

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

# STUDIUM FOSFORYLACE LIDSKÝCH PEPSINŮ

Dizertační práce

Mgr. Lenka Novotná



318010 3993

Školitel: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

Praha 2009

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem použila pouze pramenů, které uvádím v seznamu literatury.

V Praze, dne 18. 6. 2009



Lenka Novotná

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Zdence Kučerové, CSc. za odborné vedení a cenné rady, které mi v průběhu celé práce poskytovala.

Dále bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy za trvalý zájem o tuto práci, za podnětné diskuze a za čas, který mi věnovala.

Děkuji také všem pracovníkům Ústavu patologické fyziologie a CEH 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy zejména pak Mgr. Petru Přikrylovi, Ph.D. za konzultace a cenné rady týkající se práce s MALDI-TOF/TOF hmotnostním spektrometrem a Mgr. Janě Frýdlové za podnětné diskuze a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Ráda bych také poděkovala svému příteli Mgr. Martinu Kukačkovi, Ph.D. za psychickou podporu a projevení velké tolerance.

Na závěr bych chtěla poděkovat Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční prostředky poskytnuté pro vypracování této práce (granty MSM 111100003, MSM 0021620806 a LC 06044).

# Obsah

Seznam zkratk	1
Úvod	2
<b>1 Teoretická část</b>	<b>3</b>
1.1 Fosforylace proteinů . . . . .	3
1.1.1 Výskyt fosforylovaných aminokyselin v proteinech . . . . .	3
1.1.2 Způsob fosforylace proteinů . . . . .	5
1.1.3 Souvislost mezi fosforylací proteinů a lidskými onemocněními . .	6
1.2 Pepsiny a pepsinogeny a jejich fosforylace . . . . .	7
1.2.1 Pepsiny a pepsinogeny . . . . .	7
1.2.1.1 Lidské pepsiny a pepsinogeny . . . . .	7
1.2.1.2 Struktura pepsinů a pepsinogenů . . . . .	8
1.2.1.3 Vlastnosti pepsinů a pepsinogenů . . . . .	10
1.2.2 Fosforylace pepsinů a pepsinogenů . . . . .	11
1.3 Metody pro separaci, izolaci a analýzu fosforylovaných proteinů a peptidů	12
1.3.1 Metody používané pro separaci a izolaci fosfoproteinů a fosfopeptidů	12
1.3.1.1 Iontově-výměnná chromatografie . . . . .	12
1.3.1.2 Chromatofokusace . . . . .	13
1.3.1.3 Imunoprecipitace . . . . .	13
1.3.1.4 Afinitní chromatografie na oxidech kovů . . . . .	14
1.3.1.5 Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech . . . . .	15
1.3.1.6 Metody založené na chemické derivatizaci fosfátové skupiny . . . . .	17
1.3.2 Detekce fosfopeptidů a fosfoproteinů po elektroforetické separaci	19
1.3.2.1 Radioaktivní značení . . . . .	19
1.3.2.2 Detekce pomocí fosfo-specifických protilátek . . . . .	19
1.3.2.3 Detekce fosfoproteinů a fosfopeptidů použitím fosfatas	20
1.3.3 Detekce a identifikace fosfopeptidů a fosfoproteinů pomocí hmotnostní spektrometrie . . . . .	20
<b>2 Cíl práce</b>	<b>23</b>

<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>24</b>
3.1	Chemikálie . . . . .	24
3.2	Přístroje . . . . .	24
3.3	Metody použité ke studiu proteinů . . . . .	25
3.3.1	Vzorky . . . . .	25
3.3.2	IMAC . . . . .	26
3.3.2.1	Interakce prasečího pepsinu A s chelátovými ligandy kovalentně vázanými na polymerní matici . . . . .	26
3.3.2.2	Sycení kolon $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Ga}^{3+}$ a $\text{UO}_2^{2+}$ ionty . . . . .	26
3.3.2.3	Postup při IMAC . . . . .	26
3.3.2.4	Stanovení kapacity sorbentu pro prasečí pepsin A . . . . .	27
3.3.3	Iontově výměnná chromatografie na HEMA-BIO 1000 DEAE . . . . .	27
3.3.4	Modifikace karboxylových skupin prasečího pepsinu A . . . . .	28
3.3.4.1	Amidace pepsinu s dimethylaminem, ethylaminem a isopropylaminem . . . . .	28
3.3.4.2	Esterifikace pepsinu HCl v methanolu . . . . .	28
3.3.4.3	Esterifikace pepsinu diazomethanem . . . . .	28
3.3.5	Defosforylace prasečího pepsinu A . . . . .	28
3.3.6	Analytické metody . . . . .	28
3.3.6.1	Stanovení koncentrace proteinů . . . . .	28
3.3.6.2	Stanovení proteolytické aktivity pepsinu . . . . .	29
3.3.6.3	Stanovení obsahu fosforu . . . . .	30
3.4	Metody použité k analýze peptidů . . . . .	30
3.4.1	Štěpení pepsinu $\alpha$ -chymotrypsinem . . . . .	30
3.4.2	Přečištění a odsolení peptidů na špičkách s C18 fází . . . . .	31
3.4.3	Izolace fosfopeptidů na špičkách s $\text{TiO}_2$ . . . . .	31
3.4.4	Izolace fosfopeptidů na špičkách se sorbenty obsahujícími imobilizované $\text{Fe}^{3+}$ nebo $\text{Ga}^{3+}$ ionty . . . . .	32
3.4.5	Izolace fosfopeptidů na HPLC sorbentu obsahujícím imobilizované $\text{Fe}^{3+}$ ionty . . . . .	32
3.5	MALDI-TOF a MALDI-TOF/TOF MS . . . . .	33
3.5.1	Nanesení vzorků na MALDI terčíky . . . . .	33
3.5.1.1	Analýza fosfopeptidů . . . . .	33
3.5.1.2	Analýza peptidů . . . . .	33
3.5.1.3	Analýza proteinů a modifikovaných proteinů . . . . .	33
3.5.2	MS a MS/MS analýza peptidů a fosfopeptidů . . . . .	33
3.5.3	MS analýza proteinů . . . . .	34
3.5.4	Identifikace peptidů . . . . .	34

<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>35</b>
4.1	HP-IMAC fosfoproteinů . . . . .	35
4.1.1	Výběr sorbentů pro HP-IMAC fosfoproteinů . . . . .	36
4.1.1.1	Vliv matrice a chelátového ligandu na adsorpci prasečího pepsinu A . . . . .	36
4.1.1.2	HP-IMAC sorbenty . . . . .	38
4.1.2	IMAC modelových fosfoproteinů . . . . .	38
4.1.3	Shrnutí . . . . .	46
4.2	Separace fosforylované a nefosforylované formy pepsinu . . . . .	46
4.2.1	Separace fosforylované a nefosforylované formy prasečího pepsinu A	46
4.2.1.1	Defosforylace prasečího pepsinu A . . . . .	46
4.2.1.2	IMAC prasečího pepsinu A a jeho defosforylované formy	47
4.2.1.3	Modifikace karboxylových skupin prasečího pepsinu A	48
4.2.1.4	IMAC dvou forem prasečího pepsinu A lišících se stupněm fosforylace po modifikaci karboxylových skupin . .	49
4.2.2	Separace fosforylovaných a nefosforylovaných forem lidských pepsinů . . . . .	50
4.2.2.1	Izolace lidských pepsinů iontově-výměnnou chromatografií	51
4.2.2.2	IMAC lidských pepsinů a jejich esterifikovaných derivátů	52
4.2.3	Shrnutí . . . . .	55
4.3	Izolace fosfopeptidů a identifikace fosforylačních míst . . . . .	55
4.3.1	Izolace a identifikace fosfopeptidu prasečího pepsinu A . . . . .	56
4.3.1.1	Štěpení prasečího pepsinu A . . . . .	56
4.3.1.2	Izolace fosfopeptidu z prasečího pepsinu A rozštěpeného $\alpha$ -chymotrypsinem . . . . .	56
4.3.1.2.1	Výběr sorbentů pro izolaci fosfopeptidu . . .	56
4.3.1.2.2	Izolace fosfopeptidu prasečího pepsinu A na sorbentech s chelátovanými $\text{Fe}^{3+}$ a $\text{Ga}^{3+}$ ionty naplněných ve špičkách . . . . .	56
4.3.1.2.3	Izolace fosfopeptidu prasečího pepsinu A na HPLC sorbentu s imobilizovanými $\text{Fe}^{3+}$ ionty	57
4.3.1.2.4	Izolace fosfopeptidu prasečího pepsinu A na $\text{TiO}_2$ naplněném ve špičkách . . . . .	60
4.3.1.3	Identifikace peptidů prasečího pepsinu A desorbovaných ze sorbentů s imobilizovanými $\text{Fe}^{3+}$ a $\text{Ga}^{3+}$ ionty a z $\text{TiO}_2$	62
4.3.2	Izolace a analýza fosfopeptidů získaných z proteinů lidské žaludeční šťávy . . . . .	64
4.3.2.1	Štěpení proteinů lidské žaludeční šťávy $\alpha$ -chymotrypsinem	64

---

4.3.2.2	Izolace fosfopeptidů na sorbentech obsahujících $\text{Fe}^{3+}$ a $\text{Ga}^{3+}$ ionty a na $\text{TiO}_2$ . . . . .	64
4.3.2.3	Identifikace peptidů izolovaných na imobilizovaných kovových iontech a na $\text{TiO}_2$ z proteinů lidské žaludeční šťávy rozštěpených $\alpha$ -chymotrypsinem; určení fosforylačního místa lidského pepsinu A . . . . .	67
4.3.3	Shrnutí . . . . .	69
5	Závěr . . . . .	70
	Literatura . . . . .	71
	Publikace . . . . .	79

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
BCA	kyselina bichinoninová
BP	(6-amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl) bisfosfonová kyselina
EDTA-Na <sub>2</sub>	disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové
HEPES	kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová
HP-IMAC	vysokotlaká afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech
HQ	8-hydroxychinolin
IDA	iminodioctová kyselina
IMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech
MA-BP	sorbent na bázi poly(glycidyl methakrylát- <i>co</i> -ethylen dimethakrylátu) obsahující (6-amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl) bisfosfonovou kyselinu
MA-HQ	sorbent na bázi poly(glycidyl methakrylát- <i>co</i> -ethylen dimethakrylátu) obsahující 8-hydroxychinolin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry
MES	kyselina 2-(N-morfolin)ethansulfonová
MS	hmotnostní spektrometrie
POROS MC20	sorbent na bázi poly(styren- <i>co</i> -divinylbenzenu) obsahující iminodioctovou kyselinu
PTFE	polytetrafluorethylen
TFA	kyselina trifluoroctová



# Úvod

Fosforylace je jednou z nejdůležitějších posttranslační modifikací proteinů. Proces fosforylace/defosforylace umožňuje regulaci téměř všech aspektů buněčného života a je klíčovým mechanismem pro udržování homeostasy buněk. Abnormální fosforylace proto 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 pepsiny. Pozornost byla věnována zejména vypracování metod pro selektivní separaci fosforylovaných a nefosforylovaných forem pepsinů pomocí vysokotlaké afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech. Dále se tato práce věnuje vypracování metod pro selektivní izolaci fosfopeptidů z proteolyticky rozštěpených pepsinů, jejich následnou detekci, identifikaci a určení místa fosforylace pomocí afinitní chromatografie a MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrie.

