

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



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

Mgr. Michaela Rajčanová

2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK v Praze

Školitel: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

Obsah	3
Abstrakt v češtině	4
Abstract in english	5
Seznam zkratk	6
1 Úvod.....	7
2 Hypotézy a cíle práce	9
3 Materiál a metodika	10
4 Výsledky	12
4.1 Charakterizace heptapeptidů	12
4.2 Vliv rozpouštědel na aktivitu pepsinů	12
4.3 Kinetické a inhibiční studium pepsinů a heptapeptidů (inhibitorů)	14
4.4 Interakce prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích.....	14
4.5 Interakce prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharose	16
4.6 Interakce lidských pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích a Sepharose.....	16
5 Diskuse.....	21
6 Závěr	24
7 Použitá literatura	27
Seznam publikací	29

ABSTRAKT V ČEŠTINĚ

Lidská žaludeční šťáva obsahuje zejména aspartátové proteiny: 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 disertační práce je součástí projektu zabývajícího se především vypracováním metody pro separaci žaludečních aspartátových proteinů, která by byla vhodná pro diagnostické účely.

Konkrétním předmětem předkládané práce byla příprava nových typů ligandů, která by umožňovala po imobilizaci separaci lidských pepsinů. Pro studium vazebných vlastností aspartátových proteinů 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 interakce 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 nedsorboval. Obdobné výsledky byly získány i při afinitní chromatografii na heptapeptidech imobilizovaných na Sepharose. Situace byla složitější v případě separace lidských pepsinů 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. V případě imobilizovaných peptidů na Sepharose dochází k separaci obou lidských pepsinů pouze s peptidy -Tyr-Phe- nebo -Phe-Tyr-.

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 pepsins. 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 -Tyr-Phe- a -Tyr-Tyr- heptapeptides were more effective; the first elution peak contained a mixture of pepsin A and C, while the second one only pepsin A. Both human pepsins were separated using the immobilized peptides -Tyr-Phe or -Phe-Tyr- on Sepharose.

SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
DEAE	diethylaminoethyl
Fmoc	fluorenylmethyloxykarbonyl
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K_i	inhibiční konstanta, μM
K_m	Michaelisova konstanta, μM
PGA	pepsinogen A
PGC	pepsinogen C (progastrin)
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
RP HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SDS	dodecylsulfát sodný

1 ÚVOD

Proteasy (peptidové hydrolasy; EC 3.4) jsou enzymy štěpící bílkoviny.¹ Dělí se na exopeptidasy (katalyzují hydrolytické odštěpení aminokyseliny na koncích polypeptidového řetězce) a endopeptidasy (katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb uvnitř řetězce).^{2, 3}

Aspartátové proteinasy (EC 3.4.22), patří mezi endopeptidasy, byly původně označovány jako kyselé proteasy, protože optimální pH štěpení je v kyselé oblasti.⁴ Hlavní tři specifické inhibitory jsou pepstatin A, methylester diazoacetylnorleucinu a 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxy) propan.

Jsou známy 4 lidské žaludeční aspartátové proteinasy: pepsin A, pepsin B (kathepsin E), pepsin C (gastriksin) a chymosin. V této práci se budeme podrobně věnovat studiu pepsinu A a pepsinu C.

Pepsinogeny jsou syntetizovány hlavními buňkami v žaludku a jsou skladovány v sekrečních granulích, ze kterých jsou vlivem stimulujících faktorů vylučovány do žaludku. V kyselém prostředí žaludku jsou aktivovány na pepsiny.⁴

Lidský pepsin A a pepsin C mají velmi podobnou substrátovou specifitu. Liší se pouze tím, že lidský pepsin A preferuje aromatické aminokyseliny v pozici P_1 a P_1' aktivního místa; pepsin C preferuje tyrozinový zbytek v pozici P_1 a v pozici P_1' může být jakýkoliv aminokyselinový zbytek.

