značené křenovou peroxidásou) po dobu asi 10 h při teplotě 5 °C za stálého třepání. Membrána byla promyta za stálého třepání 5 krát 5 min v 50ml promývacího roztoku. Membrána byla pokapána 2 ml substrátu Luminata Classico Western HRP a reakce probíhala 5 min. Proteiny na membráně byly detekovány chemiluminiscencí a expozice na foto papír trvala 5 min, poté byl film vyvolán.

2.13 ANALYTICKÉ METODY

2.13.1 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ METODOU BCA

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou BCA. Stanovení je založeno na reakci peptidové vazby s Cu^{2+} ionty v alkalickém prostředí za vzniku Cu^+ iontů, které vytváří s BCA fialové komplexy. Stanovení bylo kalibrováno metodou kalibrační přímky změřených roztoků hovězího sérového albuminu (BSA) o známé koncentraci (31,3–1000 µg/ml)

Roztoky:

- Roztok A: BCA Protein Assay Reagent A (Pierce)
- Roztok B: 4% m/v CuSO₄
- Standard BSA o koncentraci 2 mg/ml (Pierce)

Postup:

Do mikrotitrační destičky se napipetuje 20 µl vzorku, standardu o známé koncentraci nebo blanku a přidá se 200 µl roztoku A a B (roztoky A a B v poměru 49:1). Mikrotitrační destička se nechá 5 min třepat a poté se 30 min inkubuje při 60 °C. Změří se absorbance při vlnové délce 540 nm. Při každém stanovení je sestavena kalibrační přímka.

2.13.2 STANOVENÍ PROTEOLYTICKÉ AKTIVITY MODIFIKOVANOU METODOU PODLE ANSONA A MIRSKEHO

Stanovení proteolytické aktivity bylo provedeno modifikovanou metodou podle Ansona a Mirskeho.⁴⁴

Roztoky:

- 0,3 M TCA
- 2 % m/v roztok hemoglobinu (0,25 g hemoglobinu se rozpustí v 10 ml destilované vody a přidá se 2,50 ml 0,3 M HCl)

Do mikrozkuhavky typu Eppendorf bylo odpipetováno 250 µl roztoku hemoglobinu a roztok byl temperován 10 min ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Přidá se 50 µl vzorku. Přesně po 10 min se reakce ukončí přidáním 500 µl 0,3 M TCA. Roztok byl odstředěn v centrifuze 15 min při 12 000 × g a teplotě 5 °C. Supernatant byl odpipetován do nové mikrozkuhavky a promíchán se. V roztoku byla stanovena koncentrace peptidů, které vznikly štěpením hemoglobinu působením pepsinu, BCA metodou. Jednotka proteolytické aktivity PU je definována jako takové množství enzymu, které přemění za 1 min při 37 °C a při pH 2 takové množství hemoglobinu, že vzniklé peptidy způsobí změnu absorbance o 0,001 při 540 nm měřenou metodou BCA.⁷⁴

2.13.3 STANOVENÍ OBSAHU VODY NOSIČŮ

Bylo zváženo 500 μl usazených magnetických agarosových částic a Sepharosy na analytických vahách. Po usušení nosičů byly opět zváženy a z rozdílů hmotností byl vypočten obsah vody v jednotlivých nosičích.

3 VÝSLEDKY

3.1 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE HEPTAPEPTIDŮ

Pro studium vazebných vlastností aspartátových proteinas (prasečího pepsinu A, potkaního pepsinu C, lidského pepsinu A a C) byly použity následující heptapeptidy obsahující D-leucinylové zbytky (ostatní aminokyselinové zbytky jsou L-konfigurace):

- Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu (-Phe-Phe- peptid)
- Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu (-Tyr-Phe- peptid)
- Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu (-Tyr-Tyr- peptid)
- Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu (-Phe-Tyr- peptid)

Peptid -Tyr-Tyr- a peptid -Phe-Tyr- byly připraveny ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR manuálně syntézou na pevné fázi dle N^α-Fmoc chemického protokolu. Tyto dva peptidy mají na C-konci amidovou funkční skupinu (-CONH₂). Peptid -Phe-Phe- a peptid -Tyr-Phe- byly vyrobeny na automatickém syntetizátoru peptidů komerční firmou Vidia; na C-konci peptidů je karboxylová funkční skupina (-COOH). Všechny heptapeptidy obsahují na N-konci peptidů protiion trifluoracetát. Každého peptidu bylo připraveno přibližně 50–70 mg.

Rozdílné funkční skupiny (-CONH₂ a -COOH) na C-konci peptidů nehrají roli při imobilizaci na nosiče, protože dochází k reakci -NH₂ skupiny na N-konci s bromkyanem aktivovanou Sepharosou nebo glyoxalem aktivovanými agarosovými magnetickými částicemi.

3.1.1 STANOVENÍ ČISTOTY PEPTIDŮ KAPALINOVOU CHROMATOGRafiÍ

Čistota vyrobených peptidů byla stanovena pomocí RP HPLC na koloně Vydac C-

18 při gradientu acetonitrilu. Z plochy píků u jednotlivých analýz byla vypočtena čistota peptidů jako procenta z plochy píků (Tab. 3.1). Čistota jednotlivých peptidů je: 96,8 % (peptid -Phe-Phe-), 98,4 % (peptid -Tyr-Phe-), 96,2 % (peptid -Tyr-Tyr-) a 95,5 % (peptid -Phe-Tyr-). Peptidy i bez přečištění jsou dostatečně čisté k imobilizacím na afinitní nosiče.

Tab. 3.1 Porovnání čistoty jednotlivých peptidů

Peptid	t, min	plocha píku, %
peptid -Phe-Phe-	8,9	1,8
	21,4	1,4
	22,7	96,8
peptid -Tyr-Phe-	26,0	0,7
	28,3	98,4
	32,0	0,8
peptid -Tyr-Tyr-	31,8	96,2
	33,3	3,8
peptid -Phe-Tyr-	31,9	4,5
	38,1	95,5

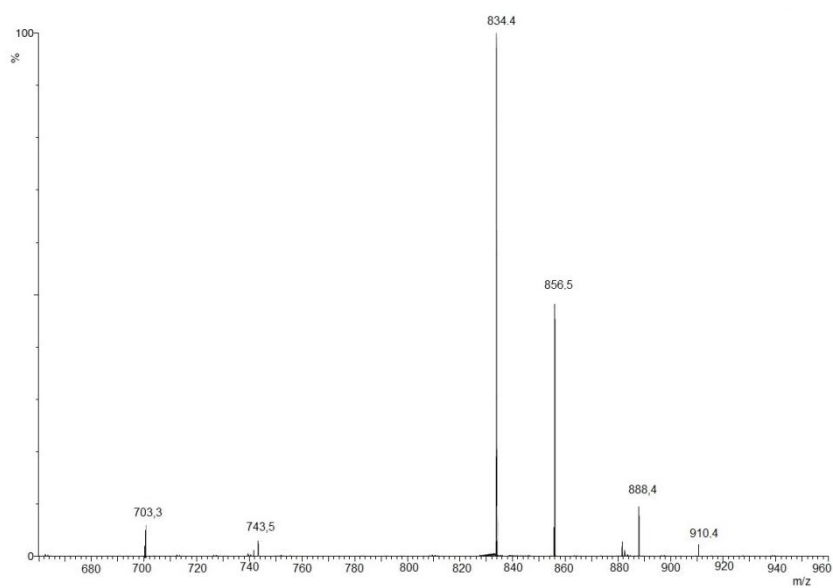
3.1.2 URČENÍ MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI PEPTIDŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektra peptidů byla získána na hmotnostním spektrometru Micromass Q-ToF (Waters) s elektrosprejovou ionizací. Analýzou hmotnostní spektrometrie (Obr. 3.1) byly potvrzeny teoreticky vypočtené molekulové hmotnosti (Tab. 3.2). Molekulové hmotnosti všech peptidů se liší minimálně, což je dáno složením peptidů, kdy se peptidy liší pouze v poloze a umístění L-fenylalaninu a L-tyrozinu v heptapeptidech.

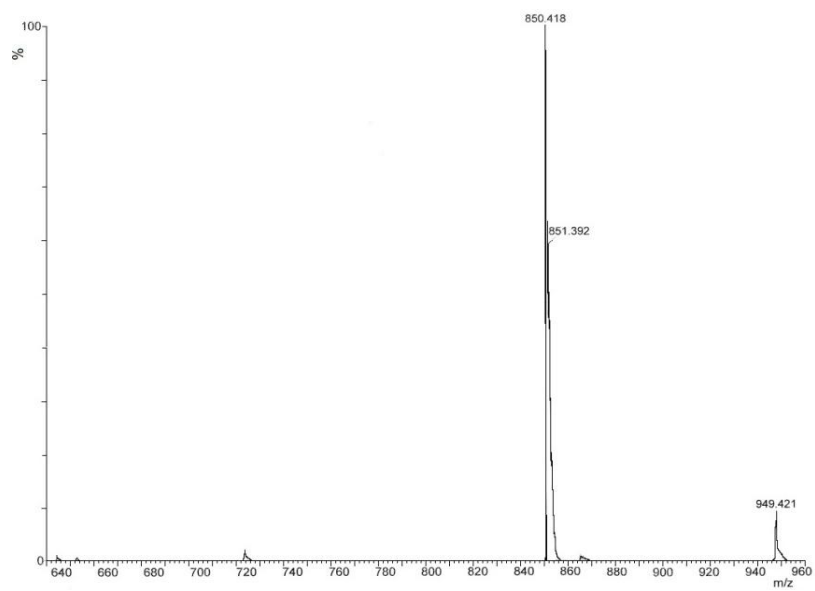
Tab. 3.2 Porovnání molekulových hmotností jednotlivých peptidů

Peptid	ion $[M+H]^+$ (experimentální hodnota)	M (teoretická hodnota)
peptid -Phe-Phe-	834,4	833,4
peptid -Tyr-Phe-	850,4	849,4
peptid -Tyr-Tyr-	865,5	864,5
peptid -Phe-Tyr-	849,5	848,5

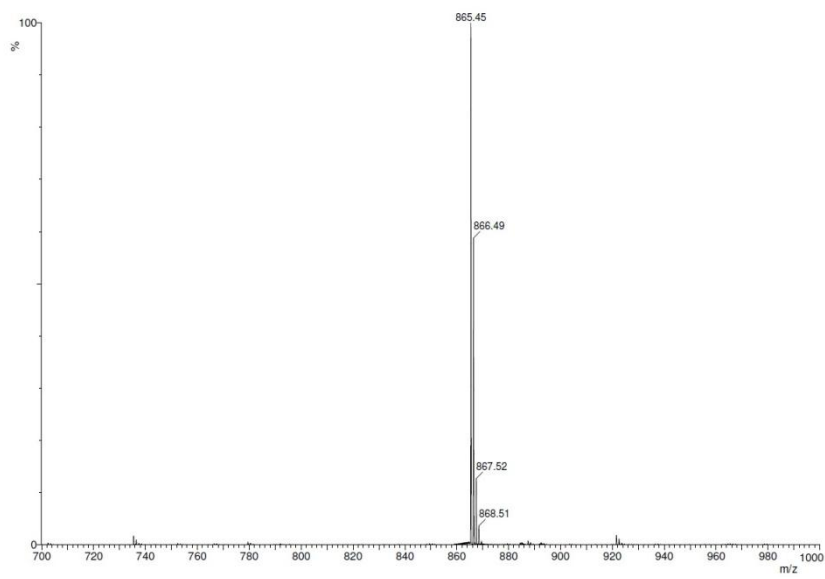
A



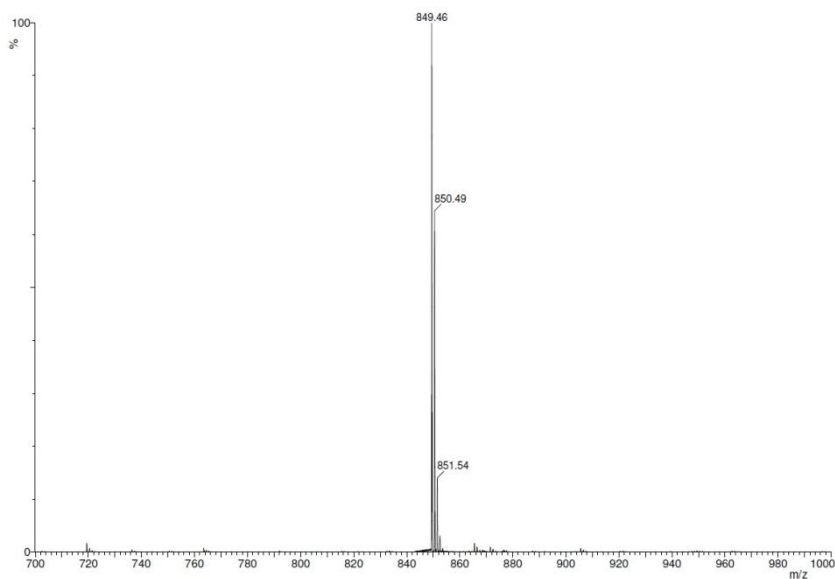
B



C



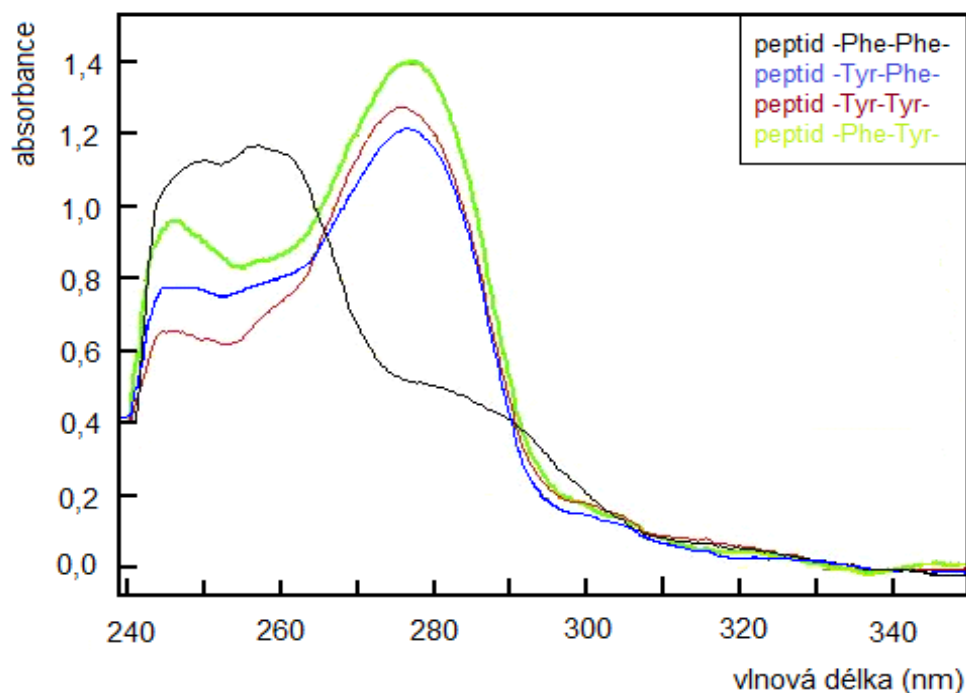
D



Obr. 3.1 Hmotnostní spektra peptidů -Phe-Phe- (A), -Tyr-Phe- (B), -Tyr-Tyr- (C) a -Phe-Tyr- (D)

3.1.3 ABSORPČNÍ SPEKTRA HEPTAPEPTIDŮ

Absorpční spektra peptidů byla změřena na spektrofotometru NanoDrop 1000 v rozsahu 240–350 nm a jsou ukázána na Obr. 3.2. Jediný peptid -Phe-Phe- dosahuje maxima při 260 nm díky dvěma zbytkům L-fenylalaninu. Ostatní tři peptidy -Tyr-Phe-, -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- dosahují maxima při 280 nm (přítomnost L-tyrozinu) a jejich absorpční spektra jsou velmi podobná.