# 1. Teoretická část

## 1.1 Fosforylace proteinů

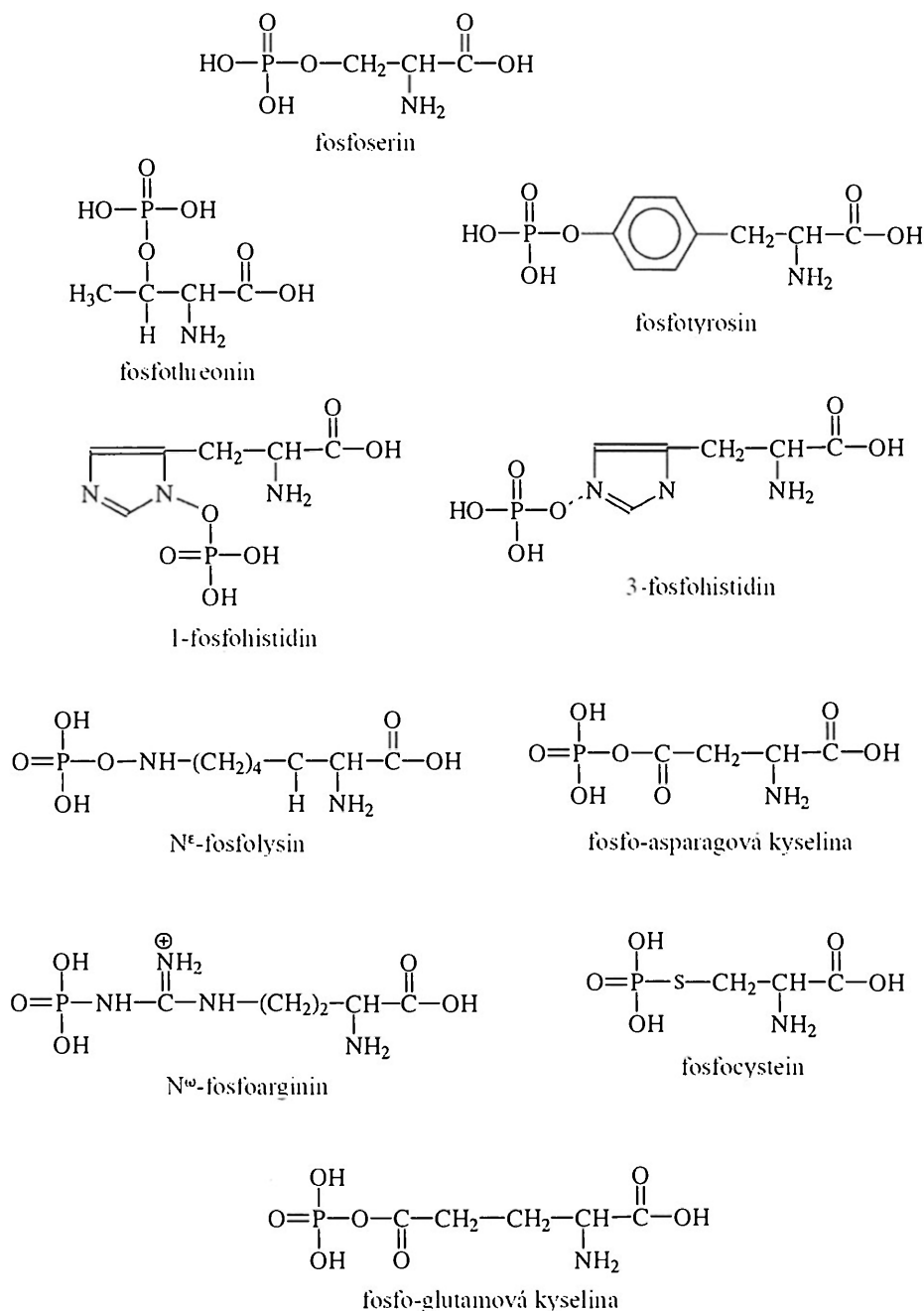
Fosforylace je jednou z nejdůležitějších a co do počtu nejčastější posttranslační modifikací proteinů. Jedná se o reverzibilní a velmi rychlý proces, který může modulovat funkční vlastnosti proteinů tím, že způsobuje změnu jejich konformace. Změna konformace vede ke zvýšení nebo snížení jejich aktivity a stability [1, 2], nebo umožní jejich interakci s dalšími proteiny vytvořením vhodného vazebného místa [3, 4]. Systém fosforylace/defosforylace proteinů umožňuje regulaci téměř všech aspektů buněčného života. Jako regulační mechanismus je nepostradatelný pro buněčné procesy jako jsou signální transdukce, genová exprese, proliferace a diferenciací buňky, kontrola buněčného cyklu, buněčná adheze a metabolismus [5–9]. O významu této modifikace svědčí i fakt, že přibližně 30% všech proteinů v eukaryontních organismech je v daném čase fosforylováno [10] a až 50% všech proteinů může být někdy během svého života fosforylováno [11, 12]. V eukaryontním proteomu je až několik set tisíc potencionálních fosforylačních míst [13].

### 1.1.1 Výskyt fosforylovaných aminokyselin v proteinech

Jsou známy čtyři různé typy vazeb fosfátů v peptidovém řetězci: *O*-fosfáty, *N*-fosfáty, acylfosfáty a *S*-fosfáty. *O*-fosfáty (*O*-fosfomonoestery) vznikají fosforylací hydroxylových skupin serinových (S), threoninových (T) a tyrosinových (Y) zbytků. *N*-fosfáty (fosfoamidy) jsou vytvářeny fosforylací volné aminoskupiny histidinových (H), argininových (R) a lysinových (K) zbytků. Acylfosfáty (fosfátové anhydridy) jsou produkovány při fosforylaci zbytků asparagových (D) a glutamových (E) kyselin [14]. *S*-fosfáty (*S*-fosfothioestery) jsou vytvářeny při fosforylaci cysteinu (C) a jsou obsaženy v reakčních meziproduktu několika enzymů [15]. Na obr. 1.1 jsou zobrazeny struktury fosfoaminokyselin nalezených v různých organismech.

Zastoupení jednotlivých typů fosforylovaných aminokyselin se u eukaryontních a prokaryontních organismů liší. V proteinech eukaryontních organismů se nejčastěji vyskytují *O*-fosfáty. Nejběžnější jsou fosforylace serinového a threoninového zbytku, méně už tyrosinového (poměrné zastoupení pS : pT : pY\* je 1800 : 200 : 1) [16–18]. Naproti tomu v prokaryontních organismech se často vyskytují *N*-fosfáty, především fosfohistidin, a také acylfosfáty [19]. Ostatní fosfoaminokyseliny se vyskytují v prokaryontních i

\*pS - fosfoserin, pT - fosfothreonin, pY - fosfotyrosin



Obr. 1.1: Chemické struktury fosforylovaných aminokyselin

eukaryontních organismech velmi zřídka.

Jednotlivé fosforylované aminokyseliny se liší svou chemickou stabilitou, což ovlivňuje možné způsoby jejich detekce. Všechny *O*-fosfáty jsou stabilní v kyselém prostředí, v přítomnosti hydroxylaminu a pyridinu, proto je detekce fosfoserinu a fosfotreoninu možná po kyselé hydrolýze proteinů. Fosfotyrosin je stabilní i v alkalickém prostředí, proto se jeho detekce obvykle provádí po alkalické hydrolýze proteinů. *N*-fosfáty s výjimkou fosfoargininu jsou relativně stabilní v alkalickém prostředí, ale extrémně labilní

v kyselém prostředí, proto je jejich detekce možná pouze po alkalické hydrolýze. Všechny acylfosfáty jsou reaktivní fosfoaminokyseliny; jsou nestabilní v kyselém i alkalickém prostředí, a proto mohou být analyzovány pouze nepřímo. Fosfocystein je nestabilní v kyselém prostředí, ale relativně stabilní v alkalickém prostředí [14, 20].

### 1.1.2 Způsob fosforylace proteinů

Fosforylace proteinů je katalyzována proteinkinasami. Tyto enzymy patří mezi transferasy, které katalyzují přenos  $\gamma$ -fosfátu z adenosintrifosfátu na specifickou aminokyselinu, respektive nukleofilní akceptor v jejím postranním řetězci [13, 21]. Podle toho, které aminokyselinové zbytky jsou fosforylovány, lze eukaryotní proteinkinasy rozdělit na serin/threonin-proteinkinasy, tyrosin-proteinkinasy a proteinkinasy s duální specifitou [13, 22, 23]. Serin/threonin-proteinkinasy tvoří asi 80% všech proteinkinas. Tyto proteinkinasy katalyzují fosforylaci serinových a threoninových zbytků, ale preferují serinové zbytky. Tyrosin-proteinkinasy katalyzují fosforylaci tyrosinových zbytků. Proteinkinasy s duální specifitou působí jako serin/threonin-proteinkinasy a zároveň i jako tyrosin-proteinkinasy [13, 22, 24]. V prokaryotních a v malé míře také v eukaryotních organismech se vyskytují ještě histidin-proteinkinasy, které katalyzují fosforylaci histidinových zbytků [25–27].

Všechny proteinkinasy fosforylují proteiny ochotněji než samotné aminokyseliny. To je dáno tím, že aktivní místo proteinkinas interaguje nejenom s fosforylačním místem proteinu, ale také se sousedními aminokyselinovými zbytky [13, 28]. Každá proteinkinasa je schopna rozpoznat pouze určitou aminokyselinovou sekvenci. Tato sekvence pak určuje peptidovou specifitu dané proteinkinasy a bývá označována jako sekvenční motiv rozpoznávaný proteinkinasou. Identifikace sekvenčních motivů pro jednotlivé proteinkinasy je cílem intenzivního výzkumu [13, 20, 28–31]. Identifikované sekvenční motivy mohou být použity k předpovědi, které proteiny by mohly být danou proteinkinasou fosforylovány [13].

Substrátová specifita proteinkinas je ovlivněna také existencí interakčních domén. Tyto domény se nalézají ve vzdálenosti 50 – 100 aminokyselinových zbytků od aktivních míst proteinkinas a zvyšují jejich afinitu pro určité proteiny. Tyto proteiny musejí mít ve své struktuře vhodný sekvenční motiv, tzv. „docking“ místo, které je rozpoznáno interakční doménou proteinkinasy. Interakce mezi proteinkinasami a „docking“ místy proteinů zvyšují lokální koncentrace proteinů a tím usnadňují jejich efektivní fosforylaci [13, 32]. Některé proteinkinasy jsou schopny fosforylovat pouze několik proteinů, jiné stovky proteinů [13].