Hladina pepsinogenu A (PGA) a pepsinogenu C (PGC) v krevním séru a jejich poměr PGA/PGC přímo souvisí s morfologií a funkcí žaludeční sliznice. U zdravých jedinců je koncentrace PGA vždy vyšší než koncentrace PGC; poměr PGA/PGC je 3:1.(cit. ⁴) Vztah mezi patologickými změnami žaludku a koncentrací pepsinogenů je častým zájmem studia. U peptického vředu jsou zvýšené koncentrace PGA i PGC. Rakovina žaludku je spojena s velmi nízkou hladinou PGA ⁵⁻⁷, což se jeví jako dobrý subklinický

marker tohoto onemocnění. Poměr PGA/PGC je menší než 1.(cit. ⁸⁻¹⁰⁾)

K obohacení nebo čištění proteinů ze směsi jiných proteinů nebo z biologických vzorků je používáno mnoho metod. K neúčinnějším metodám patří metody využívající afinitního principu separace. Ligand je imobilizován na vhodném nosiči, který může být umístěn do kolony nebo může být použita vsádková metoda.

V poslední době je věnována zvýšená pozornost vývoji a aplikaci magnetických separačních technik, které používají malé magnetické částice. Magnetické separační techniky mají řadu výhod ve srovnání s jinými separačními metodami, jako jsou rychlost, jednoduchost a nízká cena.

Magnetické částice se skládají z jádra (je tvořeno z magnetických anorganických materiálů, díky kterým je umožněna snadná manipulace s magnetickými částicemi pomocí magnetického pole) a obalu (inertní vrstva z materiálu, který zajišťuje stabilitu jádra, chrání jádro vůči nesespecifickým interakcím a umožňuje připojení příslušných funkčních skupin vhodných k vazbě s ligandem).¹¹

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Téma disertační práce je součástí dlouhodobého výzkumu na Ústavu patologické fyziologie 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, který studuje vztah mezi aspartátovými proteinasami v lidské žaludeční šťávě nebo žaludeční sliznici a žaludečních onemocnění. Určení vzájemného poměru PGA a PGC je důležitým parametrem pro diagnostiku gastritidy, peptického vředu či počátečního stádia rakoviny žaludku.

Cílem předkládané disertační práce bylo vyvinout metodu, kterou by bylo možné rychle a jednoduše separovat pepsin A a pepsin C z žaludeční šťávy nebo z krevního séra (po aktivaci pepsinogenů) a přispět tak k včasné diagnóze rakoviny žaludku.

Separaci pepsinů 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 (Michaelisova konstanta K_m a inhibiční konstanta K_i). Heptapeptidy imobilizovat na magnetické nosiče nebo na Sepharosu. Tyto nosiče porovnat pomocí více parametrů (např. čas analýzy, finanční hledisko, nesespecifické sorpce, kapacita nosičů apod). Optimalizovat podmínky separace pepsinů a zjistit nejlepší adsorpční a eluční podmínky. Studovat vazebné vlastnosti syntetizovaných heptapeptidů 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.

3 MATERIÁL A METODIKA

Materiál

- Extrakt žaludeční sliznice potkana, extrakt žaludeční sliznice prasete, lidská lyofilizovaná žaludeční šťáva, extrakt lidské žaludeční sliznice, prasečí pepsin A
- magnetické glyoxalové 4% agarosové částice, Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4 Fast Flow

Syntéza peptidů a imobilizace 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, ČR).

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 připraveny ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie Akademie věd ČR manuálně syntézou na pevné fázi dle N^α-Fmoc chemického protokolu.¹²

Peptidy byly imobilizovány jako ligandy přes-NH₂ skupinu na CNBr-Sepharosu a na magnetické agarosové částice aktivované glyoxalem.

