

Fosforylace je jednou z nejdůležitějších posttranslačních modifikací proteinů. Proces fosforylace/defosforylace umožňuje regulaci téměř všech procesů probíhajících v buňce a je klíčovým mechanismem pro udržování homeostasy buněk. Abnormální fosforylace souvisí s mnoha závažnými lidskými onemocněními jako je např. rakovina.

Fosforylace hlavních žaludečních aspartátových proteas pepsinů a jejich prekurzorů pepsinogenů se liší v závislosti na živočišném druhu. Pepsiny a pepsinogeny některých živočichů obsahují fosfátové skupiny, jiné však tyto skupiny nemají. Fosforylace lidských pepsinů a pepsinogenů pravděpodobně souvisí s různými žaludečními onemocněními. Pacienti s rakovinou žaludku vykazují vyšší stupeň fosforylace pepsinogenů než zdraví lidé. Aby bylo možné využít tento poznatek pro diagnostické účely, je nejprve nezbytné vypracovat jednoduché a spolehlivé metody pro studium fosforylace pepsinů a pepsinogenů, které by byly použitelné i pro malá množství vzorku.

Předkládaná dizertační práce se zabývá vypracováním vhodného metodického přístupu pro studium fosforylace proteinů se zaměřením na lidské žaludeční aspartátové proteasy – pepsiny, pro které je charakteristický velmi nízký obsah bazických aminokyselinových zbytků a vyšší obsah kyselých aminokyselinových zbytků. Pozornost jsme zaměřili zejména na vypracování chromatografických metod pro selektivní (afinitní) separaci fosforylovaných pepsinů a pro izolaci z nich odvozených fosfopeptidů. V první části předkládané práce jsme se zabývali výběrem sorbentů vhodných pro separaci fosfoproteinů vysokotlakou afinitní chromatografií na imobilizovaných iontech. V další části jsme na vybraných sorbentech vypracovali metody pro separaci fosforylovaných a nefosforylovaných forem pepsinů. Tyto metody jsme následně použili pro separaci lidských pepsinů izolovaných ze žaludeční šťávy zdravého člověka a ze žaludeční sliznice pacienta s karcinomem žaludku. V poslední části práce jsme se zabývali vypracováním postupu pro selektivní izolaci fosfopeptidů z proteolyticky rozštěpených pepsinů pomocí afinitní chromatografie a jejich následnou detekci, identifikaci a určení místa fosforylace pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Vypracovaný postup jsme použili k určení místa fosforylace lidského pepsinu A.