Defosforylace proteinů je katalyzována proteinfosfatasami, které patří mezi hydrolytické enzymy. Podobně jako proteinfosfatasy se eukaryotní proteinfosfatasy rozdělují podle toho, který aminokyselinový zbytek v proteinu defosforylují. Serin/threonin-

proteinfosfatasy defosforylují fosfoserinové a fosfothreoninové zbytky, ale na rozdíl od příslušných proteinkinás preferují fosfothreoninové zbytky. To by mohlo vysvětlit, proč se v proteinech nachází více fosfoserinových zbytků než fosfothreoninovým. Tyrosin-proteinfosfatasy defosforylují fosfotyrosinové zbytky. Proteinfosfatasy s duální specificitou vykazují aktivitu jak tyrosin-proteinfosfatas tak serin/threonin-proteinfosfatas, proto mohou defosforylovat fosfotyrosinové i fosfothreoninové nebo fosfoserinové zbytky [13, 33, 34]. V prokaryontních organismech byly objeveny také histidin-proteinfosfatasy, které katalyzují defosforylací fosfohistidinu [27]. Tyto enzymy se sporadicky vyskytují i u obratlovců [35].

Lidský genom kóduje 518 proteinkinás a asi 140 proteinfosfatas [3, 13, 24, 36, 37]. Počet tyrosin-proteinkinás se příliš neliší od počtu tyrosin-proteinfosfatas, stejně jako počet proteinkinás s duální specificitou se příliš neliší od počtu proteinfosfatas s duální specificitou. Naproti tomu počet serin/threonin-proteinkinás je asi 15krát větší než počet serin/threonin-proteinfosfatas. Přesto serin/threonin-proteinfosfatasy nemají nižší specificitu než serin/threonin-proteinkinasy. To je dáno tím, že katalytická podjednotka serin/threonin-proteinfosfatasy může asociovat s různými regulačními podjednotkami, a tím ovlivňovat substrátovou specificitu této serin/threonin-proteinfosfatasy. Nicméně podobně jako proteinkinasy jsou některé proteinfosfatasy schopné defosforylovat pouze několik proteinů, zatímco jiné stovky [13, 34, 37].

Momentální stav fosforylace proteinu, a tím i jeho aktivity, závisí na poměru aktivit proteinkinás a proteinfosfatas, které na něj působí [17].

### 1.1.3 Souvislost mezi fosforylací proteinů a lidskými onemocněními

Jak už bylo výše zmíněno, proces fosforylace/defosforylace reguluje téměř všechny aspekty buněčného života a je klíčovým mechanismem pro udržování homeostasy buněk [3, 10]. Abnormální fosforylace proto souvisí s mnoha závažnými lidskými onemocněními jako je např. rakovina, diabetes nebo revmatoidní artritida. Zejména mutace v proteinkinásách, případně proteinfosfatasách, se významně uplatňují v řadě těchto onemocnění [10]. Existuje dokonce databáze mutací v proteinkinásách a s nimi asociovaných lidských onemocnění [38]. Také mnoho přírodně se vyskytujících toxinů a patogenů působí prostřednictvím změny fosforylačního stavu řady intracelulárních proteinů [10].

Při různých druzích rakoviny dochází ke zvýšené/snížené expresi proteinkinás a k funkčním mutacím jejich genů jako jsou delece, translokace, amplifikace a/nebo virové inserce [3, 39]. Následkem těchto mutací jsou produkovány proteinkinasy s abnormální aktivitou. Až u 50% všech lidských tyrosin-proteinkinás byla v souvislosti s různými druhy rakovin zjištěna abnormální změna v jejich aktivitě [39]. Velký počet proteinkinás asociovaných s rakovinou a dalšími onemocněními vedl a stále ještě vede k intenziv-

nímu úsilí o vyvinutí specifických inhibitorů proteinkinasy, které by se mohly uplatnit při léčbě těchto onemocnění. Některé z vyvinutých inhibitorů jsou již zkoušeny v klinických testech [3, 10].

Proteinkinasy a jejich substráty mohou sloužit jako užitečné molekulární markery rakoviny zvláště neocenitelné pro svou potenciální rozlišovací sílu v molekulární klasifikaci rakovin (diagnóze), v předpovídání klinického výsledku (prognóze) a v předpovídání odpovědi na léky. To je dáno tím, že fosfoproteomy normálních a nádorových tkání se liší a navíc se liší i fosfoproteomy jednotlivých nádorů. Je tedy možné nalézt fosfoproteiny, jejichž fosforylace je charakteristická pouze pro určité onemocnění. Tyto fosfoproteiny pak mohou sloužit jako markery daného onemocnění a jejich hledání je cílem intenzivního výzkumu [39].

## 1.2 Pepsiny a pepsinogeny a jejich fosforylace

### 1.2.1 Pepsiny a pepsinogeny

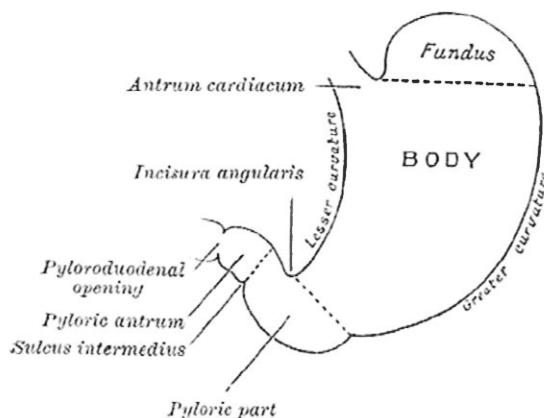
Pepsiny jsou hlavní proteolytické enzymy žaludeční šťávy obratlovců, které katalyzují štěpení peptidových vazeb uvnitř polypeptidových řetězců. Ve svém aktivním místě obsahují dva zbytky kyseliny asparagové, a proto se řadí do rodiny aspartátových proteas. Stejně jako další aspartátové proteasy se vyznačují nízkým pH optimem proteolytické aktivity a jsou syntetizovány ve formě inaktivních proenzymů [40].

U obratlovců byly nalezeny tři odlišné pepsiny – pepsin A (E.C.3.4.23.1), pepsin B (E.C.3.4.23.2) a pepsin C (E.C.3.4.23.3). Tyto pepsiny jsou produkovány ve formě příslušných inaktivních pepsinogenů buňkami žaludeční sliznice a jsou sekretovány do žaludeční dutiny, kde jsou přeměněny na aktivní enzym. Zastoupení jednotlivých pepsinogenů se liší v závislosti na živočišném druhu. Například žaludeční sliznice prasete produkuje převážně pepsinogen A [41] a v malé míře i pepsinogen B [42] a pepsinogen C [43]. Naproti tomu u potkana byl nalezen pouze pepsinogen C [44]. U primátů jsou syntetizovány pepsinogeny A a C [45–47]; přítomnost pepsinogenu B zjištěna nebyla.

#### 1.2.1.1 Lidské pepsiny a pepsinogeny

V lidské žaludeční šťávě se nacházejí dvě imunochemicky a biochemicky odlišné aspartátové proteasy – pepsin A a pepsin C.

Pepsin A, označovaný také jen jako pepsin, je hlavní proteasou lidské žaludeční šťávy. Je sekretován ve formě inaktivního proenzymu – pepsinogenu A – hlavními buňkami ve žláznaté oblasti fundu a těla žaludku (viz obr. 1.2) [48]. Mimo žaludek se pepsinogen A v malém množství nachází také v krevním séru a v moči [40]. Lidská žaludeční sliznice produkuje celkem pět isozymogenů pepsinogenu A, které se liší se svými fyzikálně-



Obr. 1.2: Schéma lidského žaludku.

chemickými vlastnostmi. Podle klesající elektroforetické (anodické) mobility byly tyto isozymogeny označeny Pg1 – Pg5 [48]. Dominantními isozymogeny jsou Pg3 a Pg5 [49].

Pepsin C bývá označován triviálním názvem gastriksin. Podobně jako pepsinogen A je produkován ve formě inaktivního proenzymu pepsinogenu C (progastriksiinu) hlavními buňkami v žláznaté oblasti fundu a těla žaludku. Dále je vytvářen pylorickými žlázkami v antru žaludku, Brunnerovými žlázkami v proximálním dvanáctníku a epitelovými buňkami prostaty a semenných váčků. Stejně jako pepsinogen A se v malém množství nachází také v krevním séru [40]. V lidské žaludeční sliznici jsou produkovány dva isozymogeny pepsinogenu C. Ty byly podle klesající elektroforetické (anodické) mobility označeny Pg6 a Pg7 [48]; dominantní je isozymogen Pg7 [40].

### 1.2.1.2 Struktura pepsinů a pepsinogenů

Do dnešního dne byla stanovena kompletní primární struktura více než 50 pepsinogenů z různých živočišných druhů; jako první byla určena kompletní aminokyselinová sekvence prasečího pepsinu A [50]. Aminokyselinovou sekvenci odvozenou z nukleotidové sekvence cDNA nebo genomické DNA lze rozdělit na tři části: signální peptid (prepeptid), propeptid (aktivační peptidy) a vlastní enzymovou část (pepsinovou část). Signální peptid je vysoce hydrofóbní peptid složený asi z 15 aminokyselinových zbytků, které jsou odštěpeny signální peptidasou během syntézy pepsinogenu při vstupu do endoplazmatického retikula. Nativní pepsinogen je tvořen pouze pepsinovou částí a propeptidem [41].

Pepsinogeny jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem o délce asi 370 aminokyselin, který je spojen třemi intramolekulárními disulfidickými můstky. N-konec polypeptidového řetězce (40 – 50 aminokyselin) tvoří propeptid, který je uvolněn při aktivaci pepsinogenů [51]. Propeptid je silně bazický, obsahuje velké množství lysinových a argininových zbytků, zatímco zbytek řetězce (pepsin) obsahuje velké množství

zbytků asparagových a glutamových kyselin a velmi málo bazických aminokyselin [52]. V tab. 1.1 je uveden počet aminokyselinových zbytků a zastoupení bazických aminokyselin v prasečím pepsinogenu A [53, 54], lidském pepsinogenu A [49, 55] a lidském pepsinogenu C [56].