Interakce pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických částicích

Bylo smícháno 50 μl magnetických částic a 500 μl roztoku vzorku pepsinu; 5 min třepat; promytí 3 krát 500 μl 0,1 M acetátovým pufrům pH 3,5; eluce 3 krát 500 μl 20% v/v propan-2-olu v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; 3 krát 500 μl 20% v/v propan-2-olu v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirskeho¹³.

Interakce pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharose

Rozměry naplněných kolon byly 1,0×1,3 cm; aplikováno 1 ml roztoku vzorku a kolona byla promyta adsorpční mobilní fází do vymytí všech neadsorbovaných látek (5 ml), eluce (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 1 ml/min, frakce sbírány po 1 ml, UV detekce při 280 nm; stanovení proteolytické aktivity modif. metodou podle Ansona a Mirskeho¹³.

Imunodetekce

Polyakrylamidová SDS elektroforéza a Western blot z frakcí elučních píků ze separací pepsinů lidské lyofilizované žaludeční šťávy afinitní technikou na peptidech imobilizovaných na magnetických agarosových částicích a Sepharose.

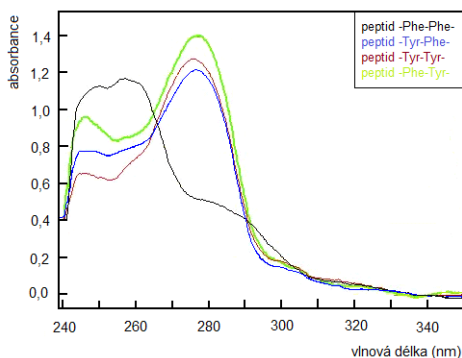
4 VÝSLEDKY

4.1 Charakterizace heptapeptidů

Čistota vyrobených peptidů byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP HPLC) na koloně Vydac C-18 při gradientu acetonitrilu: 96,8 % (peptid -Phe-Phe-); 98,4 % (peptid -Tyr-Phe-); 96,2 % (peptid -Tyr-Tyr-) a 95,5 % (peptid -Phe-Tyr-).

Analýzou hmotnostní spektrometrie byly potvrzeny teoreticky vypočtené molekulové hmotnosti: 833,4 (peptid -Phe-Phe-); 849,4 (peptid -Tyr-Phe-); 864,5 (peptid -Tyr-Tyr-) a 848,5 (peptid -Phe-Tyr-).

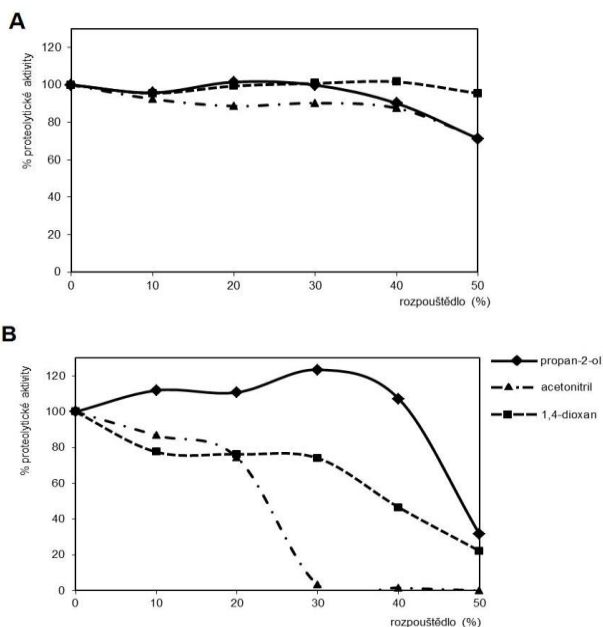
Byla změřena absorpční spektra peptidů v rozsahu 240–350 nm (Obr.1).