Obr. 3.2 Absorpční spektra peptidu -Phe-Phe- (černá), peptidu -Tyr-Phe- (modrá), peptidu -Tyr-Tyr- (červená) a peptidu -Phe-Tyr- (zelená)

3.2 IMOBILIZACE PŘIPRAVENÝCH HEPTAPEPTIDŮ NA CNBr-SEPHAROSU A MAGNETICKÉ AGAROSOVÉ ČÁSTICE

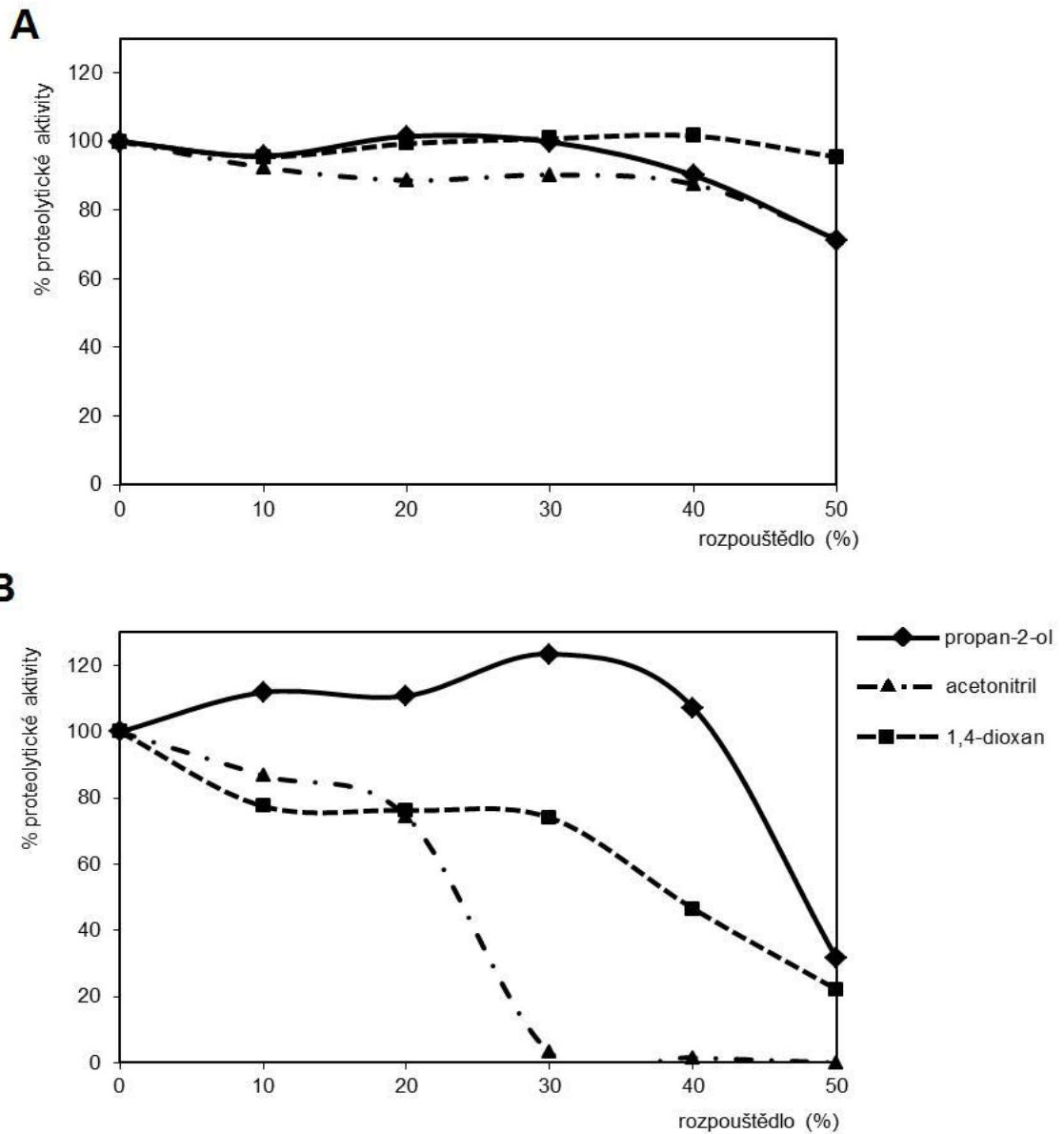
Pro studium interakcí různých aspartátových proteinas byly heptapeptidy, které se liší umístěním zbytků L-fenylalaninu či L-tyrozinu v polohách P_1 a P_1' , imobilizovány na dva typy afinitních nosičů: nemagnetickou Sepharosu aktivovanou bromkyanem a magnetické agarosové částice aktivované glyoxalem.

Nosiče byly zvoleny z důvodu nízkých nespecifických interakcí, odolnosti vůči běžným rozpouštědlům a stabilitě v rozmezí pH 4–9. (cit. ⁴⁸) Oba způsoby aktivace nosičů umožňují jednoduché navázání ligandů přes jejich volnou aminoskupinu.

Z rozdílu absorbance roztoků jednotlivých heptapeptidů před reakcí a po reakci a metodou kalibrační křivky bylo určeno přibližné množství imobilizovaného peptidu, což se pohybovalo v rozmezí 5–8 μmol ligandu na 1 ml nosiče. Množství imobilizovaných peptidů na oba nosiče se významně nelišilo a rozdíly nebyly ani mezi jednotlivými heptapeptidy.

3.3 Vliv rozpuštědel na aktivitu pepsinů

Byl zkoumán vliv různých koncentrací (0–50% v/v) rozpouštědel (propan-2-ol, ACN a 1, 4-dioxan) na aktivitu prasečího pepsinu A (Obr. 3.3 A) a potkaního pepsinu C (Obr. 3.3 B). Proteolytická aktivita potkaního pepsinu C je mnohem více ovlivňována vyššími koncentracemi rozpouštědel než aktivita prasečího pepsinu A. Zejména acetonitril v koncentracích vyšších než 20% v/v významně snižuje proteolytickou aktivitu potkaního pepsinu C, která při 30% v/v acetonitrilu je nulová. Aktivita prasečího pepsinu A je snížena pouze o 20% při použití až 40% v/v rozpouštědel. Použití koncentrovanějších rozpouštědel (nad 40% v/v) není vhodné, protože 0,1 M acetátový pufr pH 3,5 (adsorpční pufr) neudrží pH roztoků rozpouštědel. Na základě těchto výsledků bylo vyhodnoceno, že nejvhodnější eluční roztok bude 20% v/v propan-2-ol, protože nejméně snižuje aktivitu obou pepsinů.



Obr. 3.3 Vliv rozpouštědel na proteolytickou aktivitu prasečího pepsinu A (A) a potkaního pepsin C (B)

vzorky: prasečí pepsin A (0,2 mg) v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 (1 ml) a lyofilizovaný extrakt potkaní žaludeční sliznice (2 mg) v 0,1 M acetátového pufru pH 3,5(1 ml); rozpouštědla (0–50% v/v) v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; proteolytická aktivita byla stanovena modifikovanou metodou dle Ansona a Mirského (viz 2.13.2.), proteolytická aktivita je vyjádřena v % aktivity enzymů bez přítomnosti rozpouštědel

3.4 KINETICKÉ A INHIBIČNÍ STUDIUM PEPSINŮ A HEPTA-PEPTIDŮ (INHIBITORŮ)

Byla změřena závislost reakční rychlosti reakcí katalyzovaných prasečím pepsinem A a potkaním pepsinem C na koncentraci substrátu (hovězí hemoglobin). K výpočtu K_m byla použita linearizace rovnice Michaelise a Mentenové podle Lineweavera a Burkea dle rovnice (3.1), kde v je reakční rychlost, v_{\max} maximální rychlost, c_s je koncentrace substrátu a K_m Michaelisova konstanta:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{c_s} \quad (3.1)$$

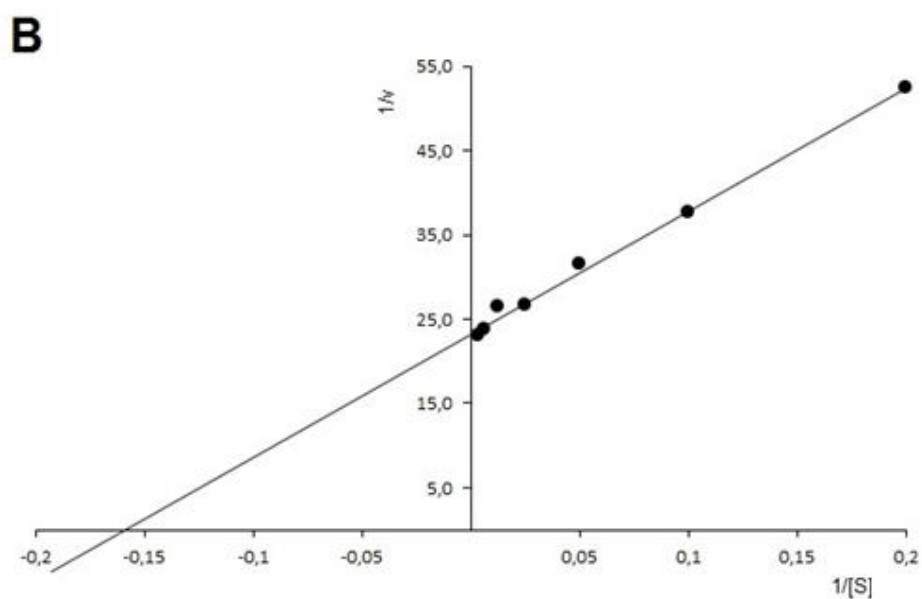
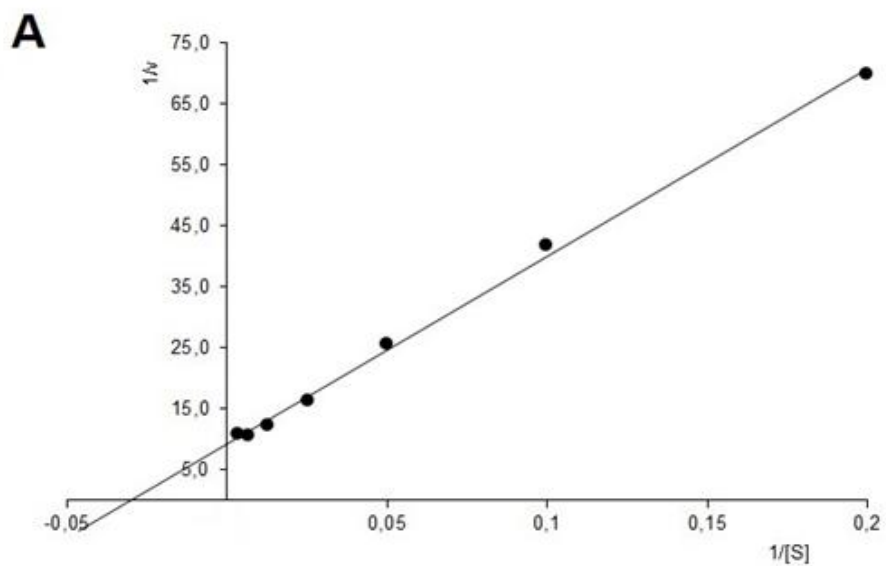
Stanovená hodnota K_m prasečího pepsinu A pro substrát hemoglobin je $33,3 \mu\text{M}$ a K_m potkaního pepsinu C pro substrát hemoglobin je $6,3 \mu\text{M}$. Potkaní pepsin C rychleji štěpí hemoglobin než prasečí pepsin A. Maximální rychlost prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C byla $0,108 \Delta\text{A}/\text{min}$ a $0,043 \Delta\text{A}/\text{min}$.