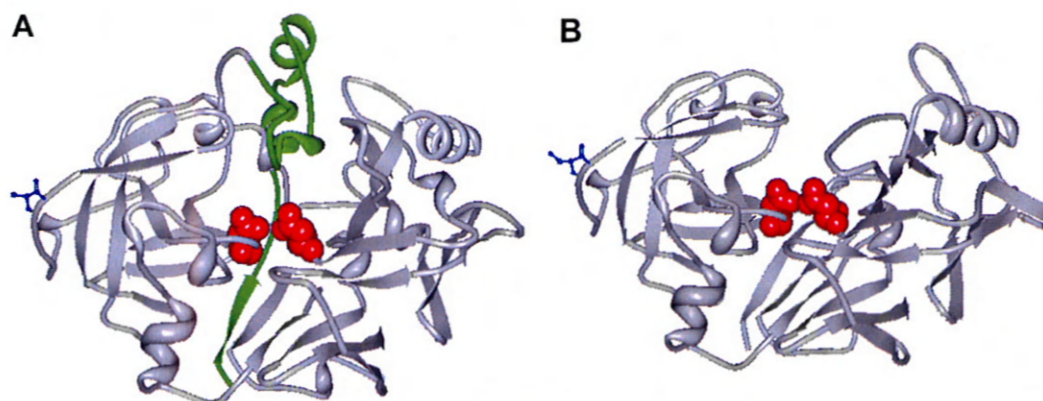
**Tab. 1.1:** Aminokyselinové složení vybraných pepsinogenů

	Prasečí pepsinogen A	Lidský pepsinogen A	Lidský pepsinogen C
Počet aminokys. zbytků v propeptidu	44; z toho 9 K, 2 R a 2 H	47; z toho 7 K, 5 R a 1 H	43; z toho 8 K 3 R a 1 H
Počet aminokys. zbytků v aktivním enzymu	326; z toho 1 K, 2 R a 1 H	326; z toho 3 R, a 1 H	329; z toho 3 R a 1 H
Celkový počet aminokys. zbytků	370; z toho 10 K, 4 R a 3 H	373; z toho 7 K, 8 R a 2 H	372; z toho 8 K 6 R a 2 H

Terciální struktura je známa pro prasečí pepsinogen A a pepsin A, pro lidský pepsinogen A a pro lidský pepsinogen C [41]. Lidský pepsinogen A je více podobný prasečímu pepsinogenu A než lidskému pepsinogenu C. Molekuly pepsinogenu (obr. 1.3 A) se skládají ze dvou domén, které mají dvojnásobnou osu symetrie a jsou převážně tvořeny strukturami skládaného listu (na obr. 1.3 šedě). Spojení těchto dvou domén vytváří štěrbinu vázající substrát. Štěrbina tvoří aktivní místo a obsahuje dva zbytky kyseliny asparagové (na obr. 1.3 červeně). V pepsinogenu je tato štěrbinu překryta propeptidem (na obr. 1.3 A zeleně), který slouží k zablokování vstupu substrátu do aktivního místa. Propeptid je vázán elektrostatickými interakcemi, vodíkovými vazbami a hydrofóbními interakcemi a je nezbytný k udržení pepsinogenu v inaktivní formě v neutrálním pH [52].

Při pH nižším než 5 jsou pepsinogeny konvertovány na aktivní enzymy – pepsiny. Při aktivaci dochází k protonaci karboxylových skupin zbytků asparagových kyselin v aktivním místě enzymu, a tím k zeslabení interakcí mezi propeptidem a aktivním enzymem. To vede ke změně konformace a vynoření propeptidu, který je následně odštěpen [51, 52]. Odštěpení propeptidu při pH vyšším než 2,5 probíhá smíšeným reakčním mechanismem zahrnujícím intermolekulární i intramolekulární reakce, v pH nižším než 2,5 probíhá intramolekulárními reakcemi. Po odštěpení propeptidu dochází k dalším konformačním změnám, které odkryjí oba dva zbytky kyseliny asparagové umístěné v aktivním místě a uvolní štěrbinu (aktivní místo) pro vazbu substrátu (obr. 1.3 B) [51].





**Obr. 1.3:** Terciální struktura prasečího pepsinogenu A (A) a prasečího pepsinu A (B) Šedě – pepsinová část složená ze dvou domén; zeleně – propeptid; červeně – dva zbytky kyseliny asparagové v aktivním místě; modře – serinový zbytek, na který je vázána fosfátová skupina.

### 1.2.1.3 Vlastnosti pepsinů a pepsinogenů

Pepsinogeny jsou složeny asi z 370 aminokyselinových zbytků a jejich relativní molekulová hmotnost je asi 40 000 [51]. Jejich izoelektrický bod je ve srovnání s jinými proteiny nízký a jeho hodnota se pohybuje v rozmezí 3,7 – 3,95 [51, 57]. Jak již bylo zmíněno dříve, při aktivaci pepsinogenů na pepsiny dochází k odštěpení 40 – 50 aminokyselin, a tím ke snížení relativní molekulové hmotnosti zhruba na 35 000 [51]. V důsledku ztráty většiny bazických aminokyselin (tab. 1.1) dochází také k výraznému poklesu izoelektrického bodu na hodnotu nižší než 1 [51, 58]. V tab. 1.2 jsou uvedeny relativní molekulové hmotnosti pro lidské a prasečí pepsiny a pepsinogeny.

**Tab. 1.2:** Relativní molekulové hmotnosti lidských a prasečích pepsinů a pepsinogenů.

Enzym	$M_r$
lidský pepsinogen A	40 306
lidský pepsin A	34 628
lidský pepsinogen C	40 568
lidský pepsin C	35 461
prasečí pepsinogen A	39 533
prasečí pepsin A	34 510

Relativní molekulové hmotnosti ( $M_r$ ) byly převzaty z databáze Expasy (SIB, Ženeva, Švýcarsko).

Pepsiny jsou proteolyticky aktivní při nízkém pH, nejvyšší aktivitu vykazují kolem pH 2 – 3. Se zvyšováním pH nad 3 jejich aktivita klesá. Lidský pepsin A vykazuje nejvyšší aktivitu při použití hemoglobinu jako substrátu při pH 2,0, lidský pepsin C při pH 2,3 [49] a prasečí pepsin A při pH 2,2 [59]. Při pH vyšším než 6,0 je pepsin A i

pepsin C neaktivní, ale jejich aktivitu lze obnovit snížením pH. Při pH vyšším než 7 je pepsin A už ireverzibilně denaturován, zatímco aktivitu pepsinu C lze stále ještě částečně obnovit snížením pH [49]. Pepsinogeny jsou na rozdíl od pepsinů stabilní v mírně kyselých až mírně alkalických pH. V pH nižších než 5 jsou pepsinogeny konvertovány na aktivní pepsiny. V pH vyšších než 8,5 jsou lidské pepsinogeny A a C denaturovány [60]. Prasečí pepsinogen A je ireverzibilně denaturován až v pH vyšších než 10,5 [59].

### 1.2.2 Fosforylace pepsinů a pepsinogenů

Fosforylace pepsinů a pepsinogenů se liší v závislosti na živočišném druhu. Pepsiny a pepsinogeny některých živočichů obsahují fosfátové skupiny, jiné tyto skupiny nemají. Liší se i počet vázaných fosfátových skupin. Například prasečí pepsinogen A i pepsin A obsahují ve svých molekulách jednu fosfátovou skupinu, která je vázána na serinovém zbytku v poloze 68 [61]. Tento fosfoserinový zbytek se nachází na povrchu molekuly pepsinu [62]. Obdobně je fosforylován i opičí pepsinogen A, který ve své molekule obsahuje také jednu fosfátovou skupinu vázanou na serinovém zbytku [45]. Hovězí pepsinogen A může ve své molekule obsahovat dokonce několik fosfátových skupin, vázaných pravděpodobně na serinových zbytcích [63, 64]. Naproti tomu některé pepsiny a pepsinogeny ve svých molekulách fosfátové skupiny vůbec neobsahují. Například u potkaního pepsinogenu C nebyla nalezena žádná fosfátová skupina [44], stejně jako u opičího pepsinogenu C [46, 47] a prasečího pepsinogenu C [65]. Ani u kuřecího pepsinogenu A nebyla zjištěna přítomnost fosfátových skupin, ale zato je tento pepsinogen glykosylován v místě, na kterém se v prasečím pepsinogenu A nachází fosfátová skupina [66].

Dlouhou dobu se předpokládalo, že lidské pepsinogeny ve svých molekulách žádné fosfátové skupiny neobsahují [40, 49]. Později však bylo zjištěno, že lidské pepsinogeny a pepsiny jsou fosforylovány a navíc se ukazuje, že fosforylace lidských pepsinogenů a pepsinů je pravděpodobně ovlivněna stavem žaludeční sliznice a souvisí s různými žaludečními onemocněními. U zdravých lidí nebyly v pepsinogenu C detegovány žádné fosfátové skupiny, zatímco v pepsinogenu A byla nalezena jedna fosfátová skupina ale pouze v některých jeho izoformách (Pg2 a Pg4). Bylo zjištěno, že fosfátová skupina je vázána na serinovém zbytku [67]. Naproti tomu pepsinogeny pacientů s karcinomem žaludku vykazují zvýšenou fosforylaci. Nicméně jednotlivé studie se rozcházejí v počtu detegovaných fosfátových skupin. Hynek a kol. našel jednu fosfátovou skupinu v molekule pepsinogenu A a dvě fosfátové skupiny v molekule pepsinogenu C [68]. Jiná studie prokázala přítomnost jedné fosfátové skupiny v molekule pepsinogenu C a jedné až dvou v molekule pepsinogenu A [69]. Navíc pepsinogeny pacientů s karcinomem žaludku vykazují vyšší fosforylaci než pepsinogeny pacientů s vředovou chorobou [70, 71]. Doposud však není známo, na které aminokyselinové zbytky jsou fosfátové skupiny vázány.

## 1.3 Metody pro separaci, izolaci a analýzu fosforylovaných proteinů a peptidů

Navzdory velkému pokroku v separačních a detekčních technikách není z následujících důvodů studium fosforylace jednoduchou a rutinní záležitostí. (i) Rozsah fosforylace je obecně nízký; jen nepatrná část proteinů v buňce je v daném čase fosforylována. (ii) Absolutní množství fosfoproteinů v buňce je velmi malé. (iii) Místa fosforylace stejného proteinu se mohou lišit. Fosfoprotein je heterogenní, existuje v několika různých fosforylovaných formách. (iv) Dynamický rozsah používaných analytických metod pro studium fosforylace je omezený. Výsledkem je identifikace pouze majoritní formy fosfoproteinů, zatímco minoritní formy nejsou vůbec detegovány. (v) V důsledku kontaminace fosfatasami může během přípravy vzorku docházet k částečnému odštěpení fosfátových skupin. (vi) Vzhledem ke kyselému a hydrofilnímu charakteru fosfopeptidů je účinnost jejich ionizace při analýzách hmotnostní spektrometrií podstatně nižší v porovnání s nemodifikovanými peptidy. Současně může docházet ke ztrátám fosfopeptidů na sorbentu používaném na odsolení peptidové směsi vzniklé po proteolytickém štěpení fosfoproteinů [17, 72, 73]. Přehled nejvíce používaných metod pro selektivní obohacení, izolaci a separaci fosforylovaných proteinů a peptidů a jejich následnou detekci, identifikaci a určení místa fosforylace je uveden v následujících podkapitolách.

### 1.3.1 Metody používané pro separaci a izolaci fosfoproteinů a fosfopeptidů

Metody pro separaci a izolaci fosfoproteinů a fosfopeptidů využívají změny izoelektrického bodu proteinů po navázání fosfátové skupiny nebo změny imunogenních vlastností po fosforylaci proteinů nebo schopnosti fosfátové skupiny interagovat s kovovými ionty. Zvláštní skupinou jsou pak metody založené na chemické derivatizaci fosfátové skupiny proteinů. Stručný přehled jednotlivých metod je uveden v následujících podkapitolách.