Obr. 1. Absorpční spektra peptidu -Phe-Phe- (černá), peptidu -Tyr-Phe- (modrá), peptidu -Tyr-Tyr- (červená) a peptidu -Phe-Tyr (zelená)

4.2 Vliv rozpouštědel na aktivitu pepsinů

Byl zkoumán vliv různých koncentrací (0–50% v/v) rozpouštědel (propan-2-ol, acetonitril=ACN a 1, 4-dioxan) na aktivitu prasečího pepsinu A (Obr. 2. A) a potkaního pepsinu C (Obr. 2. B). Proteolytická aktivita (PU) potkaního pepsinu C je více ovlivňována koncentrovanějšími roztoky rozpouštědel než aktivita prasečího pepsinu A. Nejvhodnější eluční roztok je 20% v/v propan-2-ol.



Obr. 2. Vliv rozpouštědel na proteolytickou aktivitu prasečího pepsinu A (A) a potkaního pepsinu C (B)

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 Mirskeho¹³

4.3 Kinetické a inhibiční studium pepsinů a heptapeptidů (inhibitorů)

Stanovená hodnota K_m prasečího pepsinu A pro substrát hemoglobin je 33,3 μM a K_m potkaního pepsinu C pro substrát hemoglobin je 6,3 μM . 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 $\Delta\text{A}/\text{min}$.

Byly vypočteny K_i pro heptapeptidy -Phe-Phe- a -Tyr-Phe- pro prasečí pepsin A a pro potkaní pepsin C (Tab. 1.). Na rozdíl od těchto peptidů bylo však zjištěno, že peptid -Tyr-Tyr- a peptid -Phe-Tyr- neinhibují ani prasečí pepsin A a ani potkaní pepsin C.

Tab. 1. Vypočtené inhibiční konstanty a typ inhibice

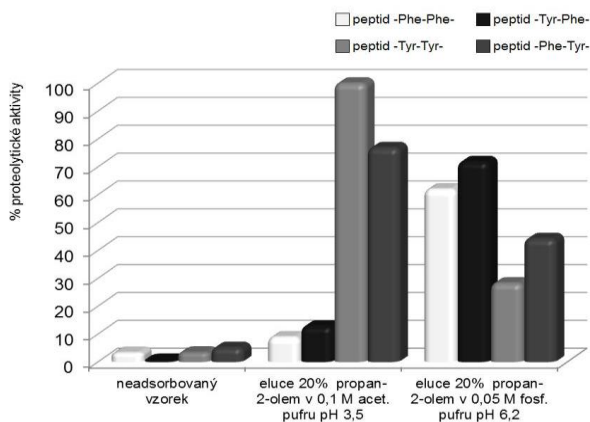
Enzym	Inhibitor	K_i , μM	Typ inhibice
prasečí pepsin A	peptid -Phe-Phe-	18,1	nekompetitivní
prasečí pepsin A	peptid -Tyr-Phe-	14,0	nekompetitivní
potkaní pepsin C	peptid -Tyr-Tyr-	6,4	nekompetitivní
potkaní pepsin C	peptid -Tyr-Phe-	4,2	nekompetitivní

4.4 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. Prasečí pepsin A byl adsorbován na všechny heptapeptidy imobilizované na magnetické částice (Obr. 3.)^{14, 15}. Podmínky nutné pro eluci tohoto enzymu se lišily. Pro uvolnění adsorbovaného prasečího pepsinu A z imobilizovaných peptidů -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 adsorpčním pufr (0,1 M acetátový pufr pH 3,5) s 20% v/v 2-propanolem.

Na rozdíl od prasečího pepsinu A se potkaní pepsin C na heptapeptidy imobilizované na magnetické částice neadsorboval; 89–95 % proteolytické aktivity bylo odtraheno adsorpčním pufr (0,1 M acetátový pufr pH 3,5) s 20% v/v 2-propanolem při promytí.^{14, 15}



Obr. 3. 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

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 Mirského¹³

4.5 Interakce prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharose

Prasečí pepsin A byl adsorbován na všechny heptapeptidy imobilizované na Sepharose a podmínky pro jeho eluci se nelišily na rozdíl od magnetického nosiče.