Inhibiční konstanty (Obr. 3.5 a 3.6) byly vypočteny dosazením experimentálních dat do rovnic charakterizujících nekompetitivní inhibici (rovnice (3.2)), kompetitivní inhibici (rovnice (3.3)) a smíšenou inhibici (rovnice 3.4)), kde V_{lim} je maximální reakční rychlost, $[A]$ je koncentrace substrátu, K_{ic} je inhibiční konstanta pro kompetitivní inhibici, K_{iu} inhibiční konstanta pro nekompetitivní inhibici a $[I]$ je koncentrace inhibitoru. Data byla získána nelineární regresí v programu Microsoft Excel.

$$v = \frac{V_{\text{lim}} [A]}{(K_m + [A]) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (3.2)$$

$$v = \frac{V_{\text{lim}} [A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{ic}}}\right) + [A]} \quad (3.3)$$

$$v = \frac{V_{\text{lim}} [A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{ic}}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{iu}}}\right) [A]} \quad (3.4)$$



Obr. 3.4 Dvojnásobně reciproký graf podle Lineweavera a Burkea závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu

A) enzym: 0,2 mg prasečího pepsinu v 1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

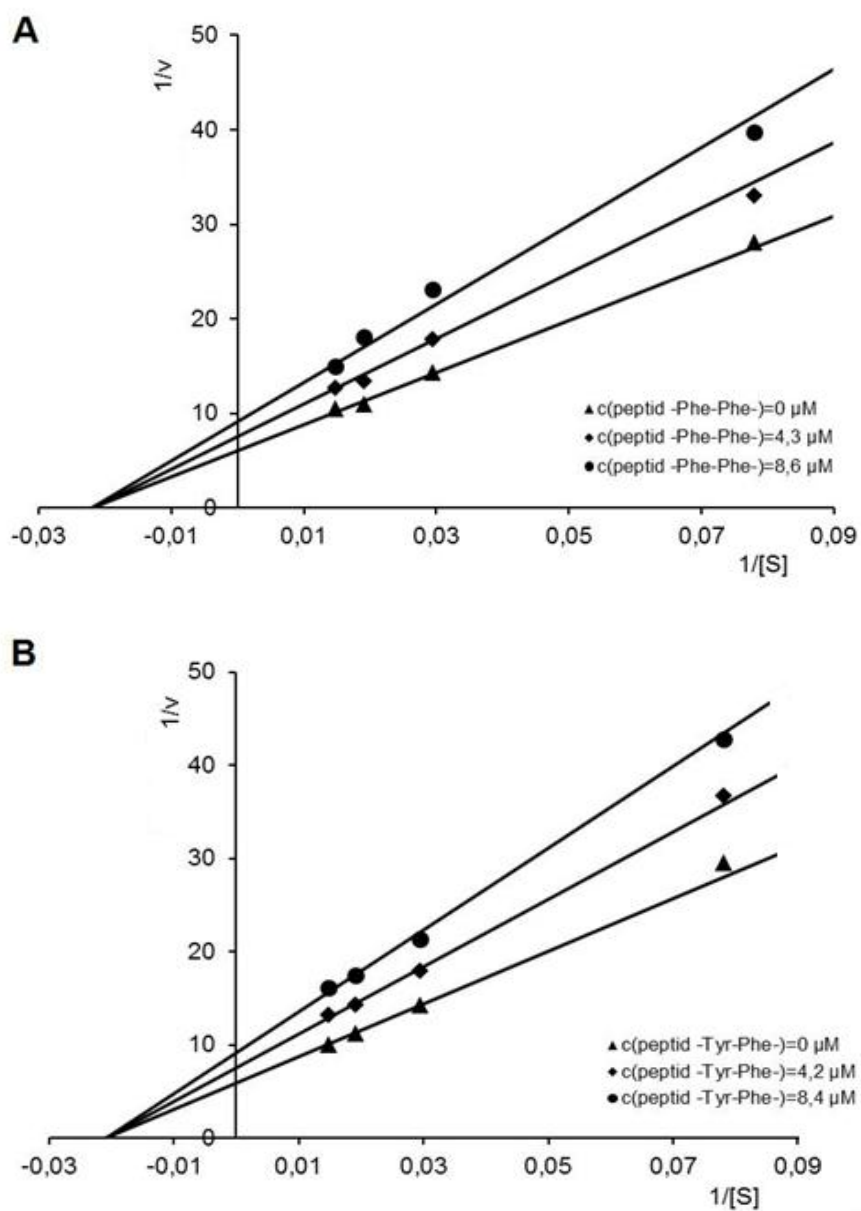
B) enzym: 4 mg potkaního pepsinu v 1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5

substrát: 5–282,8 μmol hemoglobinu/l, reakční čas: 6 min

Byly vypočteny K_i heptapeptidů -Phe-Phe- a -Tyr-Phe- pro prasečí pepsin A a pro potkaní pepsin C (viz Tab. 3.3). Bylo však zjištěno, že peptid -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- neinhibují ani prasečí pepsin A a ani potkaní pepsin C (nezobrazeno).

Tab. 3.3 Vypočtené inhibiční konstanty a typ inhibice

Enzym	Inhibitor	K_i, μM	Typ inhibice
prasečí pepsin A	peptid -Phe-Phe-	18,1	nekompetitivní
prasečí pepsin A	peptid -Tyr-Phe-	14,0	nekompetitivní
potkaní pepsin C	peptid -Tyr-Tyr-	6,4	nekompetitivní
potkaní pepsin C	peptid -Tyr-Phe-	4,2	nekompetitivní

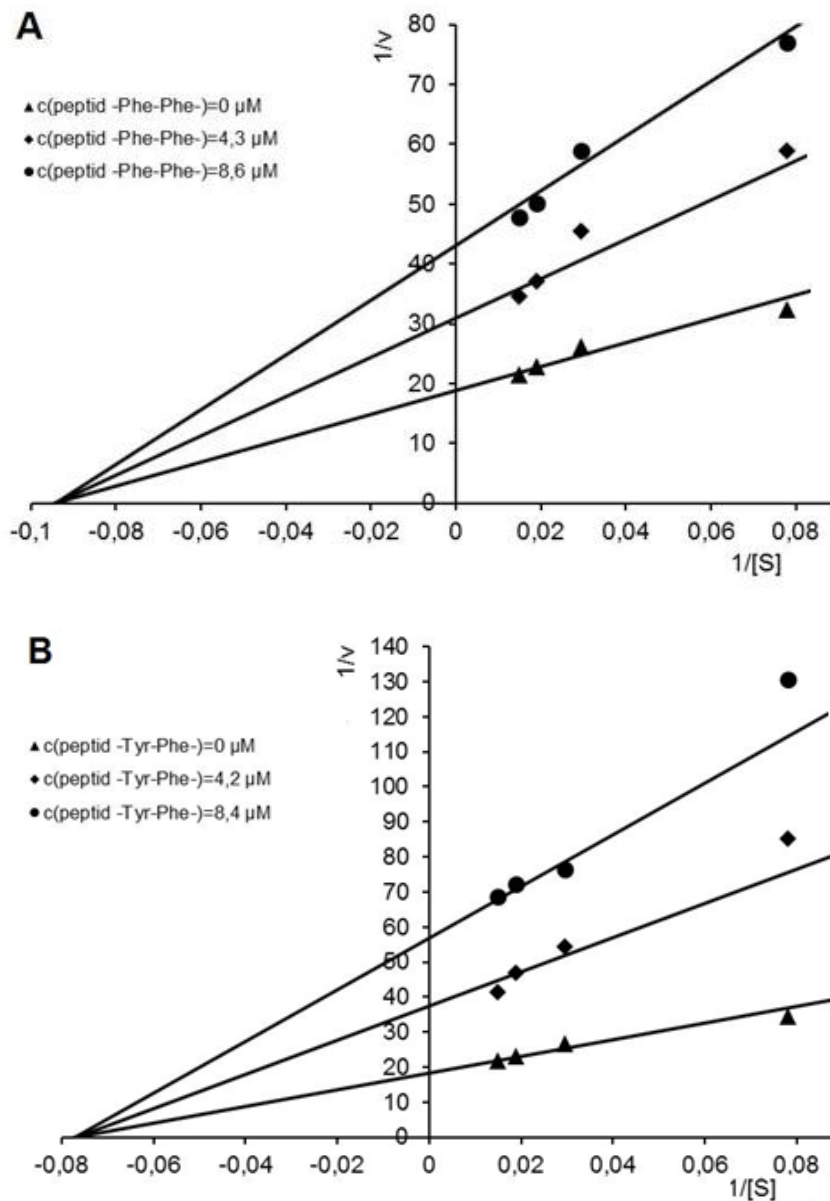


Obr. 3.5 Dvojnásobně reciproký graf závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu

A) prasečí pepsin A a peptid -Phe-Phe-

B) prasečí pepsin A a peptid -Tyr-Phe-

roztok enzymu: 0,2 mg prasečího pepsinu A / 1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5; roztok substrátu: 1,5; 2,2; 3,4 a 4,3 g hemoglobinu/l reakční směsi, každý roztok byl okyselený HCl na pH 2, roztok peptidu: 3,6 a 7,1 mg peptidu/l reakční směsi



Obr. 3.6 Dvojnásobně reciproký graf závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu

A) potkaní pepsin C a peptid -Phe-Phe-

B) potkaní pepsin C a peptid -Tyr-Phe-

roztok enzymu: 4 mg lyofilizovaného extraktu žaludeční sliznice potkana/1 ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5; roztok substrátu: 1,5; 2,2; 3,4 a 4,3 g hemoglobinu/l reakční směsi, každý roztok byl okyselený HCl na pH 2, roztok peptidu: 3,6 a 7,1 mg peptidu/l reakční směsi

3.5 KAPACITA A OBSAH VODY NOSIČŮ

Byla stanovena kapacita jednotlivých nosičů s imobilizovanými peptidy nasycením nosiče roztokem prasečího pepsinu A, dokud proteolytická aktivita a množství proteinů v odebíraných frakcích nevykazovaly konstantní hodnotu. Kapacita byla vyjádřena v miligramech prasečího pepsinu adsorbovaného na 1 ml sorbentu. Kapacita magnetických částic je menší než kapacita Sepharosy (Tab. 3.4), zejména u magnetických částic s imobilizovaným peptidem -Phe-Phe a -Phe-Tyr-. Průměrná kapacita CNBr-Sepharosy s imobilizovanými peptidy je 39 mg/ml a agarosových magnetických částic s imobilizovanými peptidy 26 mg/ml.

U CNBr-Sepharosy a magnetických agarosových částic s glyoxalem byl stanoven obsah vody vysušením 0,5 g jednotlivých nosičů. Obsah vody v magnetických částicích byl 92 % m/m a v Sepharose 82 % m/m. Zjištěný obsah vody v Sepharose je srovnatelný s údajem od výrobce nosiče, který uvádí, že 1 g suchého nosiče nabobtná na ~4,5 ml gelu.

Tab. 3.4 Kapacity jednotlivých nosičů

Nosič	Kapacita (mg prasečího pepsinu/ml nosiče)			
	Imobilizovaný peptid			
	-Phe-Phe-	-Tyr-Phe-	-Tyr-Tyr-	-Phe-Tyr-
CNBr-Sepharosa s imob. peptidy	35	42	44	34
Agarosové magnetické částice s imob. peptidy	19	35	30	18

3.6 NESPECIFICKÉ INTERAKCE NOSIČŮ

Bylo zjišťováno, zda se na CNBr-Sepharosu a magnetické agarosové částice s glyoxalem s imobilizovanými peptidy nevážou také jiné proteiny, protože v afinitní chromatografii se jedná o specifickou a reverzibilní interakci mezi studovanou látkou a ligandem. Byly vybrány α -chymotrypsin a trypsin jako zástupci serinových proteinas vyskytujících se v trávicím ústrojí a BSA jako zástupce proteinů krevní plasmy.

Tab. 3.5 shrnuje naměřená data z frakcí, které obsahují nenavázané a eluované proteiny, po analýze tří odlišných proteinů. Nespecifické interakce s trypsinem a α -chymotrypsinem nevykazují magnetické částice se všemi ligandy (eluované proteiny do 8 %) a Sepharosa s imobilizovanými peptidy -Phe-Phe- a -Tyr-Phe-. Desorpce trypsinu a α -chymotrypsinu do 30% vykazuje Sepharosa s imobilizovanými peptidy -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr-; tuto hodnotu překračuje jen trypsin s 58 % desorpcí ze Sepharosy s imobilizovaným peptidem -Tyr-Tyr-. Vyšší nespecifické interakce vykazuje BSA se Sepharosou s imobilizovanými peptidy -Phe-Phe- a -Phe-Tyr- (36 %), heptapeptidy -Tyr-Phe- a -Tyr-Tyr- imobilizovanými na Sepharose a magnetickými částicemi se všemi ligandy (50–60 %). Pokud se k separacím pepsinů či pepsinogenů budou používat vzorky žaludeční šťávy či homogenáty žaludeční sliznice tak lze použít všechny čtyři typy magnetických agarosových částic s imobilizovanými heptapeptidy a Sepharosa s imobilizovanými heptapeptidy -Phe-Phe- a -Tyr-Phe-.

Tab. 3.5 Interakce albuminu, trypsinu a α -chymotrypsinu se Sepharosou a magnetickými agarosovými částicemi obsahující imobilizované heptapeptidy

Vzorek: 0,2 mg (na magnetické částice) nebo 2 mg (na Sepharosu) albuminu, trypsinu a α -chymotrypsinu /ml
0,1 M acetátového pufru pH 3,5; množství proteinů měřeno BCA metodou

Nosič	Frakce	Množství proteinů, %											
		peptid -Phe-Phe-			peptid -Tyr-Phe-			peptid -Tyr-Tyr-			peptid -Phe-Tyr-		
Protein		BSA	try- psin	α - chymo- trypsin	BSA	try- psin	α - chymo- trypsin	BSA	try- psin	α - chymo- trypsin	BSA	try- psin	α - chymo- trypsin
Sepharosa	nenavázané proteiny	76	101	105	62	108	109	64	60	85	73	86	86
	eluované proteiny	36	0	0	53	0	0	55	58	32	36	29	22
Magnetické částice	nenavázané proteiny	61	96	102	58	97	92	54	94	91	69	100	100
	eluované proteiny	50	8	6	61	8	6	62	5	4	53	4	5

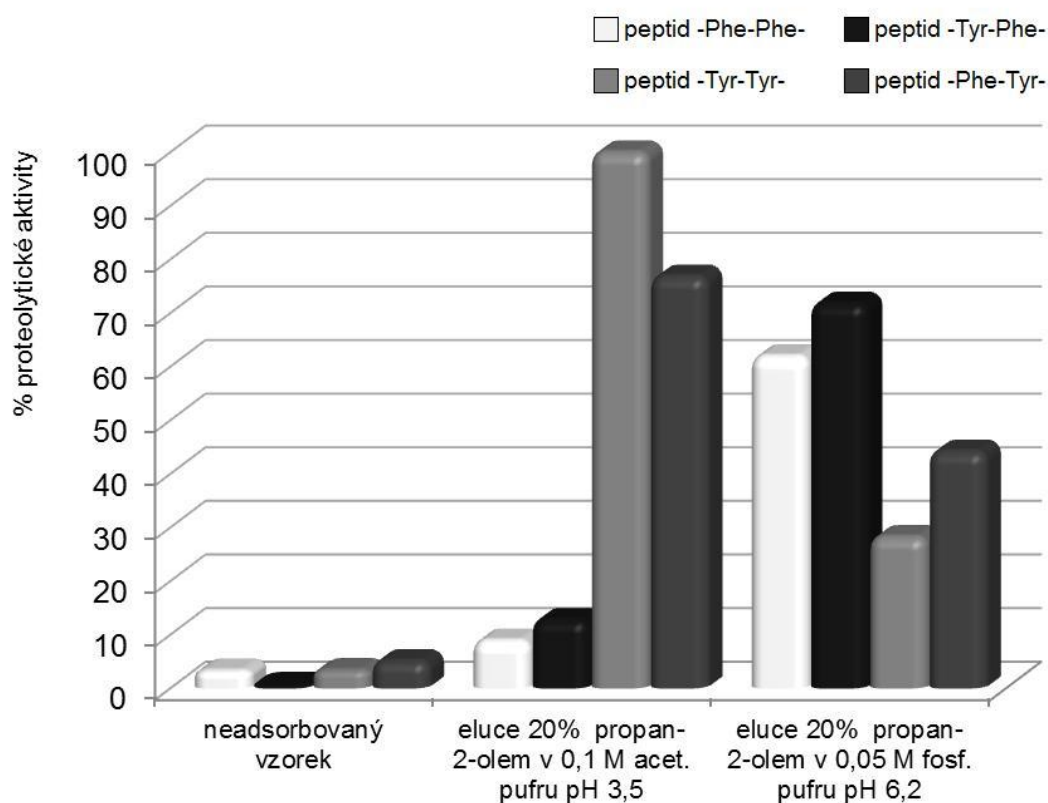
3.7 INTERAKCE PRASEČÍCH A POTKANÍCH PEPSINŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA MAGNETICKÝCH AGAROSOVÝCH ČÁSTICÍCH A SEPHAROSE

Syntetické heptapeptidy Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu, Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu, Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu a Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu, které byly imobilizovány na dva typy afinitních nosičů: nemagnetickou Sepharosu aktivovanou bromkyanem a magnetické agarosové částice aktivované glyoxalem, byly použity ke studiu vazebných vlastností prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C a poté k separaci lidských pepsinů. Použité heptapeptidy se liší v obsahu a poloze zbytků L-fenylalaninu a L-tyrozinu.