#### 1.3.1.1 Iontově-výměnná chromatografie

Iontově-výměnná chromatografie je jednou z nejpoužívanějších metod separace proteinů, která využívá jejich rozdílných nábojů. Náboj proteinu je silně závislý na pH, při pH vyšším než pI jsou proteiny adsorbovány na anexy a při pH nižším než pI jsou proteiny adsorbovány na katexy. Adsorbované proteiny jsou eluovány změnou pH nebo zvýšením iontové síly.

Substituce neutrální hydroxylové skupiny serinu, threoninu a tyrosinu negativně nabitou fosfátovou skupinou způsobuje snížení izoelektrického bodu proteinu, tedy změnu

náboje proteinu. Toho lze využít k separaci fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů a proteinů na katexech a anexech. Na katexech lze při nízkém pH (2,7) dosáhnout separace fosfopeptidů z peptidových směsí vzniklých proteolytickým štěpením proteinů trypsinem. Spolu s fosfopeptidy jsou ale také eluovány silně kyselé nefosforylované peptidy [23, 74–76]. Fosfopeptidy, které obsahují velký počet fosfátových skupin a mají záporný náboj, se na katexy neadsorbují [16].

Separace fosforylovaných peptidů z peptidových směsí vzniklých proteolytickým štěpením proteinů trypsinem lze dosáhnout také na anexech. Fosfopeptidy jsou na anexy adsorbovány silněji než nefosforylované peptidy a jejich interakce s anexy je tím silnější, čím vyšší je počet fosfátových skupin. Ale stejně jako na katexech tak i anexech mohou být spolu s fosfopeptidy eluovány i některé nefosforylované peptidy [77].

Na anexech lze také separovat různě fosforylované formy jednoho izolovaného proteinu. Obdobně jako v případě fosfopeptidů je na anex nejsilněji adsorbována nejvíce fosforylovaná forma proteinu a nejslaběji jeho nefosforylovaná forma, která je také nejdříve eluována [78–81].

Využití iontově-výměnné chromatografie pro separaci fosfoproteinů a fosfopeptidů má i určitá omezení. Tato metoda vyžaduje velká množství vzorku (desítky miligramů). Při chromatografii je navíc vzorek rozdělen na mnoho částí, z nichž každá vyžaduje separátní analýzu hmotnostní spektrometrií, což vede k vyšší časové náročnosti této metody [18].

### 1.3.1.2 Chromatofokusace

Chromatofokusace je metoda separace proteinů, která využívá rozdílného izoelektrického bodu separovaných proteinů. Chromatofokusací lze použít k separaci fosforylované a nefosforylované formy jednoho proteinu a také k separaci rozdílně fosforylovaných forem jednoho proteinu, protože navázáním fosfátové skupiny/fosfátových skupin dochází ke změně izoelektrického bodu proteinu [82, 83]. Tato metoda není schopna odlišit různou pozici fosfátové skupiny; chromatofokusací nelze separovat dvě monofosforylované formy jednoho proteinu, které se liší pouze umístěním fosfátové skupiny [84].

### 1.3.1.3 Imunoprecipitace

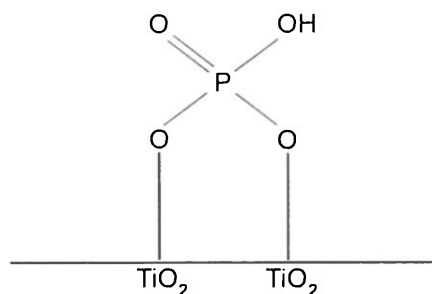
Imunoprecipitace pomocí fosfo-specifických monoklonálních nebo polyklonálních protilátek patří k nejjednodušším metodám izolace fosfoproteinů [17]. Tato metoda se často používá k izolaci fosfoproteinů obsahujících fosfotyrosin [85–87], ale pouze sporadicky k izolaci fosfoproteinů obsahujících fosfoserin a fosfothreonin [88]. To je dáno tím, že protilátky proti fosfoserinu a fosfothreoninu často rozpoznávají celý sekvenční motiv obklopující fosforylovaný aminokyselinový zbytek, a jsou proto schopné imunoprecipitovat

pouze některé fosfoproteiny obsahující fosfoserinové a fosfothreoninové zbytky [89]. Naproti tomu protilátky proti fosfotyrosinu rozpoznávají primárně fosfotyrosin, ačkoliv i ony mohou být částečně ovlivněny okolními aminokyselinami. Proto je vhodné pro imunoprecipitaci fosfoproteinů obsahujících fosfotyrosin použít několik různých protilátek proti fosfotyrosinu [18].

Snahy o izolaci fosfopeptidů pomocí protilátek proti fosfotyrosinu jsou velmi sporadické a většinou nebyly příliš úspěšné v důsledku nízké selektivity a citlivosti použitých protilátek [90, 91]. Teprve nedávno byla provedena úspěšná imunoprecipitace fosfopeptidů pomocí nových protilátek proti fosfotyrosinu [92].

#### 1.3.1.4 Afinitní chromatografie na oxidech kovů

Afinitní chromatografie na oxidech kovů je používána pro selektivní izolaci a obohacení fosfopeptidů z komplexních biologických směsí. Tato metoda využívá vysoké afinity fosfátových skupin k určitým oxidům kovů. Schopnost oxidu titaničitého selektivně adsorbovat organické fosfáty byla popsána už v roce 1990 [93], ale teprve nedávno byl oxid titaničitý použit pro selektivní separaci fosforylovaných peptidů [94–96]. Předpokládaná interakce fosfátové skupiny s oxidem titaničitým je na obr. 1.4 [97]. Podobně jako u afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech jsou fosfopeptidy na oxid titaničitý adsorbovány v kyselém prostředí a eluovány jsou v zásaditém prostředí. Spolu s fosfopeptidy mohou být na oxid titaničitý adsorbovány i nefosforylované peptidy. Jejich adsorpci lze omezit esterifikací jejich karboxylových skupin [94, 98] nebo použitím kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové, ftalové nebo salicylové při adsorpci a promývání [97].



Obr. 1.4: Vazba fosfátu na oxid titaničitý [97]

Pro izolaci fosfopeptidů z proteolyticky štěpených proteinů lze použít i oxid zirkoničitý [99, 100]. Oxid zirkoničitý vykazuje větší selektivitu pro fosfopeptidy obsahující jednu fosfátovou skupinu, zatímco oxid titaničitý preferuje fosfopeptidy s větším počtem fosfátových skupin [99]. Nedávno byly fosfopeptidy selektivně izolovány také na

oxidu železitém [101], oxidu hlinitém [102], oxidu galitém [103] a oxidu niobičném [104]. Chromatografie na jednotlivých oxidech kovů jsou komplementární; použitím několika různých oxidů kovů lze docílit izolace více fosfopeptidů.

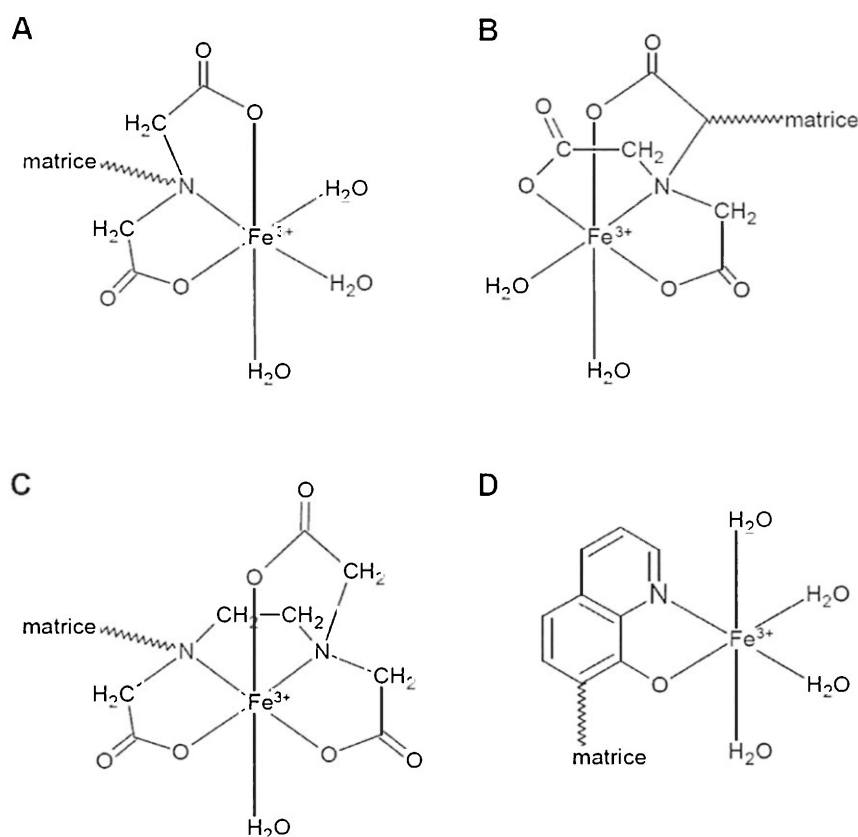
Ačkoli se afinitní chromatografie na oxidech kovů osvědčila pro izolaci fosfopeptidů obsahujících fosfátové skupiny vázané jak na serinových, tak threoninových tak i tyrosinových zbytcích, nemusí být vhodná pro izolaci fosfoproteinů a velkých fosfopeptidů v důsledku sterického bránění [16].

### 1.3.1.5 Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech

Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC) představuje nejlépejší metodu pro selektivní izolaci, obohacení i separaci fosfopeptidů a fosfoproteinů z biologických vzorků. Tuto metodu lze použít jak pro peptidy a proteiny fosforylované na serinových a threoninových zbytcích, tak pro peptidy a proteiny fosforylované na tyrosinových zbytcích. IMAC je založena na vysoké afinitě fosfátových skupin proteinů k určitým kovovým iontům (železité, galité) imobilizovaným prostřednictvím chelátového ligandu na inertní matici. Chelátové ligandy určují množství koordinačně-kovalentních vazeb dostupných pro interakci kovového iontu s fosfátovou skupinou a ovlivňují tak sílu interakce s fosfoproteiny a fosfopeptidy. Mezi nejčastěji používané chelátové ligandy patří iminodiacetová kyselina (IDA) a nitrilotriocetová kyselina (NTA). IDA vytváří s kovovým iontem tři koordinačně-kovalentní vazby; zbylá tři koordinační místa kovového iontu, obsazená slabě vázanou vodou, jsou dostupná pro vazbu fosfátu (obr. 1.5 A). NTA vytváří s kovovým iontem čtyři koordinačně-kovalentní vazby a pro vazbu fosfátu zůstávají pouze dvě místa (obr. 1.5 B). Méně používaný ligand tris(karboxymethyl)ethylendiamin (TED) poskytuje pro vazbu fosfátu dokonce jen jedno místo (obr. 1.5 C) a naopak další ligand 8-hydroxychinolin (HQ) nechává pro vazbu fosfátu čtyři místa (obr. 1.5 D) [89, 105, 106].