Velká část potkaního pepsinu C se na heptapeptidy imobilizované na Sepharose neadsorbovala a za použitých podmínek proteolytická aktivita byla vymyta startovním pufrům; pouze v případech -Tyr-Phe- a -Phe-Phe- heptapeptidů malá část potkaního pepsinu C byla adsorbována. Výsledky studia interakce potkaního pepsinu C s heptapeptidy imobilizovanými na Sepharose souhlasily s výsledky získanými s heptapeptidy imobilizovanými na magnetické částice: z testovaných heptapeptidů potkaní pepsin C jen částečně interagoval s -Phe-Phe- a -Tyr-Phe- peptidy (nezobrazeno).

4.6 Interakce lidských pepsinů s heptapeptidy imobilizovanými na magnetických agarosových částicích a Sepharose

Při použití adsorpčního pufru (0,1 M acetátový pufr pH 3,5), byly lidské pepsiny kompletně adsorbovány na oba typy nosičů.

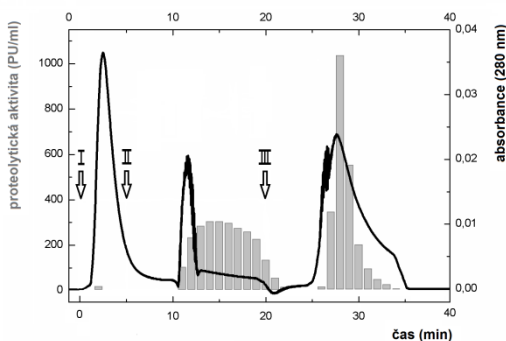
Jednotlivé frakce elučních píků ze separací lidské lyofilizované žaludeční šťávy afinitní separací na peptidech imobilizovaných na obou nosičích byly zahuštěny a použity k identifikaci jednotlivých lidských pepsinů pomocí imunodetekce metodou western blot (Obr. 8. a 9.).

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

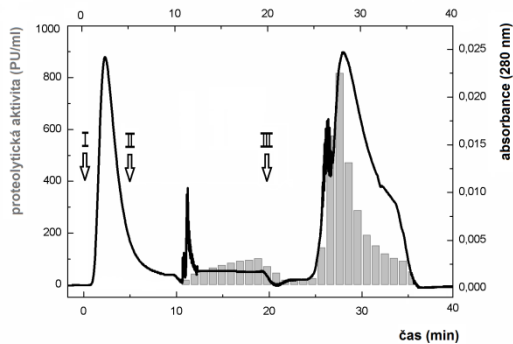
acetátovém pufru pH 3,5), zatímco při eluci 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2 bylo získáno méně než 10 %.

Ani jeden z typů magnetického nosiče neseperuje 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 (Obr. 4.-7.), 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 nevhodnější 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.

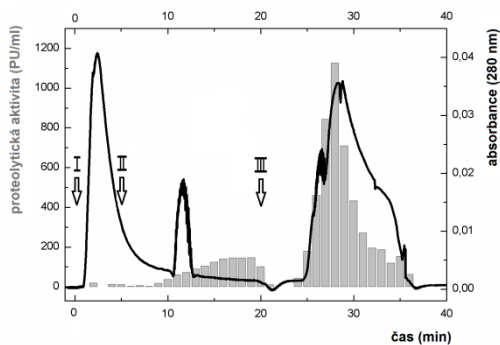


Obr. 4. Interakce lidských pepsinů s peptidem -Phe-Phe imobilizovaným na Sepharose
Šedé sloupce: proteolytická aktivita; černá křivka: absorbance při 280 nm; I – 0,1 M acetátový pufr pH 3,5; II – eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,1 M acetátovém pufru pH 3,5; III – eluce 20% v/v propan-2-olem v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,2; stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského¹³