3.7.1 INTERAKCE PRASEČÍHO PEPSINU A A POTKANÍHO PEPSINU C S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA MAGNETICKÝCH AGAROSOVÝCH ČÁSTICÍCH

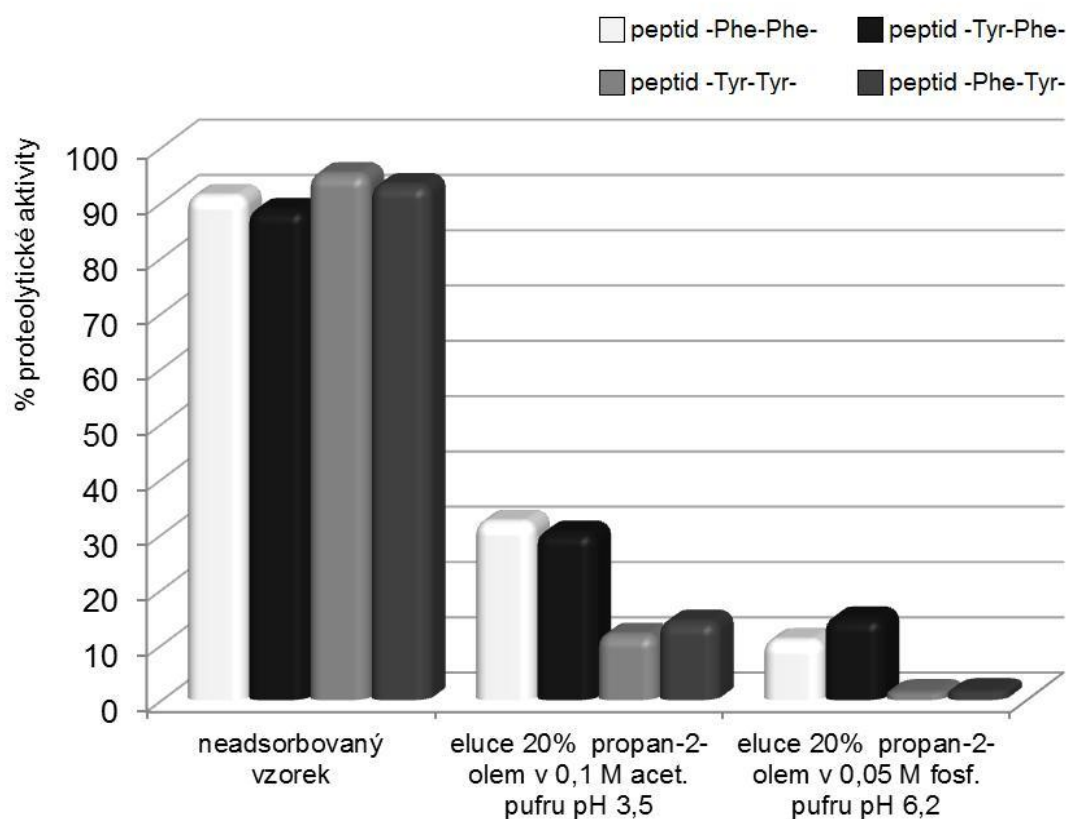
Připravené heptapeptidy imobilizované na agarosové magnetické částice byly v prvních fázích použity pro studium jejich interakce s prasečím pepsinem A a potkaním pepsinem C. Podmínky pro adsorpci proteas byly optimalizovány (0,1 M acetátový pufr obsahující 0–1 M NaCl, pH 2–4) a nejvyšší adsorpce byla určena při použití 0,1 M acetátového pufru, pH 3,5. Pro eluci adsorbovaných proteas z modifikovaných magnetických částic byl aplikován pokles polarity elučního pufru přidáním organických rozpouštědel: pufr obsahující 20% v/v 2-propanol (kap. 3.3). Vysoké hodnoty aktivity stanovené při pokusech s potkaním pepsinem C jsou pravděpodobně způsobené aktivačním působením 2- propanolu na aktivitu tohoto enzymu. Prasečí pepsin A byl adsorbován na všechny heptapeptidy imobilizované na magnetické částice (Obr. 3.7). (cit. ^{75, 76}) Podmínky nutné pro eluci tohoto enzymu se však lišily. Zatímco pro uvolnění adsorbovaného prasečího pepsinu na imobilizovaný peptid -Phe-Phe- a -Tyr-Phe- bylo nutné použít 0,05 M fosfátový pufr pH 6,2 obsahující 20% v/v 2-propanol. Prasečí pepsin A adsorbovaný na imobilizované heptapeptidy s uspořádáním -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- byl eluován již startovním pufrem (0,1 M acetátový pufr pH 3,5) obsahujícím 20% v/v 2-propanol.

Na rozdíl od prasečího pepsinu A, potkaní pepsin C se na heptapeptidy imobilizované na magnetické částice neadsorboval; 89–95 % proteolytické aktivity bylo vymyto startovním pufrem (Obr. 3.8). (cit. ^{75, 76})



Obr. 3.7 Interakce prasečího pepsinu A s heptapeptidy -Phe-Phe- (bílá), -Tyr-Phe- (černá), -Tyr-Tyr- (světle šedá) a -Phe-Tyr- (tmavě šedá) imobilizovanými na magnetických agarosových částicích

použité vzorky: prasečí pepsin (0,2 mg/ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5); 500 μ l vzorku aplikováno na magnetické částice (50 μ l); neadsorbovaný enzym a promytí 3 krát 500 μ l 0,1 M acetátovým pufrům pH 3,5; eluce 3 krát 500 μ l 20 % v/v propan-2-olu v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 3 krát 500 μ l 20% v/v propan-2-olu v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mírského (viz kap. 2.13.2)



Obr. 3.8 Interakce potkaního pepsinu C s heptapeptidy -Phe-Phe- (bílá), -Tyr-Phe- (černá), -Tyr-Tyr- (světle šedá) a -Phe-Tyr- (tmavě šedá) imobilizovanými na magnetických agarosových částicích

použité vzorky: extrakt žaludeční sliznice potkana (1 ml/16 ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5); 500 μ l vzorku aplikováno na magnetické částice (50 μ l); nadsorbovaný enzym a promytí 3 krát 500 μ l 0,1 M acetátovým pufrům pH 3,5; eluce 3 krát 500 μ l 20 % v/v propan-2-olu v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 3 krát 500 μ l 20% v/v propan-2-olu v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 2.13.2)

Za optimálních separačních podmínek byla provedena analýza prasečího pepsinu na magnetických agarosových částicích s imobilizovaným peptidem -Phe-Phe- desetkrát za stejných experimentálních podmínek. Proteolytická aktivita elučních frakcí byla vyhodnocena statisticky (Tab. 3.6). Ke statistickému vyhodnocení byly použity: směrodatná

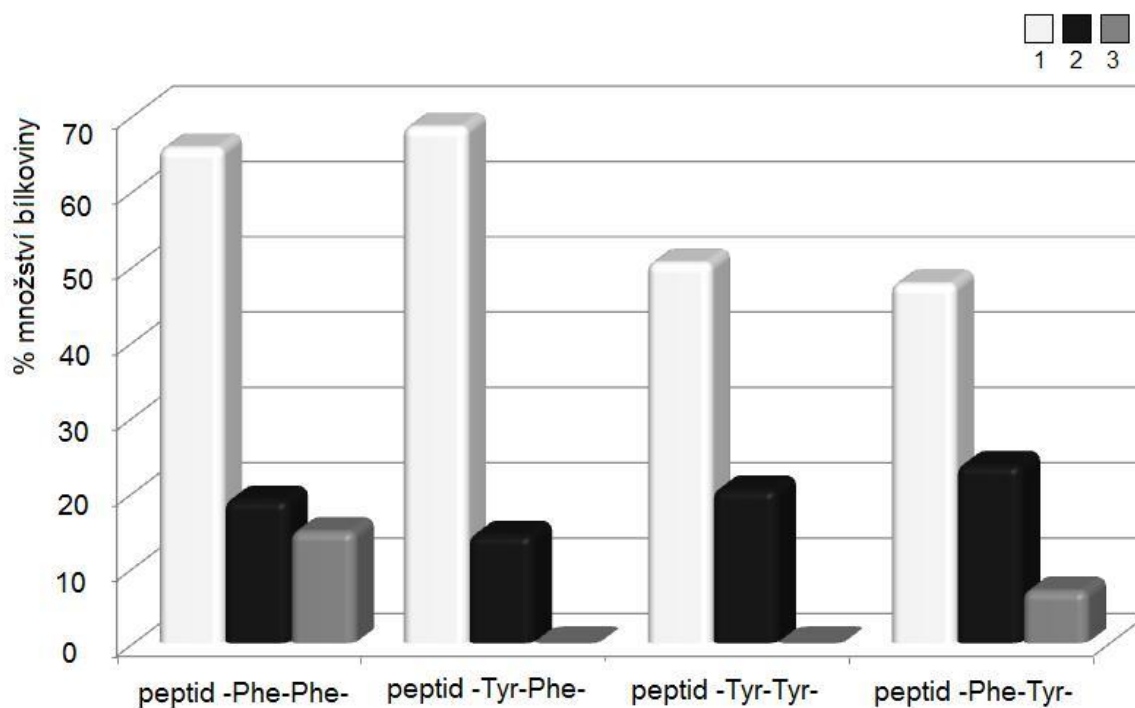
odchylka, relativní směrodatná odchylka, interval spolehlivosti, Grubbsův test a Dixonův test odlehlosti výsledků. Žádný z výsledků není odlehlý. Relativní směrodatná odchylka je 6,7% (magnetické agarosové částice s peptidem -Phe-Phe-) charakterizuje opakovatelnost daného počtu paralelních měření za stejných experimentálních podmínek.

Tab. 3.6 Statistické vyhodnocení výsledků z deseti analýz za stejných experimentálních podmínek

proteolytická aktivita, PU		
číslo analýzy	magnet. částice s imob. peptidem -Phe-Phe	Sepharosa s imob. peptidem -Phe-Phe-
1	1716	6587
2	1672	7563
3	1836	6324
4	1775	5963
5	1864	7120
6	1763	6457
7	1930	7541
8	1539	6584
9	1864	6850
10	1654	6742
průměr	1761	6773
směrodatná odchylka	118,5	513,1
relativní směrodatná odchylka	6,7 %	7,6 %
interval spolehlivosti	1761 ± 90	6773 ± 368
Grubbsův test	žádný výsledek není odlehlý	žádný výsledek není odlehlý
Dixonův test	žádný výsledek není odlehlý	žádný výsledek není odlehlý

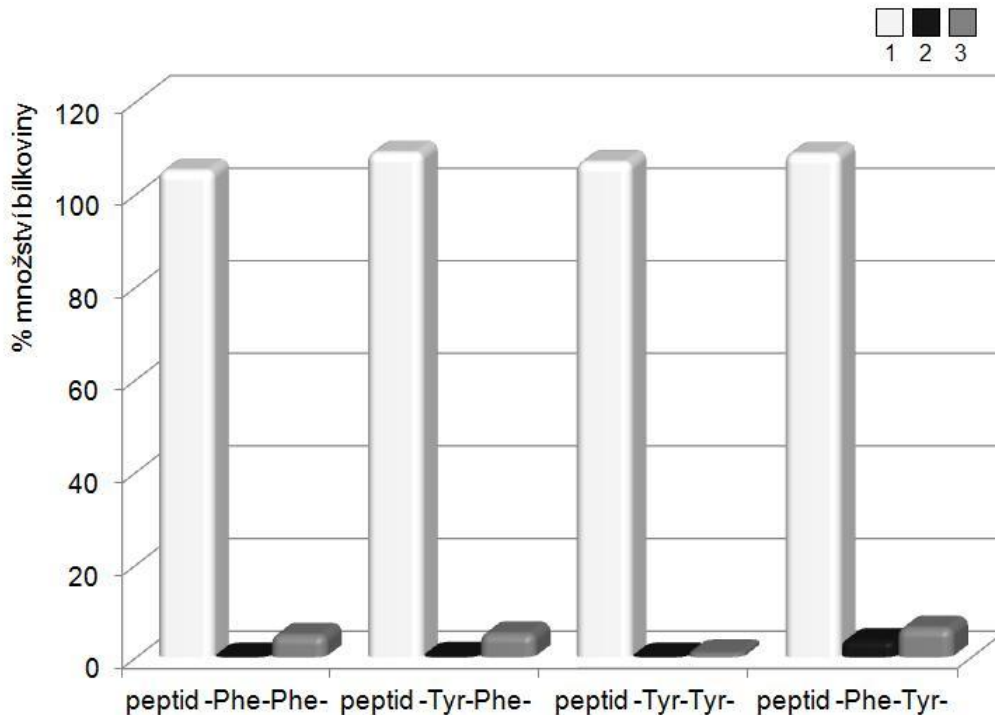
V přítomnosti pepstatinu se prasečí pepsin A na heptapeptidy imobilizované na magnetické částice neadsorboval (Obr. 3.9). Stejně tak v případě prasečího pepsinogenu A, studovaný zymogen ani s jedním z imobilizovaných heptapeptidů neinteragoval (Obr. 3.10). Získané výsledky ukazují, že při interakci prasečího pepsinu A s heptapeptidy v přítomnosti pepstatinu se účastní aktivní místo enzymu nebo oblasti enzymové molekuly, které jsou k němu blízké.

Získané výsledky ukázaly, že magnetické částice obsahující imobilizované heptapeptidy představují vhodný afinitní sorbent nejenom pro separaci pepsinu A a pepsinu C, ale také cenný nástroj pro studium vazebných vlastností proteolytických enzymů.