IMAC byla použita k separaci různě fosforylovaných forem jednoho izolovaného proteinu, případně peptidu, jak bylo ukázáno např. na separaci různě fosforylovaných forem ovalbuminu [107], fosvitinu [108], sacharosynthasy [109] nebo protaminu [110]. Nízko-temperaturou IMAC byly také separovány rozdílně fosforylované formy lidských pepsinů a pepsinogenů izolovaných ze žaludeční sliznice pacientů s různými žaludečními onemocněními [111, 112].

IMAC lze také použít k izolaci fosfopeptidů [113–118] a fosfoproteinů [119, 120] z komplexních biologických směsí. Fosfopeptidy a fosfoproteiny jsou nejčastěji adsorbovány v kyselém prostředí (nízké pH) na železité nebo galité ionty imobilizované přes iminodiacetovou nebo nitrilotriocetovou kyselinu. Jejich desorpce lze dosáhnout zvýšením pH nebo přidávkem fosfátových iontů, případně účinkem chelatačního činidla, které ale uvolňuje i kovové ionty [89, 105, 106]. Na imobilizované železité a galité ionty mohou být



Obr. 1.5: Komplexy chelátových ligandů s železitými ionty

(A) komplex iminodiacetové kyseliny s železitým iontem, (B) komplex nitrilotriacetové kyseliny s železitým iontem, (C) komplex tris(karboxymethyl)ethylendiaminu s železitým iontem, (D) komplex 8-hydroxychinolinu s železitým iontem.

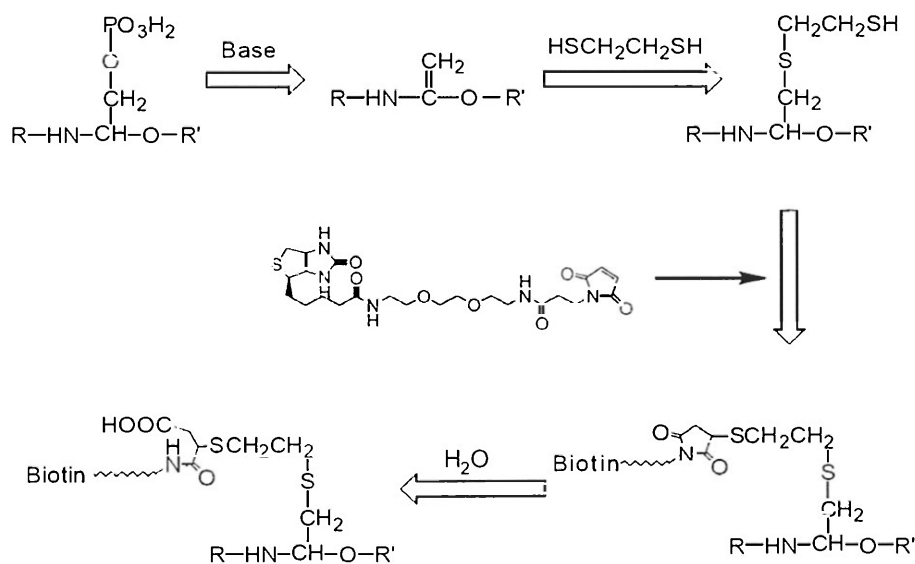
spolu s fosfopeptidy a fosfoproteiny adsorbovány také nefosforylované peptidy a proteiny bohaté na zbytky asparagových a glutamových kyselin [110, 116–118, 121–124]. Jejich adsorpci lze omezit vhodnou volbou chromatografických podmínek [125, 126] nebo esterifikací volných karboxylových skupin [116, 121, 127]. Nedávno byly pro obohacení fosfopeptidů úspěšně použity i immobilizované titaničité [128, 129] a zirkoničité [130] ionty a pro vazbu fosfopeptidů při fyziologickém pH byl navržen dvojjaderný zinečnatý komplex označovaný „Phos-tag“ [131].

Schopnost jednotlivých immobilizovaných kovových iontů adsorbovat fosfoproteiny a fosfopeptidy se liší. Některé studie zjistily vyšší selektivitu immobilizovaných galitých iontů pro fosfopeptidy [118] a ukázaly, že na immobilizované galité ionty se adsorbuje více fosfoproteinů než na immobilizované železité ionty [119]. Jiné studie ale naopak uvádějí, že immobilizované železité ionty jsou schopny adsorbovat více fosfopeptidů než immobilizované galité ionty [116]. Z dalších studií zase vyplynulo, že immobilizované galité ionty preferenčně obohacují fosfopeptidy s jednou fosfátovou skupinou, zatímco železité ionty preferenčně obohacují fosfopeptidy s více fosfátovými skupinami [116].

zité ionty preferují více fosforylované peptidy [132], a že výsledky izolací fosfopeptidů na jednotlivých imobilizovaných kovových iontech jsou komplementární [132, 133]. Volbou vhodných sorbentů, optimalizací chromatografických podmínek pro daný vzorek a případnou esterifikací karboxylových skupin proteinů a peptidů lze dosáhnout vyšší selektivity a získání většího počtu fosforylovaných peptidů a proteinů.

### 1.3.1.6 Metody založené na chemické derivatizaci fosfátové skupiny

Několik alternativních cest purifikace a v některých případech i izolace fosfopeptidů je založeno na selektivní chemické modifikaci fosforylovaných aminokyselin. Jedna z těchto cest zahrnuje vystavení fosfoproteinů a fosfopeptidů silně alkalickému prostředí, při kterém dochází k  $\beta$ -eliminaci fosfátů za vzniku reaktivních dvojných vazeb, na něž je následně adován ethanthiol [134]. Popsaný postup byl později modifikován tak, aby umožnil i specifickou izolaci původně fosforylovaných peptidů: fosforylované aminokyselinové zbytky byly substituovány derivátem biotinu (obr. 1.6) a izolovány afinitní chromatografií na imobilizovaném avidinu [135]. Oba popsané postupy jsou použitelné pouze pro peptidy fosforylované na serinových a threoninových zbytcích; peptidy fosforylované na tyrosinových zbytcích  $\beta$ -eliminaci nepodstupují [134, 135]. Navíc substituce derivátem biotinu vyžaduje modifikaci reaktivních cysteinových zbytků oxidací kyselinou permravenčí, současně se ovšem mohou oxidovat i methioninové a tryptofanové zbytky. Další komplikace může způsobovat i případná *O*-glykosylace, která také snadno podléhá  $\beta$ -eliminaci [135]. Nespornou výhodou obou popsaných postupů je nahrazení záporně nabitě fosfátové skupiny neutrální funkční skupinou. Nově modifikované pep-

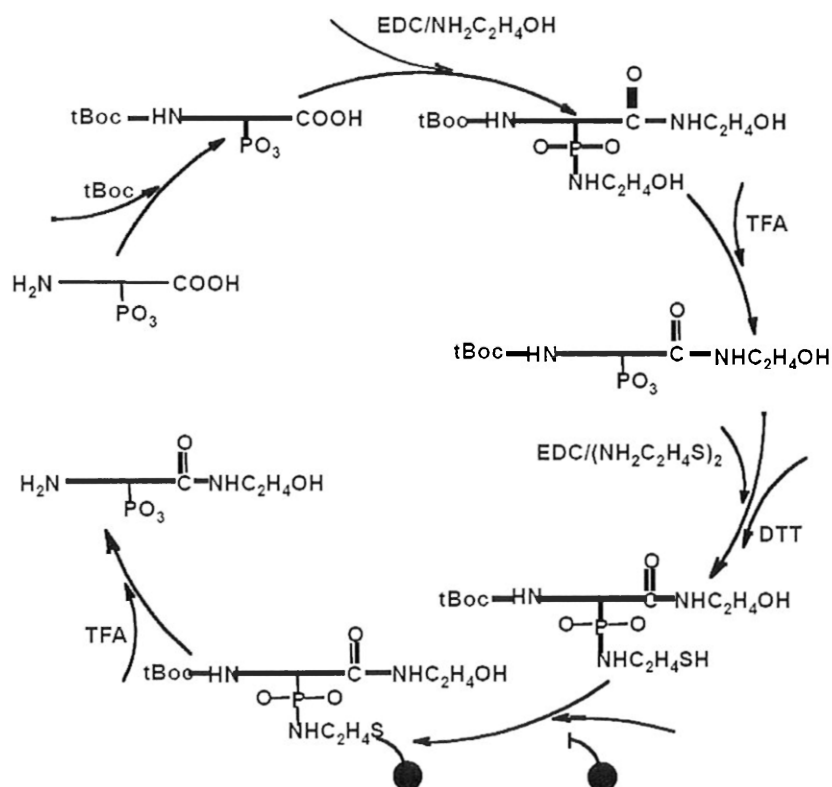


Obr. 1.6: Schéma sustituce fosfátové skupiny serinového zbytku derivátem biotinu [135]



tidy se v porovnání s původními fosfopeptidy mnohem lépe ionizují a také ochotněji fragmentují. Navíc nová funkční skupina je dostatečně stabilní a při fragmentaci nedochází k jejímu přednostnímu odštěpení jako v případě fosfátové skupiny, což zjednodušuje detekci tandemovou hmotnostní spektrometrií a usnadňuje určení místa fosforylace [17].

Další postup selektivní izolace fosfopeptidů (obr. 1.7) zahrnuje následující kroky. Proteiny jsou po alkylní cysteinů štěpeny specifickou proteasou. Aminokupiny vzniklých peptidů jsou zablokovány *tert*-butyloxy-karbonylovou skupinou a karboxylové a fosfátové skupiny jsou poté derivatizovány amidací. Fosfátové skupiny jsou následně regenerovány kyselou hydrolýzou fosforamidátových vazeb. Přebytečný amin je odstraněn promytím peptidů na reverzní fázi. Poté jsou fosfátové skupiny modifikovány kondenzací s cystaminem. Následná redukce disulfidové vazby uvnitř cystaminu generuje volnou sulfhydrylovou skupinu na každou fosfátovou skupinu fosfopeptidů. Přebytek cystaminu, redukčního činidla a vedlejších produktů reakce je odstraněn promytím peptidů na reverzní fázi. Modifikované fosfopeptidy jsou následně zachyceny na sorbentu s imobilizovanou jodacetylovou skupinou a po promytí jsou uvolněny rozštěpe-



Obr. 1.7: Schématické znázornění strategie selektivní izolace fosfopeptidu [136]

Detaily jsou uvedeny v textu. tBoc – *tert*-butyloxy-karbonylová skupina, EDC – *N,N'*-dimethylaminopropylethylkarbodiimid hydrochlorid, TFA – trifluoroctová kyselina, DTT – dithiothreitol.

ním fosforamidátové vazby kyselinou trifluoroctovou, která zároveň odstraňuje chránící *tert*-butyloxy-karboxylovou skupinu [136].

Oba uvedené postupy izolace fosfopeptidů se skládají z celé řady chemických reakcí a čistících kroků, z nichž každý představuje nezanedbatelné ztráty. Dostatečně velké množství vzorku je tedy obecným požadavkem přístupu založeného na chemické derivatizaci fosfátové skupiny, což zatím umožňuje detekci a identifikaci pouze hojně se vyskytujících fosfopeptidů/fosfoproteinů [17, 73].