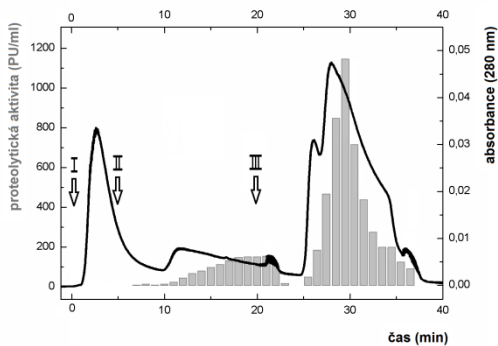
Obr. 5. Interakce lidských pepsinů s peptidem -Tyr-Phe- immobilizovaným na Sepharose

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 Mirského¹³



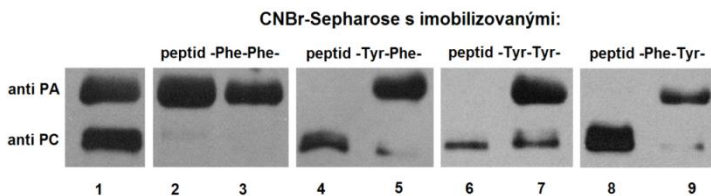
Obr. 6. Interakce lidských pepsinů s peptidem -Tyr-Tyr- immobilizovaným na Sepharose

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 Mirského¹³



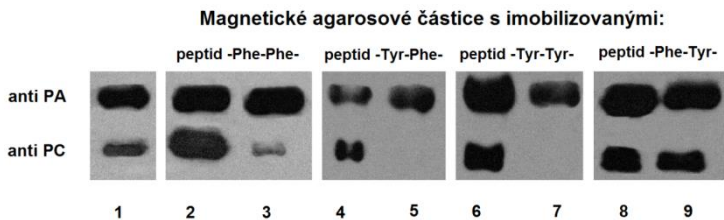
Obr. 7. Interakce lidských pepsinů s peptidem -Phe-Tyr- imobilizovaným na Sepharose

Šedá 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 Mirského¹³



Obr. 8. 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.



Obr. 9. 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

5 DISKUSE

Úkolem předkládané práce bylo vypracování jednoduché, rychlé a specifické metody, která by umožňovala rozlišit jednotlivé typy pepsinů a stanovit jejich změny. 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^{11, 16}, existuje velmi omezený počet aplikací imobilizovaných peptidů specifických pro jeden protein. Takový ligand 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 tento inhibitor byl popsán jako inhibitor kathepsinu C¹⁷, později pak jako kompetitivní inhibitor lidského pepsinu A a lidského pepsinu C v roztoku¹⁸. Tento inhibitor byl imobilizován na Sepharosu a použit pro purifikaci lidského, prasečího a kuřecího pepsinu A^{18, 19} nebo byl navázán na membránu pro adsorpci prasečího pepsinu A²⁰.

V naší práci¹⁴ byl imobilizován tento syntetický heptapeptid (Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu) na magnetické agarosové gely aktivované glyoxalem. V souladu s popsánými výsledky získanými na Sepharose obsahující imobilizovaný inhibitor^{18, 19} modifikované magnetické částice interagovaly s prasečím pepsinem A a lidským pepsinem A, zatímco žádná interakce nebyla pozorována v případě potkaního pepsinu C a lidského pepsinu C.

Ačkoliv aspartátové proteinasy jsou si ve svých trojrozměrných 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. Byly připraveny následující 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. Byly určeny jejich inhibiční konstanty K_i v roztoku pro peptidy -Phe-Phe- a -Tyr-Phe-, které inhibovaly prasečí pepsin A i potkaní pepsin C. Zajímavé však bylo, že peptidy -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- neinhibují ani prasečí pepsin A a ani potkaní pepsin C.

Po immobilizaci 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 Sepharosu. Výsledky studia interakce potkaního pepsinu C s peptidy immobilizovanými na Sepharose a na magnetických částicích byly stejné: z testovaných heptapeptidů potkaní 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 literatuře¹⁹; 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 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 Sepharose tak na magnetické agarosové částice s immobilizovanými heptapeptidy. Dále bylo zkoumáno složení vhodného elučního roztoku potřebného k nejvyšší eluci prasečího a potkaního pepsinu.