Obr. 3.9 Interakce prasečího pepsinu inhibovaného pepstatinem s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích

použitý vzorek: 0,2 mg prasečího pepsinu a 0,2 mg pepstatinu /ml 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 1: neadsorbovaný enzym a promytí 0,1 M acetátovým pufrům pH 3,5; 2: eluce 20 % v/v propan-2-olem v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 3: eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení koncentrace proteinů metodou BCA (viz kap. 2.14.1)



Obr. 3.10 Interakce prasečího pepsinogenu A s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích

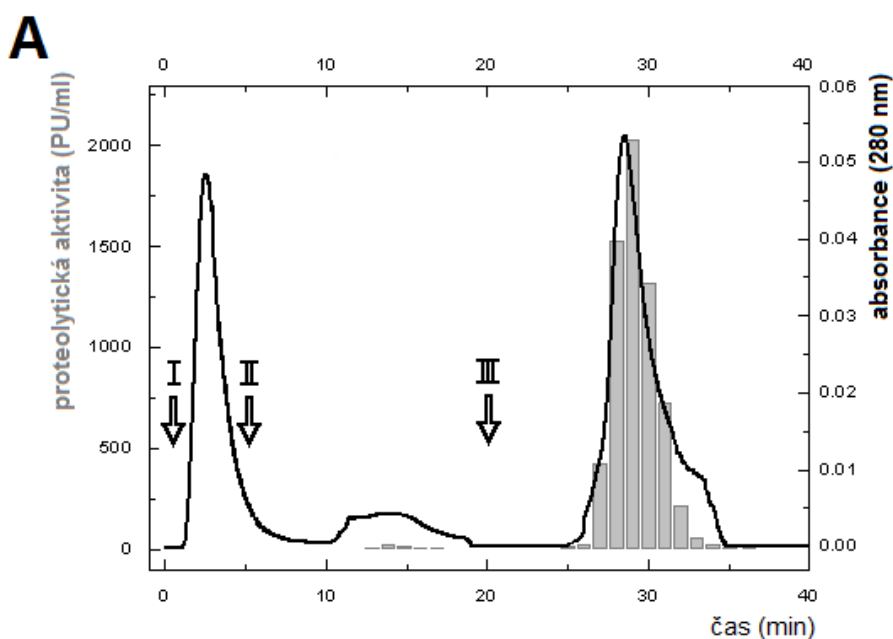
použitý vzorek: 1 ml extraktu žaludeční sliznice prasete v 11 ml 0,1 M acetátového pufru pH 6,2,1: neadsorbovaný enzym a promytí 0,1 M acetátovým pufrem pH 3,5; 2: eluce 20 % v/v propan-2-olem v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 3: eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení koncentrace proteinů metodou BCA (viz kap. 2.14.1)

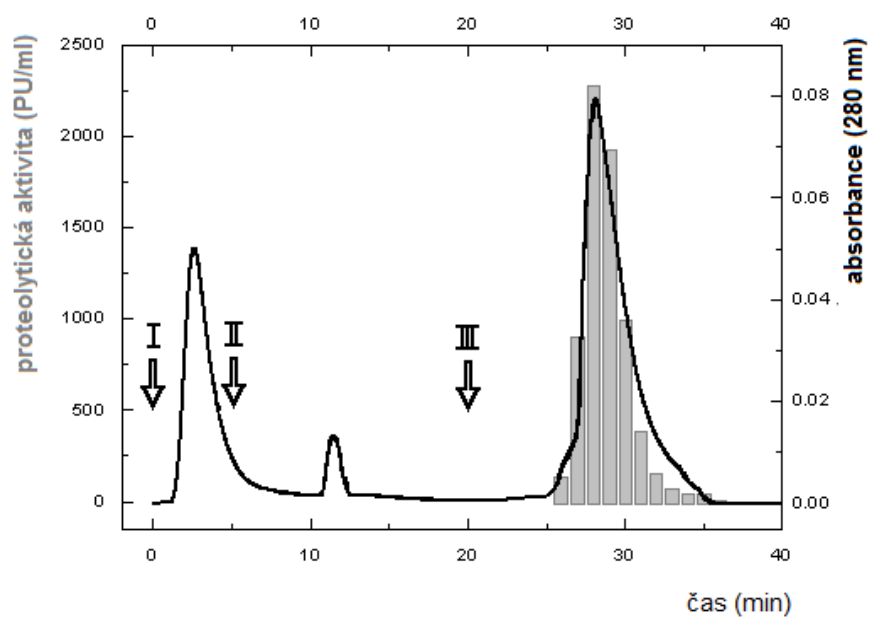
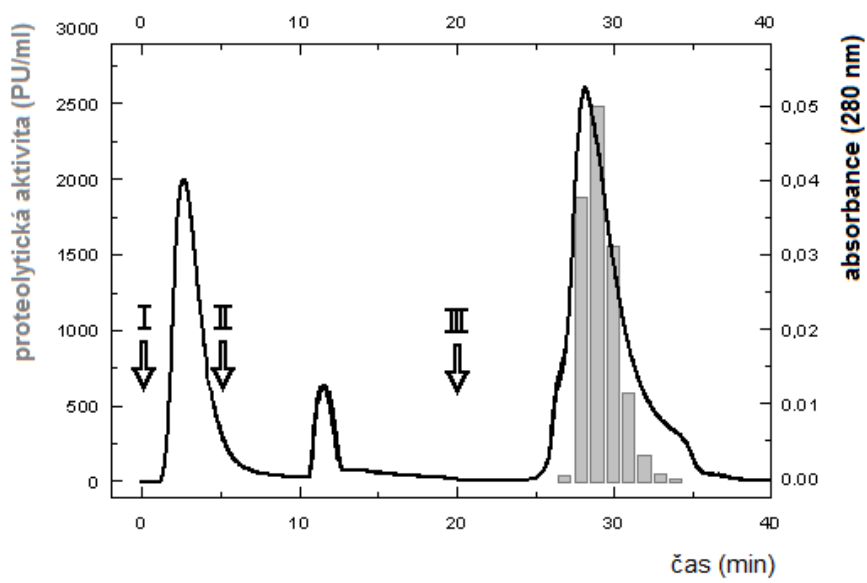
3.7.2 INTERAKCE PRASEČÍHO PEPSINU A A POTKANÍHO PEPSINU C S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA SEPHAROSU

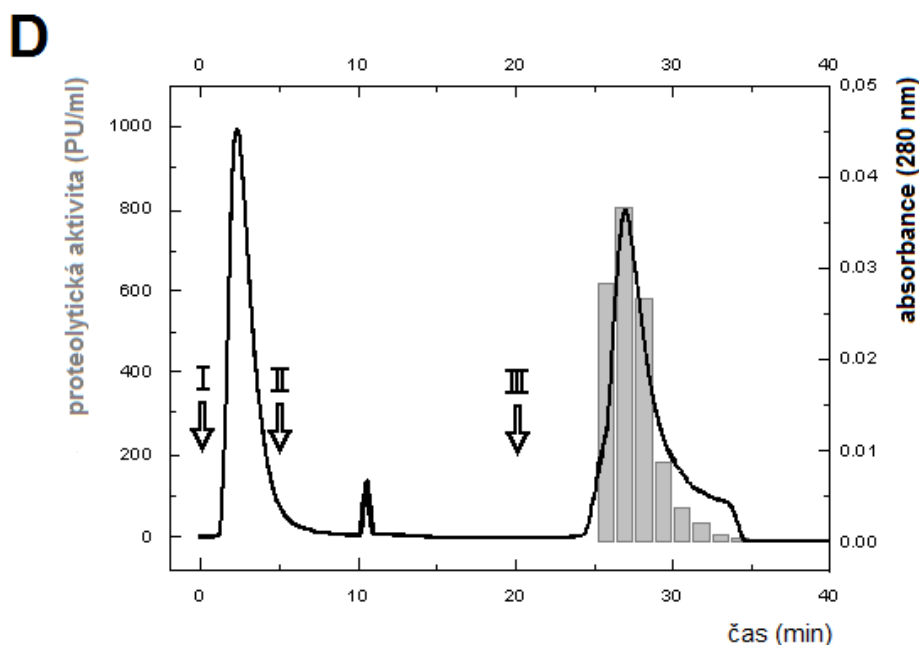
Interakce prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C se syntetickými heptapeptidy imobilizovanými na magnetické částice byla porovnána s chováním obou enzymů při afinitní chromatografii na Sepharose obsahujícím imobilizované peptidy vázané, stejně jako v případě magnetických částic, přes $-NH_2$ skupinu.⁷⁶ Podmínky afinitní separace byly

stejně, které byly použity pro studium interakcí těchto enzymů se stejnými ligandy vázanými na magnetické částice: adsorpce v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a eluce adsorbovaných enzymů 0,1 M acetátovým pufrům pH 3,5 obsahujícím 20% v/v 2-propanol, po které následovala eluce 0,05 M fosfátovým pufrům pH 6,2 obsahujícím 20% v/v 2-propanol (Obr. 3.11 a 3.12).

Prasečí pepsin A byl adsorbován na všechny heptapeptidy imobilizované na Sepharose a podmínky pro jeho eluci se nelišily, jak v případě magnetického nosiče (Obr. 3.7). Statistické vyhodnocení výsledků z deseti analýz za stejných experimentálních podmínek je uvedeno v Tab. 3.6.



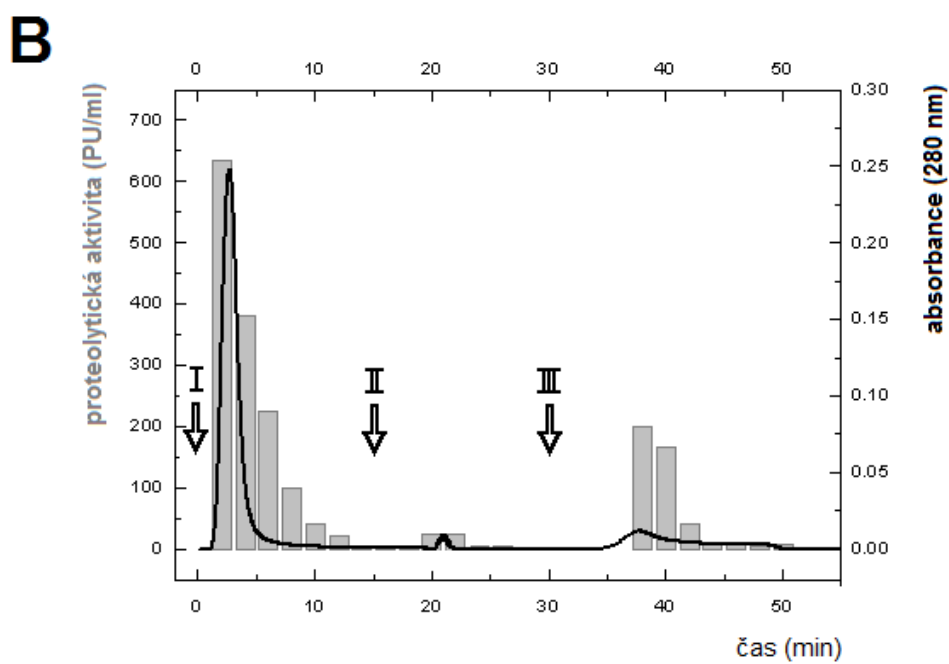
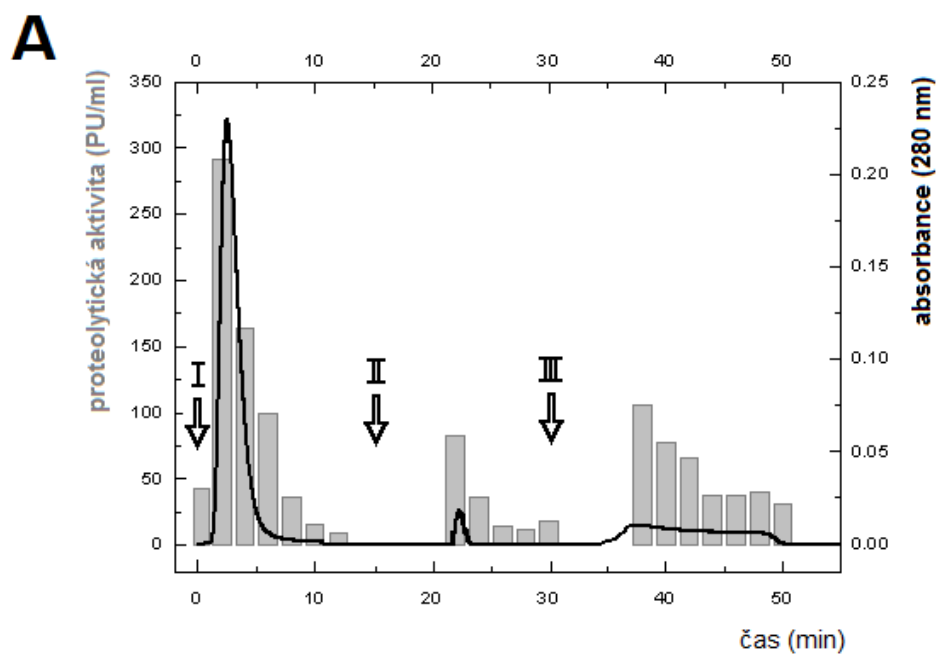
B**C**