### 1.3.2 Detekce fosfopeptidů a fosfoproteinů po elektroforetické separaci

#### 1.3.2.1 Radioaktivní značení

Klasický přístup detekce fosforylace spočívá v inkorporaci radioaktivně značeného fosfátu do fosfoproteinů. *In vivo* značení proteinů zahrnuje inkubaci celých organismů, buněk nebo tkání s [<sup>32</sup>P]fosfátem. Dalším krokem je pak separace proteinů z lyzovaných buněk SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou nebo dvourozměrnou gelovou elektroforézou a detekce fosforylace autoradiografií nebo „PhosphorImager“ systémem [20, 72, 137]. Tato metoda je velmi citlivá, ale její použití je omezeno na organismy a buňky, které jsou schopny radioaktivní značku inkorporovat v průběhu růstu [20]. Navíc značení <sup>32</sup>P nemusí být příliš efektivní v důsledku vysokých koncentrací neradioaktivního endogenního ATP a ačkoliv mnoho fosfoproteinů může být vizualizováno autoradiografií, nemusí být přítomny v množství dostatečně velkém pro jejich identifikaci [72].

*In vitro* značení zahrnuje inkubaci proteinů s proteinkinasami a [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, sloužícímu jako donor fosfátové skupiny. Pokud je ale protein již plně fosforylován *in vivo*, k navázání další fosfátové skupiny už nedojde a fosforylace tohoto proteinu nebude detegována [20]. Fosforylace zjištěná pomocí *in vitro* značení nemusí být fyziologicky relevantní, je třeba ji ověřit *in vivo* [20, 72].

#### 1.3.2.2 Detekce pomocí fosfo-specifických protilátek

K detekci fosfoproteinů lze použít protilátky, které rozpoznávají fosforylované aminokyselinové zbytky. Proteiny jsou nejprve separovány SDS-polyakrylamidovou elektroforézou, dvourozměrnou gelovou elektroforézou nebo izoelektrickou fokusací a fosfoproteiny jsou následně detegovány pomocí protilátek proti fosfoserinu, fosfothreoninu nebo fosfotyrosinu [90, 137–139]. V současnosti je komerčně dostupná celá řada kvalitních protilátek zejména proti fosfotyrosinu. Nicméně protilátky, které specificky rozeznávají fosfoserin a fosfothreonin, jsou citlivé na aminokyselinovou sekvenci obklopující fosforylovaný aminokyselinový zbytek, a proto nejsou schopny univerzální detekce všech

proteinů fosforylovaných na serinových a threoninových zbytcích. Proto je tato metoda používána hlavně pro detekci proteinů fosforylovaných na tyrosinových zbytcích [72, 140].

Pomocí polyklonálních protilátek proti fosfoserinu, fosfothreoninu a fosfotyrosinu byla v molekulách lidských pepsinogenů separovaných izoelektrickou fokusací detegována jedna fosfátová skupina v molekule pepsinogenu C a nejméně jedna v molekule pepsinogenu A [69].

### 1.3.2.3 Detekce fosfoproteinů a fosfopeptidů použitím fosfatas

Fosfatas hydrolyticky odštěpují fosfátové skupiny fosfoproteinů. Defosforylace proteinů vede ke změně jejich izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti, tedy i ke změně migračního chování během dvourozměrné elektroforézy. Toho lze využít k rozlišení fosforylovaných a nefosforylovaných forem proteinů. Pokud je část proteinového vzorku separována dvourozměrnou elektroforézou přímo a druhá část až po defosforylaci, lze porovnáním obou elektroforeogramů detegovat fosforylované proteiny [141]. Pro detekci změn v migračním chování proteinů po jejich defosforylaci fosfatasou lze použít i technologii diferenční gelové elektroforézy, která umožňuje detekci fosforylovaných a defosforylovaných proteinů v jednom gelu [142].

Změna vlastností proteinů, respektive peptidů, po jejich defosforylaci byla využita i při detekci fosfátových skupin v lidských pepsinogenech izolovaných ze žaludeční sliznice pacientů trpících rakovinou žaludku. Část pepsinogenů byla po proteolytickém štěpení separována RP-HPLC\* a kapilární zónovou elektroforézou, druhá část byla nejprve defosforylována kyselou fosfatasou z brambor, poté štěpena a separována RP-HPLC a kapilární zónovou elektroforézou. Porovnáním elektroforetických záznamů pak byla detegována jedna fosfátová skupina v molekule lidského pepsinogenu A a dvě fosfátové skupiny v molekule lidského pepsinogenu C [68].

### 1.3.3 Detekce a identifikace fosfopeptidů a fosfoproteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

K detekci a hlavně k identifikaci fosfopeptidů a fosfoproteinů a určení místa fosforylace je dnes téměř výhradně používána hmotnostní spektrometrie (MS). MS poskytuje informaci o molekulové hmotnosti proteinů a peptidů. Fosforylací proteinů dochází ke zvýšení jejich molekulové hmotnosti; navázání každé fosfátové skupiny na serinový, threoninový nebo tyrosinový zbytek vede ke zvýšení molekulové hmotnosti o 80 hmotnostních jednotek, tzv. Daltonů (Da). Změření molekulové hmotnosti intaktního fosfoproteinu v kombinaci se znalostí molekulové hmotnosti nemodifikovaného proteinu

\* „reverse phase high performance liquid chromatography“

či defosforylací fosfatasou umožňuje určení průměrného počtu fosfátů navázaných na polypeptidový řetězec. Pro získání přesnějších informací je nutné protein podrobit proteolýze a pracovat s jeho fragmenty – peptidy [17].

K identifikaci proteinů a fosfoproteinů pomocí peptidového mapování je dnes úspěšně používána technika MALDI-TOF MS („matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry“). Protein je nejprve proteolyticky rozštěpen na směs peptidů, která je analyzována MALDI-TOF MS. Pomocí porovnání experimentálně naměřené peptidové mapy s teoretickými peptidovými mapami všech proteinů v databázi (např. Swiss-Prot, SIB, Ženeva, Švýcarsko) je protein následně identifikován. K identifikaci fosfopeptidů lze použít porovnání peptidových map před a po reakci s alkalickou fosfatasou. Fosfopeptid lze identifikovat na základě charakteristického posunu, který je následkem ztráty fosfátu/fosfátů způsobené alkalickou fosfatasou. Počet fosfátových skupin navázaných na původním fosforylovaném peptidu lze určit z rozdílu hmotnosti fosfopeptidu a jeho defosforylovaného analogu; ztráta každého fosfátu způsobuje pokles hmotnosti peptidu o 80 Da [133, 143–146].

Technika MALDI-TOF MS také někdy umožňuje rozlišit mezi fosforylací na serinu nebo threoninu a fosforylací na tyrosinu. Při měření v režimu kladných iontů mohou peptidy fosforylované na serinových a threoninových zbytcích vykazovat významnou ztrátu neutrální molekuly  $H_3PO_4$  (ztráta 98 Da) a v mnohem menší míře také ztrátu  $HPO_3$  (ztráta 80 Da). Naproti tomu peptidy fosforylované na tyrosinových zbytcích vykazují výhradně ztrátu  $HPO_3$ , což je způsobeno vyšší stabilitou aromatického kruhu fosfotyrosinu. Rozdílná fragmentace peptidů fosforylovaných na tyrosinových zbytcích umožňuje jejich odlišení od peptidů fosforylovaných na serinových a threoninových zbytcích [147, 148].

Detekci a identifikaci fosfopeptidů pomocí MALDI-TOF MS může komplikovat potlačení jejich ionizace přítomnými nefosforylovanými peptidy a obecně slabá ionizace fosfopeptidů při měření v režimu kladných iontů. Důsledkem toho je, že signály fosfopeptidů mohou být v naměřených MS spektrech velmi slabé nebo nejsou vůbec zaznamenány. Pro překonání tohoto problému se osvědčilo fosfopeptidy nejprve izolovat afinitní chromatografií na imobilizovaných kovových iontech nebo afinitní chromatografií na oxidech kovů a teprve poté je analyzovat MALDI-TOF MS [97, 98, 145, 149]. Ionizaci fosfopeptidů lze také mírně zlepšit použitím 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny jako MALDI matrice [150] nebo přidavkem kyseliny fosforečné [151], alkyfosfonových kyselin [152] nebo amonných solí [153] do MALDI matrice.

Spojení MALDI s tandemovým hmotnostním spektrometrem, jako je TOF-TOF, kvadrupól-TOF nebo iontová past, umožňuje nejenom detekci a identifikaci fosfopeptidů po jejich izolaci afinitní chromatografií ale také následnou lokalizaci míst fosforylace založenou na MS/MS sekvenování [98, 124, 150, 154]. Tandemové hmotnostní spektro-

metry umožňují provést fragmentaci vybraných peptidových iontů kolizně indukovanou disociací. Fosfopeptidy při fragmentaci produkují nejenom sekvenčně specifické fragmenty ale také fragmenty, které jsou specifické pro fosfátové skupiny. Při měření v režimu záporných iontů fosfopeptidy poskytují charakteristické fragmentové ionty  $\text{PO}_3^-$  ( $m/z$  79) a  $\text{PO}_2^-$  ( $m/z$  63), což dovoluje jejich vysoce specifickou detekci pomocí skenu rodičovského iontu [155, 156]. Při měření v režimu kladných iontů peptidy fosforylované na serinových a tyrosinových zbytcích vykazují ztrátu  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (ztráta 98 Da); v MS/MS spektru je pak obvykle zaznamenán velmi intenzivní ion odpovídající ztrátě 98 Da. MS/MS spektrum zároveň poskytuje informace o lokalizaci fosforylace. Původní fosfoserin je pak v peptidu identifikován jako dehydroalanin a původní fosfothreonin jako dehydroamino-2-máselná kyselina [98, 154, 157]. Peptidy fosforylované na tyrosinových zbytcích při fragmentaci sice nevykazují ztrátu  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , ale v jejich MS/MS spektrech, naměřených v režimu kladných iontů, lze nalézt charakteristický imoniový ion ( $m/z$  216,043) [158].