Pro eluci adsorbovaných proteas byl zvolen pokles polarity elučního pufru přidáním ACN či 1,4-dioxanu, jak bylo popsáno v předcházejících studiích^{18, 19} 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 vyššími koncentracemi rozpouštědel než aktivita prasečího pepsinu 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. V případě prasečího pepsinu A bylo popsáno, že enzym si uchovává svou aktivitu až do 50% v/v vodného roztoku 1,4-dioxanu nebo 30% v/v ACN či 1, 4-dioxanu. Při dalším růstu podílu organického rozpouštědla byl pozorován značný pokles aktivity prasečího pepsinu A.²¹

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^{17, 22}. Naše výsledky ukázaly, že v přítomnosti pepstatinu se prasečí pepsin A na magnetické nosiče s imobilizovanými peptidy neváže, což dokazuje, že studované heptapeptidy se váží na molekuly pepsinu A do vazebného místa enzymu nebo alespoň v blízkém sousedství 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 v lidské i 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-celulóze²³ nebo pomocí HPLC²⁴, ale tyto metody je složité si představit pro diagnostické účely. V současné době existují pro analytické potřeby pouze metody využívající protilátky. Námi vypracovaná metoda představuje alternativní možnost pro určení úrovně pepsin-pepsinogen v tělních tekutinách a tkáních založená na jiném principu.

6 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-konfiguraci):

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 peptid -Tyr-Phe- pro prasečí pepsin A a potkaní pepsin C. Peptidy -Tyr-Tyr- a -Phe-Tyr- neinhibují ani prasečí pepsin A a ani potkaní pepsin C.

Připravené heptapeptidy byly imobilizovány přes volnou amino skupinu buď 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.

Podmínky pro adsorpci proteas byly optimalizovány. Prasečí pepsin A byl adsorbován na všechny heptapeptidy imobilizované na magnetické částice i na Sepharose, potkaní pepsin C se na heptapeptidy imobilizované na magnetické částice a Sepharose neadsorboval; 89–95 % proteolytické aktivity bylo vymyto startovním pufrem. V přítomnosti pepstatinu se prasečí pepsin A na heptapeptidy imobilizované na magnetické částice neadsorboval.

Při použití adsorpčního pufru byly lidské pepsiny kompletně adsorbovány na oba typy nosičů.

Ani jeden z typů magnetického nosiče neseperuje kompletně lidské pepsiny A a C. Účinnější separační vlastnosti vykazují magnetické agarosové částice s imobilizovavými 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.

7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Ghosh, A. K., Mannhold, R., Kubinyi, R., Folkers, G.: *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Target*. Germany, Wiley-VCH 2010.
2. Štosová, T., Havliš, J., Lenobel, R., Šebela, M.: *Chem. Listy* **99**, 896 (2005).
3. Fusek, M., Větvička, V.: *Aspartic proteinases: physiology and pathology*. Houston, CRP Press 1995.
4. Gritti, I., Banfi, G., Roi, G. S.: *Pharm. Res.* **41**, 265 (2000).
5. Haneda, M., Kato, M., Ishigaki, S., Suzuki, M., Takahashi, M.: *J. Gastroenterol. Hepatol* **28**, 78 (2013).
6. Shafaghi, A., Mansour-Ghanaei, F., Joukar, F., Sharafkhan, 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).
7. 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).
8. Mukoubayashi, C., Yanaoka, K., Ohata, H., Arii, K., Tamai, H., Oka, M., Ichinose, M.: *Int. Med.* **46**, 261 (2007).
9. Miki, K., Morita, M., Sasajima, M., Hoshina, R., Kanda, E., Urita, Y.: *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 735 (2003).
10. Miki, K.: *Gastric Cancer* **9**, 245 (2006).
11. Šafařík, I., Šafaříková, M.: *BioMagn. Res. Technol.* **2**, 7 (2004).
12. Fields, G. B., Noble, R. L.: *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**, 161 (1990).
13. Anson, M. L., Mirsky, A. E.: *J. Gen. Physiol.* **16**, 59 (1932).
14. Filuszová, M., Kučerová, Z., Tichá, M.: *J. Sep. Sci.* **32**, 2017 (2009).
15. Rajčanová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: *J. Sep. Sci.* **35**, 1899 (2012).

16. Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Hobley, T. J., Thomas O.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 505 (2006).
17. Lin, T.-Y., Williams, H., R.: *J. Biol. Chem.* **254**, 11875 (1979).
18. Pohl, J., Zaoral, M., Jindra, A. J., Kostka, V.: *Anal. Biochem.* **139**, 265 (1984).
19. Kučerová, Z., Pohl, J., Korbová, L.: *J. Chromatogr.* **376**, 409 (1986).
20. Kučerová, Z., Turková, J.: *Int. J. Bio-Chromatogr.* **2**, 145 (1997).
21. Simon, L. M., Kotormán, M., Szabó, A., Nemcsók, J., Laczkó, I.: *Process Biochem.* **42**, 909 (2007).
22. Kageyama, T.: *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 288 (2002).
23. Foltmann, B., Jensen, A. L.: *Eur. J. Biochem.* **128**, 63 (1982).
24. Hynek, R., Kašička, V., Kučerová, Z., Káš, J.: *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **681**, 37 (1996).

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace s IF:

- Filuszová, M., Kučerová, Z., Tichá, M.: Peptide inhibitor modified magnetic particles for pepsin separation. *J. Sep. Sci.* **32**, 2017–2021 (2009). IF je 2,7
- Rajčanová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: Application of heptapeptides containing D-amino acid residues immobilized to magnetic particles and Sepharose for the study of binding properties of gastric aspartic proteases. *J. Sep. Sci.* **35**, 1899–1905 (2012). IF je 2,7

Publikace bez IF:

- Kučerová, Z., Filuszová, M., Příkryl, P., Tichá, M.: Pepsin separation using magnetic affinity adsorbent. 13th International symposium on separation sciences, Štrbské Pleso, Slovak Republic, June 2007.
- Příkryl, P., Filuszová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: Measurement of Pepsin A and Pepsin C level: A sensitive test for gastric cancer. 1st central and eastern European proteomic conference and 3rd Czech proteomic conference, Prague, Czech republic, October 2007.
- Filuszová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: Detekce pepsinů–markerů rakoviny žaludku afinitní chromatografií na magnetických nosičích. 7th International Conference Analytical Methods and Human Health, Nový Smokovec, Slovak Republic, October 2008.
- Filuszová, M., Příkryl, P., Tichá, M., Kučerová, Z.: Immobilization of heptapeptide inhibitors to magnetic particles and their use for the separation of different forms of aspartic proteinases. 34th FEBS Congress, Prague, Czech republic, July 2009.
- Filuszová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: Magnetic inhibitor reactor as a tool for separation of aspartic proteinases. Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2010, Olomouc, Czech republic, February 2010.
- Filuszová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: Biomarkers of gastric cancer – detection using magnetic sorbent with immobilized peptide inhibitors. 25th International Symposium on Microscale Bioseparations, Prague, Czech Republic, March 2010.
- Rajčanová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: Magnetic sorbent containing peptide inhibitors for the separation of biomarkers of gastric cancer. Neformální proteomické setkání, Liblice, Czech republic, October 2010.
- Rajčanová, M., Tichá, M., Kučerová, Z.: Identification of biomarkers of gastric cancer using immobilized heptapeptide inhibitors, 5th Central and Eastern European Proteomic Conference, Prague, Czech Republic, September 2011.