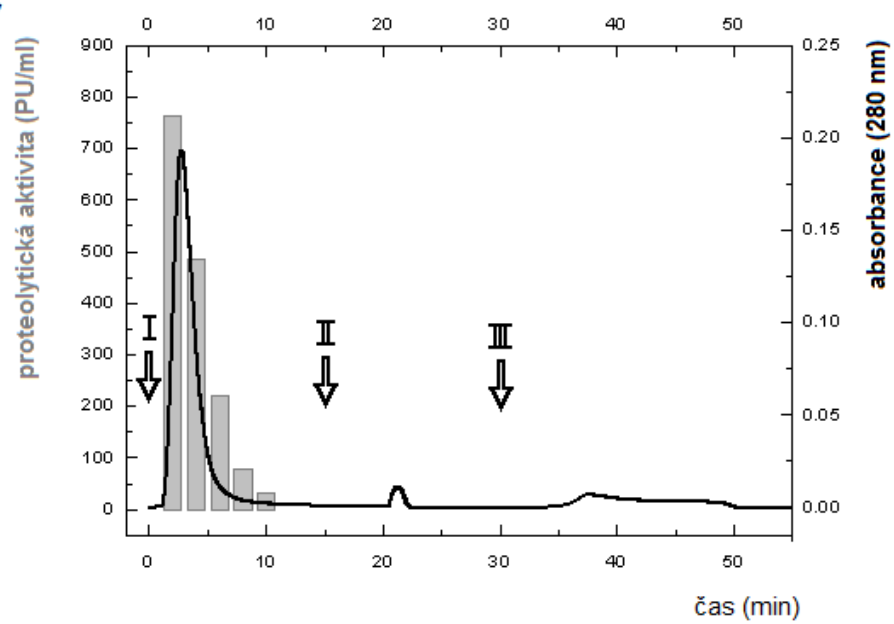


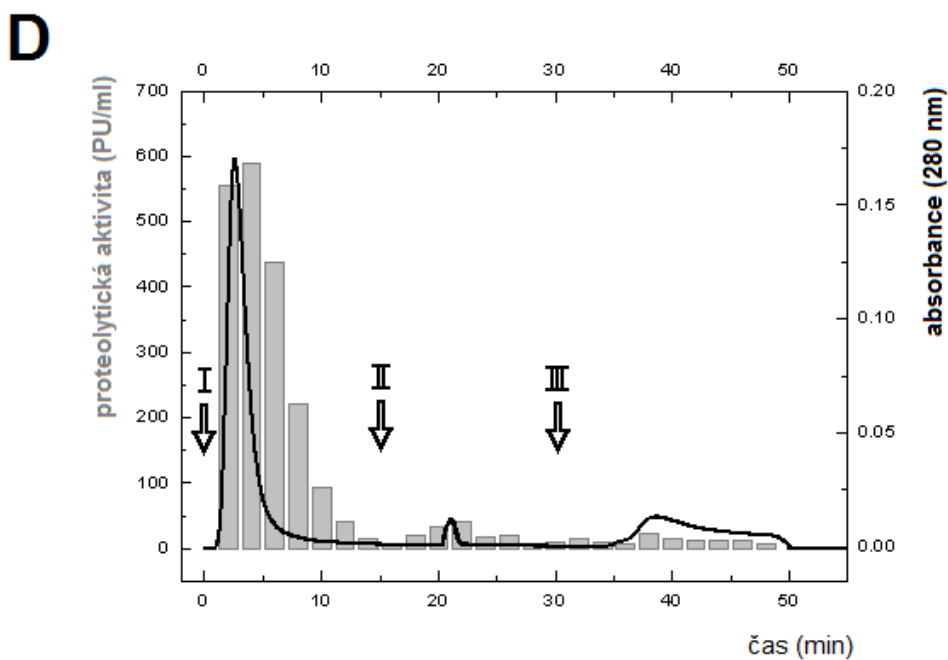
Obr. 3.11 Interakce prasečího pepsinu s peptidy -Phe-Phe-(A); -Tyr-Phe-(B); -Tyr-Tyr- (C) a -Phe-Tyr- (D) imobilizovanými na Sepharose

šedé sloupce: proteolytická aktivita; černá křivka: absorbance při 280 nm; I – 0,1 M acetátový pufr pH 3,5; II – eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; III – eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 2.13.2)

Na rozdíl od prasečího pepsinu A, velká část potkaního pepsinu C (Obr. 3.12) se na heptapeptidy imobilizované na Sepharosu neadsorbovala a za použitých podmínek byly proteiny s proteolytickou aktivitou vymyty startovním pufrům; pouze v případě -Tyr-Phe- a -Phe-Phe- heptapeptidů byla malá část potkaního pepsinu C adsorbována (Obr. 3.12). Výsledky studia interakce potkaního pepsinu C s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharose byly stejné jako výsledky získané s heptapeptidy imobilizovanými na magnetické částice: z testovaných heptapeptidů potkaní pepsin C jen částečně interagoval s -Phe-Phe- a -Tyr-Phe- peptidy.



C



Obr. 3.12 Interakce potkaního pepsinu C s peptidy -Phe-Phe- (A); -Tyr-Phe- (B); -Tyr-Tyr- (C) a -Phe-Tyr- (D) imobilizovanými na Sepharose

šedé sloupce: proteolytická aktivita; černá křivka: absorbance při 280 nm; I – 0,1 M acetátový pufr pH 3,5; II – eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; III – eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirskeho (viz kap. 2.13.2)

3.8 INTERAKCE LIDSKÝCH PEPSINŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA MAGNETICKÝCH AGAROSOVÝCH ČÁSTICÍCH A SEPHAROSE

Lidské pepsiny z lyofilizované žaludeční šťávy byly separovány na magnetických agarosových částicích a na Sepharose obsahujícím imobilizované heptapeptidy. Pro separaci byly použity lidské pepsiny z lyofilizované žaludeční lidské šťávy za podmínek nalezených jako nejvhodnějších pro separaci prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C:

adsorpce v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a eluce 20% v/v propan-2-olu v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a 20% v/v propan-2-olu v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2 (viz kap. 3.7).

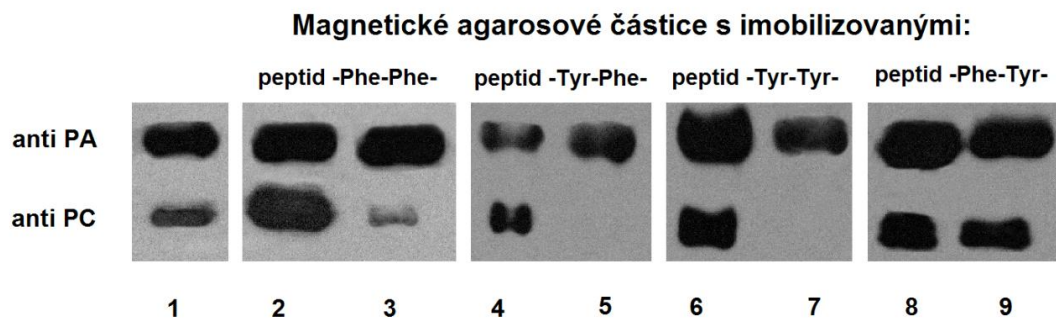
3.8.1 INTERAKCE LIDSKÝCH PEPSINŮ S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA MAGNETICKÝCH AGAROSOVÝCH ČÁSTICÍCH

Při použití adsorpčního pufru (0,1 M acetátový pufr pH 3,5), byly lidské pepsiny kompletně adsorbovány na oba typy nosičů, to znamená jak na heptapeptidy imobilizované na magnetické agarosové částice tak na tytéž ligandy vázané na Sepharose. Adsorbované pepsiny na magnetických částicích pak byly eluovány 20% v/v propan-2-olu v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5 a 20% v/v propan-2-olu v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2.

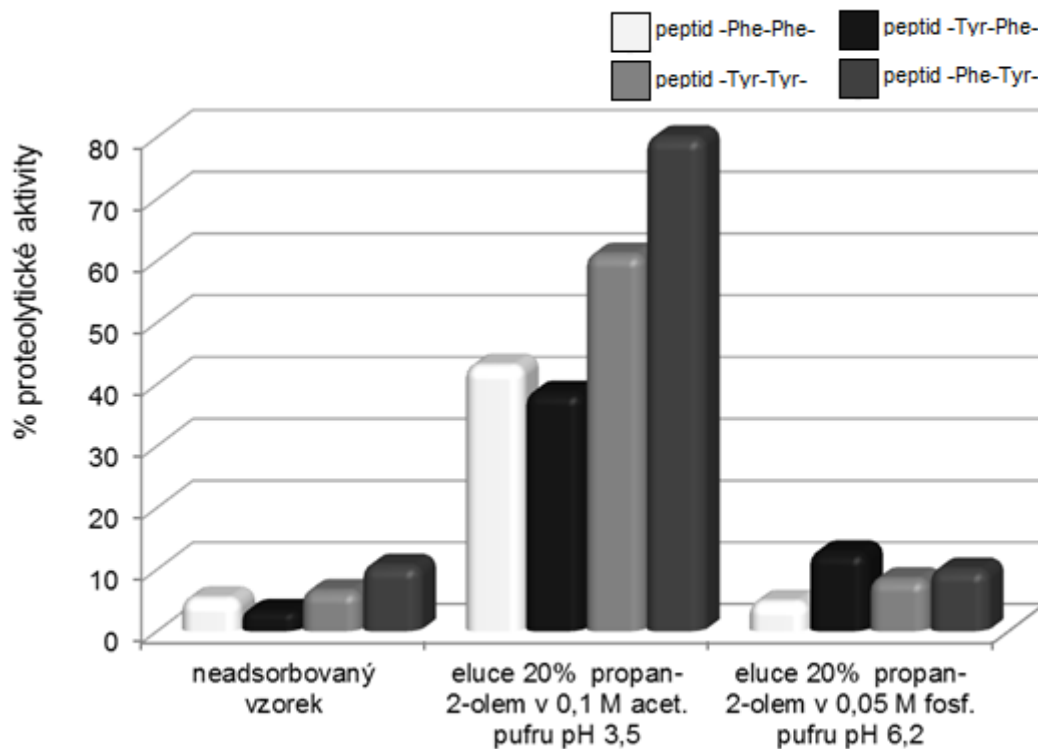
Jednotlivé frakce elučních píků ze separací lidské lyofilizované žaludeční šťávy afinitní separací na peptidech imobilizovaných na magnetických agarosových částicích a Sepharose byly zahuštěny na centrifugačních jednotkách a použity k identifikaci jednotlivých lidských pepsinů pomocí imunodetekce metodou western blot (Obr. 3.13).

Pepsiny adsorbované na magnetické částice s imobilizovanými heptapeptidy byly desorbovány převážně (40–80% aplikované proteolytické aktivity) v prvním píku (20% v/v propan-2-ol v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5), zatímco při eluci 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2 bylo získáno méně než 10% (Obr. 3.14).

Ani jeden z typů magnetického nosiče neseparuje kompletně lidské pepsiny A a C. Účinnější separační vlastnosti vykazují magnetické agarosové částice s imobilizovanými peptidy -Tyr-Phe- a -Tyr-Tyr-, kdy první eluční pík obsahuje oba pepsiny, ale druhý eluční pík již samotný pepsin A.



Obr. 3.13 Identifikace lidského pepsinu A a C separovaných na heptapeptidech -Phe-Phe-, -Tyr-Phe-, -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- imobilizovanými na magnetických agarosových částicích (1): vzorek lidské žaludeční šťávy (c=2 mg/ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5); (2, 4, 6 a 8): zahuštěné eluční frakce eluované 20% v/v propan-2-olem v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; (3, 5, 7 a 9): zahuštěné eluční frakce eluované 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2



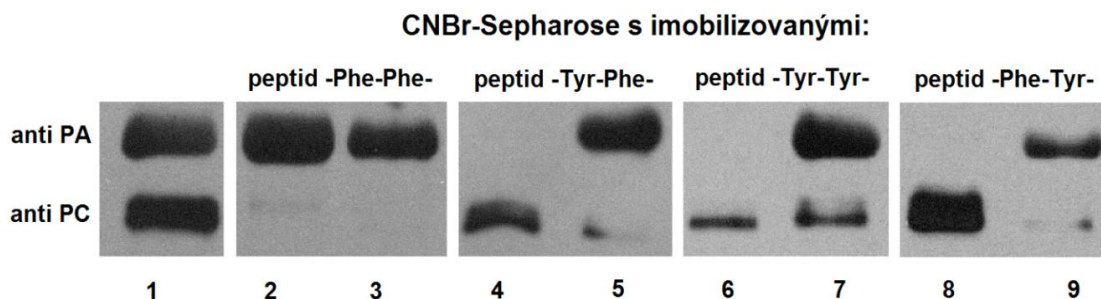
Obr. 3.14 Interakce lidských pepsinů s peptidy -Phe-Phe- (bílá), -Tyr-Phe- (černá), -Tyr-Tyr- (světle šedá) a -Phe-Tyr- (tmavě šedá) imobilizovanými na magnetických agarosových částicích

500 μ l vzorku ($c=0,2$ mg/ml) aplikováno na magnetické částice (50 μ l); neadsorbovaný enzym a promytí 3 krát 500 μ l 0,1 M acetátovým pufrům pH 3,5; eluce 3 krát 500 μ l 20 %v/v propan-2-olu v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 3 krát 500 μ l 20% v/v propan-2-olu v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirskeho (viz kap. 2.13.2)

3.8.2 INTERAKCE LIDSKÝCH PEPSINŮ A A C S HEPTAPEPTIDY IMOBILIZOVANÝMI NA SEPHAROSE

Separace lidského pepsinu A a pepsinu C na kolonách s imobilizovanými heptapeptidy na Sepharose jsou zobrazeny na Obr. 3.16. Jak bylo uvedeno v předcházející

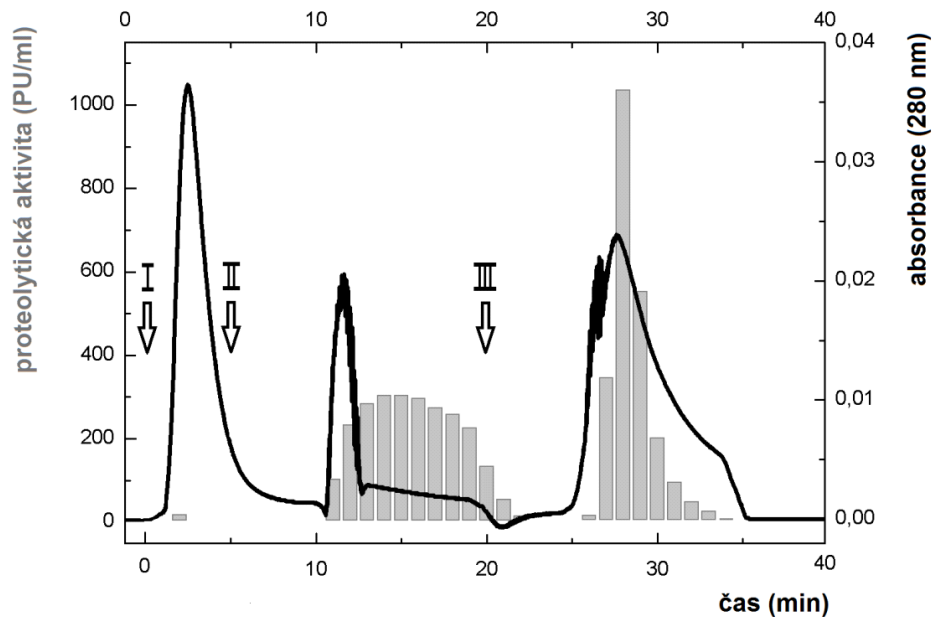
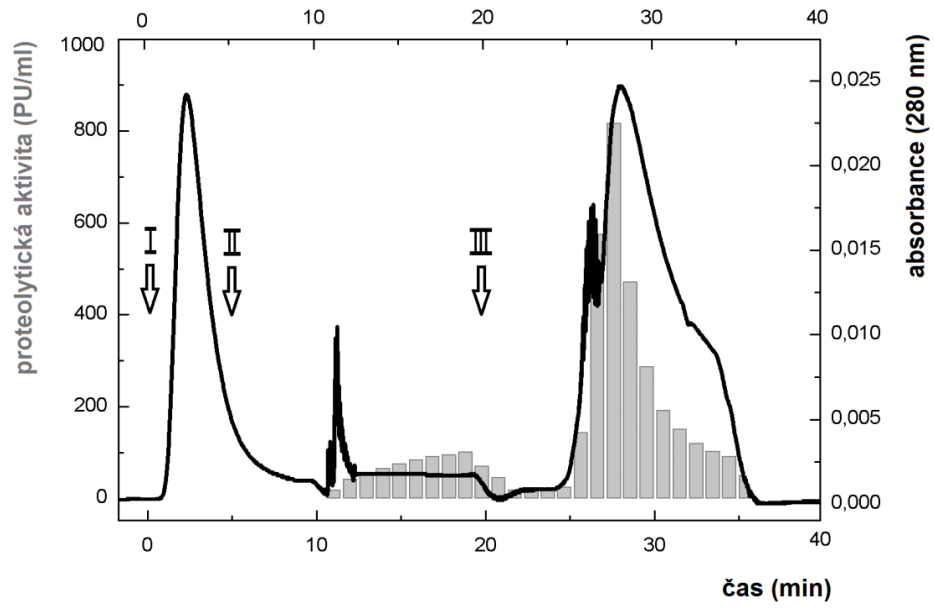
kapitole, pro identifikaci jednotlivých lidských pepsinů po separaci pomocí imobilizovaných heptapeptidů na Sepharose byla použita imunodetekce metodou western blot (Obr. 3.15).

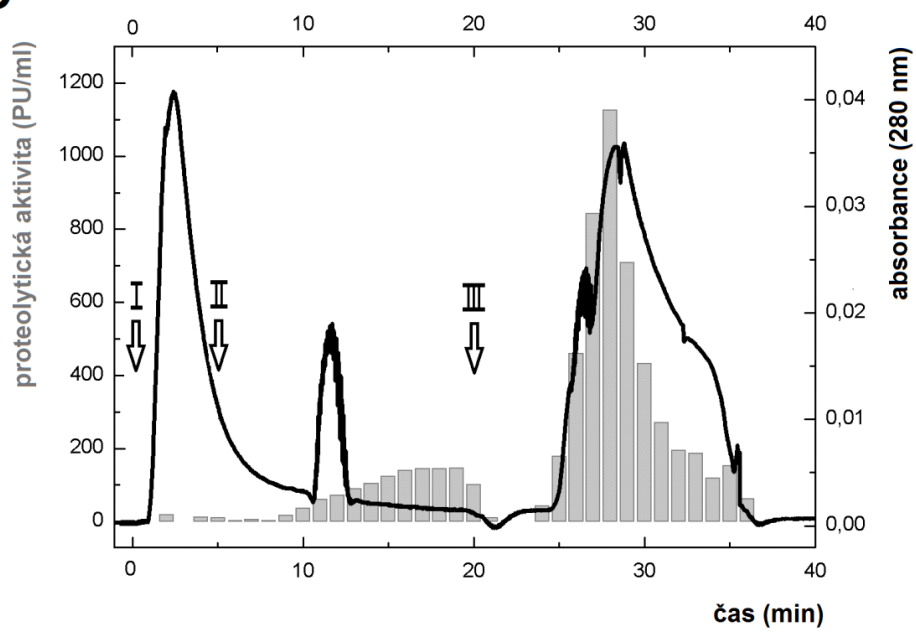


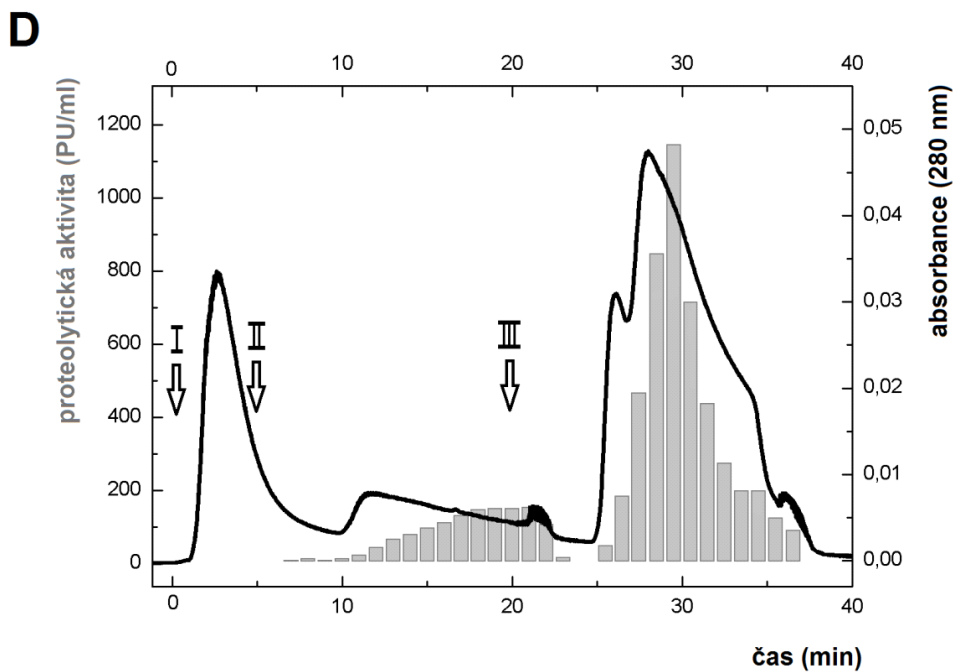
Obr. 3.15 Identifikace lidského pepsinu A a C separovaných pomocí peptidů -Phe-Phe-, -Tyr-Phe-, -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- imobilizovaných na Sepharose

(1): vzorek lidské žaludeční šťávy (c=2 mg/ml 0,1 M acetátového pufru pH 3,5); (2, 4, 6 a 8): zahuštěné eluční frakce eluované 20% v/v propan-2-olem v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; (3, 5, 7 a 9): zahuštěné eluční frakce eluované 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2.

Na Sepharose jsou pepsiny separovány vždy ve dvou elučních píkách, kdy elucí 20% v/v propan-2-olem ve 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2 bylo získáno větší množství enzymu. K separaci pepsinu A a C je nejvhodnější použít Sepharosu s imobilizovaným peptidem -Tyr-Phe- nebo -Phe-Tyr-, protože tyto dva nosiče separují oba pepsiny a to tak, že v prvním elučním píku je pouze pepsin C a v druhé elučním píku pepsin A.

A**B**

C



Obr. 3.16 Interakce lidských pepsinů s peptidy -Phe-Phe-(A); -Tyr-Phe-(B); -Tyr-Tyr- (C) a -Phe-Tyr- (D) imobilizovanými na Sepharose

Šedé sloupce: proteolytická aktivita; černá křivka: absorbance při 280 nm; I – 0,1 M acetátový pufr pH 3,5; II – eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; III – eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirskeho (viz kap. 2.13.2)

4 DISKUZE

Úkolem předkládané práce bylo vypracování jednoduché a rychlé metody a zároveň specifické, která by umožňovala rozlišit jednotlivé typy pepsinů a stanovit jejich změny. Jak již bylo uvedeno v Úvodu, např. u lidí nízké hodnoty pepsinogenu A nebo nízký poměr pepsinogenu A k pepsinogenu C v krevním séru mohou sloužit jako markery pro časná stádia rakoviny žaludku.^{7, 13, 14, 28} Pro tento účel jsme zvolili magnetickou separační techniku s imobilizovanými peptidy.

I když různé typy ligandů vázaných na magnetické nosiče byly popsány pro použití v afinitních separacích,^{50, 69} existuje velmi omezený počet aplikací imobilizovaných peptidů specifických pro jeden protein. Navíc takový ligand vedle toho, že specificky interaguje s daným proteinem, by se neměl nespecificky vázat na jiné proteiny. V prvních pokusech byl použit syntetický inhibitor (Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu) obsahující dva zbytky D-aminokyseliny (D-leucinu). Původně byl popsán jako inhibitor kathepsinu C⁷⁷, později pak jako kompetitivní inhibitor lidského pepsin A a lidského pepsin C v roztoku.⁷⁸ Tento inhibitor pak byl imobilizován na Sepharosu a použit pro purifikaci lidského, prasečího a kuřecího pepsinu A^{78, 79} nebo byl navázan na membránu pro adsorpci prasečího pepsinu A.⁸⁰

V naší práci⁷⁵ byl imobilizován syntetický heptapeptid Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu na magnetické agarosové částice aktivované glyoxalem. V souladu s popsányými výsledky získanými na Sepharose s imobilizovaným inhibitorem^{78, 79} také modifikované magnetické částice interagovaly s prasečím pepsinem A a lidským pepsinem A. Na rozdíl od literatury^{78, 79} nebyla pozorována žádná interakce v případě potkaního pepsinu C a lidského pepsinu C. To může být způsobeno odlišnou metodou vazby heptapeptidů na nosič.

Ačkoliv aspartátové proteinasy jsou si ve svých troj-rozměrných strukturách velmi podobné, existují velké rozdíly v katalytických vlastnostech, zvláště v substrátových specifitách. Bylo ukázáno, že zatímco pepsin A štěpí preferenčně -Phe-Xaa- peptidové

vazby, pepsin C vykazuje preferenční štěpení peptidových vazeb, kterých se účastní L-tyrozinové zbytky (-Tyr-Xaa-). Z tohoto důvodu byly připraveny heptapeptidy, které vedle přítomnosti D-leucinu obsahují jeden nebo oba L-fenylalaninové zbytky substituované L-tyrozinovými zbytky: Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu, Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu, Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu a Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu. Byly určeny K_i v roztoku pro peptidy -Phe-Phe- a -Tyr-Phe-, které inhibovaly prasečí pepsin A a potkaní pepsin C. Zajímavé bylo, že peptidy -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- neinhibují prasečí pepsin A a ani potkaní pepsin C.

Po imobilizaci všech čtyř heptapeptidů na magnetické agarosové částice byly testovány jejich schopnosti interagovat s prasečím pepsinem A a potkaním pepsinem C. Pro srovnání byly tyto heptapeptidy navázány na Sepharose a získané výsledky afinitní chromatografie pak byly porovnány s výsledky získanými na magnetických agarosových nosičích. Výsledky studia interakce potkaního pepsinu C s peptidy imobilizovanými na Sepharose a na magnetických částicích byly stejné: z testovaných heptapeptidů potkaního pepsin C jen částečně interagoval s peptidy -Phe-Phe- a -Tyr-Phe-.

Nejdříve byly na připravených nosičích zjišťovány nejvhodnější adsorpční a eluční chromatografické podmínky pro prasečí pepsin A a potkaní pepsin C. Vycházelo se z podmínek použitých v literatuře⁷⁹; vhodné pH adsorpčního roztoku k nejlepší adsorpci prasečího pepsinu bylo zjištěno jako pH 3,5 s ohledem na podmínky stability, aktivace a inaktivace pepsinů. Závislost aktivity adsorbovaného prasečího pepsinu A na pH acetátového pufru (výsledky nejsou zobrazeny) dosahuje nejvyšších hodnot při pH 2,5–3,0, ale pH adsorpčního pufru nemůže být takto nízké kvůli stabilitě nosičů. Adsorpce potkaního pepsinu C nebyla ovlivněna ani zvýšením iontové síly adsorpčního pufru (0,1 M acetátový pufr pH 3,5), do kterého bylo přidáno 0,5–1,0 M NaCl. Jako optimální adsorpční pufr byl tedy vybrán 0,1 M acetátový pufr pH 3,5 k interakcím prasečího pepsin A a potkaního pepsinu C jak na Sepharosu tak na magnetické agarosové částice s imobilizovanými heptapeptidy. Dále bylo zkoumáno složení vhodného elučního roztoku potřebného k nejvyšší eluci prasečího a potkaního pepsinu.

Pro eluci adsorbovaných proteas z magnetických agarosových částic a Sepharosy byl zvolen pokles polaritý elučního pufru přidáním ACN či 1, 4-dioxanu, jak bylo popsáno v předcházejících studiích^{78, 79} a propan-2-olu. Při výběru vhodného rozpouštědla o určité koncentraci byl sledován vliv rozpouštědel na aktivitu prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C. Proteolytická aktivita potkaního pepsinu C byla mnohem více ovlivňována koncentrovanějšími rozpouštědly než aktivita prasečího pepsin A. Zejména ACN v koncentracích vyšších než 20 % v/v významně snižuje proteolytickou aktivitu potkaního pepsinu C, která při 30 % v/v acetonitrilu je nulová .

Vliv organických rozpouštědel na aktivitu sledovaných aspartátových proteinas není možné vyloučit. V případě prasečího pepsinu A bylo popsáno, že enzym si uchovává svou aktivitu až do 50% v/v vodného roztoku acetonitrilu nebo 30% v/v 1,4-dioxanu. Při dalším růstu podílu organického rozpouštědla byl pozorován značný pokles aktivity prasečího pepsinu A.⁸¹

K separaci pepsinu A a C je nejvhodnější použít Sepharosu s imobilizovaným peptidem -Tyr-Phe- nebo -Phe-Tyr-, protože tyto dva nosiče separují oba pepsiny a to tak, že v prvním elučním píku je pouze pepsin C a v druhé elučním píku pepsin A. Separaci na peptidu -Tyr-Tyr- imobilizovaném na Sepharose nedošlo k separaci obou pepsinů, protože druhý eluční pík obsahoval také pepsin C. Imunodetekcí bylo zjištěno, že první i druhý eluční pík ze separace lidských pepsinů na peptidu -Phe-Phe- imobilizovaném na Sepharose obsahují pouze pepsin A.

Pepstatin izolovaný z *Streptomyces sp.* je inhibitorem některých aspartátových proteinas, který se váže na aktivní místo enzymu.^{16, 77} Naše výsledky ukázaly, že v přítomnosti pepstatinu se prasečí pepsin A na magnetické nosiče s imobilizovanými peptidy neváže, což ukazuje, že studované heptapeptidy se váží na molekuly pepsinu A do vazebného místa enzymu nebo alespoň v blízkém susedství tohoto místa. Tento fakt by mohl umožnit rozlišit molekuly enzymu, které se liší jenom málo v uspořádání aktivního místa nebo oddělit jednotlivé formy enzymu. Výsledky dále ukázaly, že prasečí PGA se na heptapeptidy imobilizované na magnetické agarosové částice neadsorboval. Postupy námi popsané mohou být užitečným nástrojem pro separaci pepsinu A a pepsinu C při studiu

žaludečních a duodenálních problémů jak v lidské tak veterinární medicíně. V současné době vhodná separační metoda pro aplikaci v klinických laboratořích není k dispozici. Pepsin A a pepsin C je možné separovat při použití např. chromatografie na DEAE-celulose³⁴ nebo pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)⁸², ale tyto metody je složité si představit pro diagnostické účely. V současné době existují pro analytické potřeby pouze metody využívající protilátky. Nami vypracovaná metoda představuje alternativní možnost pro určení úrovně pepsin-pepsinogen v tělních tekutinách a tkáních založená na jiném principu.

5 ZÁVĚR

Pro studium vazebných vlastností aspartátových proteinas (prasečího pepsinu A, potkaního pepsinu C, lidských pepsinů) byly připraveny následující heptapeptidy obsahující D-leucinylový zbytek (ostatní aminokyselinové zbytky jsou L-konfigurace):

Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu (-Phe-Phe peptid)

Val-D-Leu-Pro-Tyr-Phe-Val-D-Leu (-Tyr-Phe- peptid)

Val-D-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-D-Leu (-Tyr-Tyr-peptid)

Val-D-Leu-Pro-Phe-Tyr-Val-D-Leu (-Phe-Tyr- peptid).

Čistota vyrobených peptidů byla stanovena RP HPLC na koloně Vydac C-18, relativní molekulová hmotnost byla dále určena pomocí hmotnostní spektrometrie a byly změřeny absorpční spektra v oblasti 240–360 nm.

Byly určeny K_i v roztoku pro peptid -Phe-Phe- a -Tyr-Phe-, které inhibovaly prasečí pepsin A a potkaní pepsin C. Na rozdíl od těchto peptidů bylo zjištěno, že peptid -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- neinhibují prasečí pepsin A a ani potkaní pepsin C.

Připravené heptapeptidy byly imobilizovány přes volnou amino skupinu na magnetické agarosové částice aktivované glyoxalem a nebo na Sepharosu aktivovanou CNBr. Připravené nosiče byly charakterizovány určením kapacity pro prasečí pepsin A a stanovením obsahu vody.

Byla studována schopnost připravených afinitních sorbentů nespecificky adsorbovat další proteiny (hovězí sérový albuminu, trypsin a α -chymotrypsin z hovězího pankreatu).

Připravené heptapeptidy imobilizované na agarosové magnetické částice byly v prvních fázích použity pro studium jejich interakce s prasečím pepsinem A a potkaním pepsinem C. Podmínky pro adsorpci proteas byly optimalizovány. Zatím co prasečí pepsin A byl adsorbován na všechny heptapeptidy imobilizované na magnetické částice, potkaní pepsin C se na heptapeptidy imobilizované na magnetické částice neadsorboval; 89-95 % proteolytické aktivity bylo vymyto startovním pufrům. V přítomnosti pepstatinu se prasečí pepsin A na heptapeptidy imobilizované na magnetické částice neadsorboval.

Obdobné výsledky byly získány i při afinitní chromatografii na heptapeptidech imobilizovaných na Sepharose: prasečí pepsin A byl adsorbován na všechny imobilizované heptapeptidy, velká část potkaního pepsinu C se na heptapeptidy imobilizované na Sepharose neadsorbovala a za použitých podmínek proteolytická aktivita byla vymyta startovním pufrům.

Při použití adsorpčního pufru byly lidské pepsiny kompletně adsorbovány na oba typy nosičů, to znamená jak na heptapeptidy imobilizované na magnetické agarosové částice tak na tytéž ligandy vázané na Sepharose.

Ani jeden z typů magnetického nosiče neseparuje kompletně lidské pepsiny A a C. Účinnější separační vlastnosti vykazují magnetické agarosové částice s imobilizovanými heptapeptidy -Tyr-Phe- a -Tyr-Tyr-, kdy první eluční pík obsahuje oba pepsiny, ale druhý eluční pík již samotný pepsin A. Na Sepharose jsou pepsiny separovány vždy ve dvou elučních píkách. K separaci pepsinu A a C je nejvhodnější použít Sepharosu s imobilizovaným peptidem -Tyr-Phe- nebo -Phe-Tyr-, protože tyto dva nosiče separují oba pepsiny a to tak, že v prvním elučním píku je pouze pepsin C a v druhé elučním píku pepsin A.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Ghosh, A. K., Mannhold, R., Kubinyi, R., Folkers, G.: *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Target*. Germany, Wiley-VCH 2010.
2. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597 (1998).
3. Štosová, T., Havliš, J., Lenobel, R., Šebela, M.: *Chem. Listy* **99**, 896 (2005).
4. Fusek, M., Větvička, V.: *Aspartic proteinases: physiology and pathology*. Houston, CRP Press 1995.
5. Bai, G., Pfaff, S. L.: *Neuron* **72**, 9 (2011).
6. Turk, B., Turk, D., Turk, V.: *EMBO J.* **31**, 1630 (2012).
7. Gritti, I., Banfi, G., Roi, G. S.: *Pharm. Res.* **41**, 265 (2000).
8. Marcinišzyn, J., Sepulveda, P., Huang, W. Y., Lanier, J. P., Tang, J.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5076 (1975).
9. Dash, C., Kulkarni, A., Dunn, B., Rao, M.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 89 (2003).
10. Schmidt, P. G., Bernatowicz, M. S., Rich, D. H.: *Biochemistry* **21**, 6710 (1982).
11. Tang, J.: *J. Biol. Chem.* **246**, 4510 (1971).
12. Miki, K., Urita, Y.: *J. Dig. Dis.* **8**, 8 (2007).
13. Broutet, N., Plebani, M., Sakarovitch, C., Sipponen, P., Mégraud, F.: *Br. J. Cancer* **88**, 1239 (2003).
14. Mukoubayashi, C., Yanaoka, K., Ohata, H., Arii, K., Tamai, H., Oka, M., Ichinose, M.: *Int. Med.* **46**, 261 (2007).
15. Dunn, B. M.: *Chem. Rev.* **102**, 4431 (2002).
16. Kageyama, T.: *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 288 (2002).
17. Tang, J., Sepulveda, P., Marcinišzyn, J., Chen, K. C. S., Huang, W. Y., Tao, N., Liu, D., Lanier, J. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3437 (1973).
18. Chen, K. C., Tao, N., Tang, J.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5068 (1975).

19. Sepulveda, P., Marcinišzyn, J., Liu, D., Tang, J.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5082 (1975).
20. Richter, C., Tanaka, T., Yada, R. Y.: *Biochem. J.* **335**, 481 (1998).
21. Kreuning, J., Samloff, I. M., Rotter, J. I., Eriksson, A. W.: *Pepsinogens in Man: Clinical and Genetic Advances*. New York, Alan R. Liss, Inc. 1985
22. Tang, J.: *Acid Proteases, Structure, Function and Biology*. New York, Plenum Press 1977.
23. Tang, J., v knize: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. (Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., eds.), kap. 272. San Diego, Academic Press 1998.
24. Dunn, B., M., Hung, S.-H.: *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 231 (2000).
25. Yoshida, T., Kato, J., Inoue, I., Yoshimura, N., Deguchi, H., Mukoubayashi, C., Oka, M., Watanabe, M., Enomoto, S., Niwa, T., Maekita, T., Iguchi, M., Tamai, H., Utsunomiya, H., Yamamichi, N., Fujishiro, M., Iwane, M., Takeshita, T., Ushijima, T., Ichinose, M.: *Int. J. Cancer* **134**, 1445 (2014).
26. Samloff, I. M.: *Gastroenterol.* **96**, 586 (1989).
27. Lindgren, A., Lindstedt, G., Kilander, A. F.: *J. Internal Med.* **244**, 341 (1998).
28. Cao, Q., Ran, Z. H., Xiao, S. D.: *J. Dig. Dis.* **8**, 15 (2007).
29. Haneda, M., Kato, M., Ishigaki, S., Suzuki, M., Takahashi, M.: *J. Gastroenterol. Hepatol* **28**, 78 (2013).
30. Shafaghi, A., Mansour-Ghanaei, F., Joukar, F., Sharafkhah, M., Mesbah, A., Askari, K., Geranmayeh, S., Mehrvarz, A., Souti, F., Sokhanvar, H., Fakhrieh, S., Aminian, K., Yousefi-Mashhour, M., Khosh-Sorur, M., Rasoulilian, J.: *Asian Pac. J. Cancer P.* **14**, 3931 (2013).
31. Chae, H.-D., Kim, I.-H., Lee, G. H., Shin, I.- H., Suh, H.-S., Jeon, C.-H.: *Am. J. Clin. Pathol.* **140**, 209 (2013).
32. Miki, K., Morita, M., Sasajima, M., Hoshina, R., Kanda, E., Urita, Y.: *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 735 (2003).
33. Miki, K.: *Gastric Cancer* **9**, 245 (2006).
34. Foltmann, B., Jensen, A. L.: *Eur. J. Biochem.* **128**, 63 (1982).
35. Vaňková, H., Kučerová, Z., Turková, J.: *J. Chromatogr., A* **753**, 37 (2001).

36. Arnoštová, H., Kučerová, Z., Tišlerová, I., Trnka, T., Tichá, M.: *J. Chromatogr., A* **911**, 211 (2001).
37. Kučerová, Z., Tichá, M.: *J. Chromatogr., B* **770**, 121 (2002).
38. Samloff, I. M.: *Gastroenterol.* **57**, 659 (1969).
39. Novotná, L., Hrubý, M., Beneš, M. J., Kučerová, Z.: *J. Chromatogr., A* **1084**, 108 (2005).
40. Zatloukalová, E., Kučerová, Z.: *J. Chromatogr., B* **808**, 99 (2004).
41. Zatloukalová, E., Kučerová, Z.: *J. Sep. Sci.* **29**, 1082 (2006).
42. Kučerová, Z., Majerčáková, P.: *J. Biochem. Biophys. Methods* **49**, 523 (2001).
43. Vařilová, T., Vránková, A., Pacáková, V., Tichá, M., Štulík, K.: *J. Chromatogr., A* **1084**, 207 (2005).
44. Anson, M. L., Mirsky, A. E.: *J. Gen. Physiol.* **16**, 59 (1932).
45. US Pat 4,839,295. Smith, P. K.: *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* 13. 6. 1989.
46. Scopes, R. K.: *Protein purification: Principles and practice.* 3. vyd. Berlín, Springer-Verlag 1994.
47. Turková, J.: *Bioaffinity chromatography.* 2. přeprac. vyd. Amsterdam, Elsevier 1993.
48. Vařilová, T.: *Chem. Listy* **99**, 570 (2005).
49. Lowe C. R., Dean P. D.: *Afininí chromatografie.* Praha, SNTL 1979.
50. Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Hobley, T. J., Thomas O.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 505 (2006).
51. Dunnill, P., Lilly, M. D.: *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 987 (1974).
52. Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M. J.: *J. Sep. Sci.* **30**, 1751 (2007).
53. Bruce I. J., Taylor J., Todd M., Davies M. J., Borioni E., Sangregorio C., Sen T.: *J. Magn. Magn. Mater.* **284**, 145 (2004).
54. Roca A. G., Costo R., Rebolledo A. F., Veitemillas-Verdaguer S., Tartaj P., González-Carreno T., Morales M. P., Serna C. J.: *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42**, 224002 (2009).

55. Nováková T., Šváb M., Švábová M.: *Chem. Listy* **103**, 524 (2009).
56. Gupta A. K., Gupta M.: *Biomaterials* **26**, 3995 (2005).
57. Corot C., Robert P., Idée J.-M., Port M.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **58**, 1471 (2006).
58. Berry C. C., Curtis A. S.: *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R198 (2003).
59. Gijs M. A.: *Microfluid. Nanofluid.* **1**, 22 (2004).
60. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. V., Muller, R. N.: *Chem. Rev.* **108**, 2064 (2008).
61. Yavuz, H., Odabasi, M., Akgol, S., Denizli, A.: *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **16**, 673 (2005).
62. Bílková, Z., Slovákova, M., Lyčka, A., Horák, D., Lenfeld, J., Turková, J., Churáček, J.: *J. Chromatogr. B* **770**, 25 (2002).
63. Sustrova, B., Novotna, L., Kucerova, Z., Ticha, M.: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **60**, 22 (2009).
64. Kluchova, K., Zboril, R., Tucek, J., Pecova, M., Zajoncova, L., Safarik, I., Mashlan, M., Markova, I., Jancik, D., Sebel, M., Bartonkova, H., Bellesi, V., Novak, P., Petridis, D.: *Biomaterials* **30**, 2855 (2009).
65. Slovákova, M., Peyrin, J.-M., Bílková, Z., Jukličková, M., Hernychová, L., Viovy, J.-L.: *Bioconjugate Chem.* **19**, 966 (2008).
66. Šafaříková, M., Roy, I., Gupta, M. N., Šafařík I.: *Journal of biotechnology* **105**, 255 (2003).
67. Tokoro, H., Nakabayashi, T., Fujii, S., Hafeli, U. O.: *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 1676 (2009).
68. Portet, D., Denizot, B., Rump, E., Lejeune, J.-J., Jallet, P.: *J. Colloid Interface Sci.* **238**, 37 (2001).
69. Šafařík, I., Šafaříková, M.: *BioMagn. Res. Technol.* **2**, 7 (2004).
70. Šafařík, I., Šafaříková, M.: *J. Chromatogr., B* **722**, 33 (1999).
71. US Pat 4,275,196. Shainoff, J. R.: *Glyoxal agarose*. 23.6.1981.
72. Bioscience Bead Division of CSS Inc.: Magnetic agarose beads. Dostupné z URL: <http://www.bioscience-beads.com/magnetic.htm> [cit. 23. 5. 2014]

73. Fields, G. B., Noble, R. L.: *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**, 161 (1990).
74. Northrop, J. H.: *J. Gen. Physiol.* **16**, 41 (1932).
75. Filuszová, M., Kučerová, Z., Tichá, M.: *J. Sep. Sci.* **32**, 2017 (2009).
76. Rajčanová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: *J. Sep. Sci.* **35**, 1899 (2012).
77. Lin, T.-Y., Williams, H., R.: *J. Biol. Chem.* **254**, 11875 (1979).
78. Pohl, J., Zaoral, M., Jindra, A. J., Kostka, V.: *Anal. Biochem.* **139**, 265 (1984).
79. Kučerová, Z., Pohl, J., Korbová, L.: *J. Chromatogr.* **376**, 409 (1986).
80. Kučerová, Z., Turková, J.: *Int. J. Bio-Chromatogr.* **2**, 145 (1997).
81. Simon, L. M., Kotormán, M., Szabó, A., Nemcsók, J., Laczkó, I.: *Process Biochem.* **42**, 909 (2007).
82. Hynek, R., Kašička, V., Kučerová, Z., Káš, J.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **681**, 37 (1996).