## 2. Cíl práce

Cílem předkládané dizertační práce bylo vypracování vhodného metodického přístupu pro studium fosfoproteinů se zaměřením na lidské žaludeční aspartátové proteasy (pepsiny). Tyto proteiny jsou charakterizovány vyšším obsahem kyselých aminokyselinových zbytků, a proto nelze na tyto proteiny dosud popsané metody pro izolaci a separaci fosfoproteinů a fosfopeptidů jednoduše aplikovat. Pozornost jsme proto zaměřili zejména na vypracování metod pro selektivní separaci takovýchto fosfoproteinů a fosfopeptidů pomocí afinitní chromatografie. K řešení tohoto úkolu bylo potřeba:

- Porovnat schopnosti několika HP-IMAC sorbentů, lišících se inertní maticí, chelátovými ligandy a imobilizovanými kovovými ionty, separovat nativní fosfoproteiny (modelové fosfoproteiny: prasečí pepsin A, kuřecí ovalbumin)
- Na vybraných HP-IMAC sorbentech separovat fosforylované a nefosforylované formy lidských pepsinů
- Vypracovat metody separace fosfopeptidů z proteolyticky rozštěpených pepsinů na IMAC sorbentech a na oxidu titaničitém a ověřit místa fosforylace pomocí MALDI-TOF/TOF MS (modelový protein: prasečí pepsin A)
- Použít námi vypracovanou metodu pro separaci fosfopeptidů z proteolyticky rozštěpených proteinů lidské žaludeční šťávy a identifikovat fosforylační místa těchto proteinů, zejména pepsinů

## 3. Experimentální část

### 3.1 Chemikálie

Prasečí pepsin A (EC 3.4.23.1), kuřecí ovalbumin, hovězí hemoglobin, kyselá fosfatasa z brambor (EC 3.1.3.2), chlorid železitý, dusičnan železitý, chlorid galitý, dusičnan galitý, uranyl octan, hydrogenfosforečnan amonný, hydroxid amonný, dimethylamin hydrochlorid, HCl v methanolu, isopropylamin, ethylamin, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)karbodiimid, kyselina 2-(N-morfolin)ethansulfonová (MES), kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonová (HEPES), acetonitril (ACN), kyselina trifluorocetová (TFA), močovina, hydrogenuhlíčan amonný,  $\alpha$ -chymotrypsin z hovězího pankreasu (EC 3.4.21.1), jodacetamid a dithiotreitol byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diazomethan byl vyroben z *p*-tolylsulfonylethylmethylnitrosamidu Dr. Martinem Hrubým (Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd, Česká republika). BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent A, roztok hovězího sérového albuminu o koncentraci 2 mg/ml (standard pro stanovení proteinů) a Phosphoprotein Phosphate Estimation Assay Kit byly zakoupeny od Pierce (Rockford, IL, USA). Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová, 2,5-dihydroxyacetofenon a MALDI kalibrační standardy „Peptide Calibration Standard“ a „Protein Calibration Standard I“ byly pořízeny od Bruker Daltonics (Bremen, Německo). Ostatní chemikálie byly od IPL (Uherský Brod, Česká republika).

Sorbenty MA-BP a MA-HQ byly vyrobeny Dr. Martinem Hrubým a Dr. Milanem J. Benešem (Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd, Česká republika) a byly naplněny do HPLC kolon (250 mm  $\times$  4 mm I.D.) firmou Labio (Praha, Česká republika). Kolona POROS MC20 (100 mm  $\times$  4,6 mm I.D.) byla získána od Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Špičky obsahující C18 fázi (PerfectPure C18 Tip) byly zakoupeny od Eppendorf (Hamburg, Německo) a špičky TopTip IMAC (Fe<sup>3+</sup>), TopTip IMAC (Ga<sup>3+</sup>) a Toptip TiO<sub>2</sub> od Glygen (Columbia, VA, USA).

### 3.2 Přístroje

Chromatografická měření na kolonách POROS MC20 a MA-BP byla prováděna na HPLC systému od firmy Ecom (Praha, Česká republika) nebo Dionex (Sunnyvale, CA, USA). HPLC systém od firmy Ecom se softwarem Clarity (DataApex, Praha, Česká republika) byl vybaven dvěma čerpadly LCP 4000, dynamickou směšovací komorou, autosamplrem AS54 a UV/VIS spektrometrem LCD 2084 (280 nm) a byl doplněn

sběračem frakcí Fraction Collector 2110 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Dionex Summit HPLC systém s Chromeleon softwarem (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) byl vybaven gradientovou pumpou umožňující až kvartérní gradient, termostatovaným automatickým dávkovačem, kolonovým termostatem, detektorem s diodovým polem, pH detektorem a sběračem frakcí. Teplota kolony byla udržována na 25 °C a absorbance efluentu byla monitorována při 280 nm, 220 nm a 214 nm.

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Multiscan Microplate Reader MCC/340 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). K temperování byla používána vodní lázeň Julabo HE-4 (JULABO Labortechnik, Seelbach, Německo), Accu-Block Digital Dry Bath (Labnet International, Oakham, Rutland, UK) a Incubator with Orbital Shaker SI50 (Stuart Scientific, Stone, Staffordshire, UK). K odstřeďování byla využívána centrifuga s chlazením 5415R (Eppendorf, Hamburg, Německo). K odpařování byla použita vakuová odparka Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, Německo).

Analýza proteinových a peptidových vzorků byla prováděna na hmotnostním spektrometru Autoflex II TOF/TOF systému (Bruker Daltonics, Bremen, Německo) s využitím AnchorChip ocelového terčíku nebo standardního ocelového terčíku „MTP 384 massive target T“, oba s 384 pozicemi (Bruker Daltonics, Bremen, Německo).

Používaná voda byla připravena Milli-Q systémem (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Roztoky a pufrы byly před použitím přefiltrovány přes 0,2  $\mu\text{m}$  membránové filtry z nitrátu celulosy (Whatman, Maidstone, Kent, UK) na vakuové filtrační aparatury (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Vzorky byly před aplikací na kolony přefiltrovány přes filtrační nástavce Puradisc s PTFE (polytetrafluorethylen) membránou o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  (Whatman, Maidstone, Kent, UK).

### 3.3 Metody použité ke studiu proteinů

#### 3.3.1 Vzorky

Resekované části žaludků, získané na 1. chirurgické klinice 1. LF UK v Praze, byly promyty 50 mM Tris pufrém pH 7,2 a jednotlivé části byly rozděleny do několika proužků. Oddělená sliznice byla homogenizována v 50 mM Tris pufru pH 7,2 (1 g tkáně na 4 ml pufru). Homogenát byl centrifugován 60 min při 400 g za teploty 4 °C. Supernatant byl dlouhodobě uchováván ve zmraženém stavu při -18 °C.

Lidská žaludeční šťáva, získaná na 4. interní klinice 1. LF UK v Praze, byla lyofilizována a uchovávána dlouhodobě při -18 °C.



### 3.3.2 IMAC

#### 3.3.2.1 Interakce prasečího pepsinu A s chelátovými ligandy kovalentně vázanými na polymerní matici

Kolony MA-BP, MA-HQ a POROS MC20 (bez kovových iontů) byly ekvilibrovány 0,1% kyselinou octovou nebo 50 mM octanovým pufrem pH 4,0 nebo 0,1% kyselinou octovou s přidavkem NaCl (1 M) nebo 50 mM octanovým pufrem pH 4,0 s přidavkem NaCl (1 M). Po aplikaci 200  $\mu$ l roztoku prasečího pepsinu A (1 mg/ml adsorpčního pufru) byly kolony promyty adsorpčním pufrem. Navázaný pepsin byl eluován 200 mM fosfátovým pufrem pH 7,2. Na koloně MA-HQ byl zkoumán vliv ještě následujících pufrů na adsorpci a desorpci prasečího pepsinu A: 50 mM octanový pufr pH 3,5 – 6,0 obsahující 0 – 1 M NaCl; 50 mM fosforečnanový pufr pH 5,6 a 6,0 obsahující 0 nebo 1 M NaCl; 50 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 20 mM N-acetyl-L-fenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosin. Byly odebírány 0,5 – 1 ml frakce, v nichž byl stanovoven obsah proteinu (viz kap. 3.3.6.1) a proteolytická aktivita pepsinu (viz kap. 3.3.6.2). Není-li uvedeno jinak, průtoková rychlost byla 0,5 ml/min.

#### 3.3.2.2 Sycení kolon $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Ga}^{3+}$ a $\text{UO}_2^{2+}$ ionty

Kolona naplněná MA-BP sorbentem byla promyta 60 ml vody. Sorbent byl poté nasycen 60 ml 100 mM dusičnanu železitého obsahujícího 2 M octan amonný nebo 60 ml 100 mM dusičnanu galitého nebo 60 ml 150 mM uranyl octanu. K odstranění nenavázaných nebo slabě vázaných iontů byl sorbent promyt 60 ml vody a 60 ml 0,5 M NaCl.

Sycení kolony POROS MC20 bylo provedeno podle instrukcí výrobce. Kolona byla postupně promyta 35 ml vody, 35 ml 50 mM disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové ( $\text{EDTA-Na}_2$ ) obsahující 1 M NaCl a znovu 35 ml vody. Sorbent byl poté nasycen 50 ml 100 mM chloridu železitého nebo 50 ml 100 mM chloridu galitého nebo 50 ml 150 mM uranyl octanu a promyt 35 ml vody a 35 ml 0,5 M NaCl.

#### 3.3.2.3 Postup při IMAC

Obecný postup zahrnoval následující kroky:

- promytí adsorpčním pufrem
- aplikace vzorku (200  $\mu$ l)
- vymytí neadsorbovaných látek adsorpčním pufrem
- desorpce elučním pufrem (lineární gradient nebo izokraticky)

Byly použity následující roztoky a pufrы: 0,1% kyselina octová obsahující 0 – 1 M NaCl, 50 mM octanový pufr pH 4,0 – 6,0 obsahující 0 – 1 M NaCl nebo 0 – 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 200 mM fosforečnanový pufr pH 3,0, 4,0, 6,0 a 7,2, 25 mM Tris pufr pH 7,2,

50 mM MES pH 7,2, 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7, 50 mM EDTA-Na<sub>2</sub> obsahující 1 M NaCl. Průtoková rychlost byla 0,5 ml/min. Byly odebírány 0,5 ml frakce, v nichž byl stanoven obsah proteinu (viz kap. 3.3.6.1), případně proteolytická aktivita (viz kap. 3.3.6.2). Obsah proteinů stanovený v odebíraných frakcích byl použit k vypočtení výtěžku („recovery“). Výtěžek byl určen jako množství eluovaného proteinu vyjádřeného v procentech množství aplikovaného proteinu.

#### 3.3.2.4 Stanovení kapacity sorbentu pro prasečí pepsin A

Roztok pepsinu v 0,1% kyselině octové (1 mg/ml) byl aplikován na kolonu tak dlouho, než bylo dosaženo jejího úplného nasycení (proteolytická aktivita a koncentrace pepsinu v odebíraných frakcích vykazovaly konstantní hodnotu). Sorbent byl promyt 0,1% kyselinou octovou a pepsin byl eluován 200 mM fosforečnanovým pufrem pH 7,2. V eluátu byl stanoven obsah pepsinu (viz kap. 3.3.6.1). Kapacita byla vyjádřena v miligramech pepsinu adsorbovaného na 1 ml sorbentu.

### 3.3.3 Iontově výměnná chromatografie na HEMA-BIO 1000 DEAE

Supernatant získaný centrifugací homogenátu lidské žaludeční sliznice byl přefiltrován přes PTFE membránu s velikostí pórů 0,45  $\mu$ m. Aby došlo k aktivaci pepsinogenů na pepsiny, bylo pH homogenátu upraveno 1 M HCl na hodnotu 3 a roztok byl inkubován přes noc při 5 °C. Poté byl roztok dvakrát zředěn 20 mM octanovým pufrem pH 4,0. Takto upravený vzorek (10 ml) byl aplikován na kolonu HEMA-BIO 1000 DEAE.

Lyofilizát lidské žaludeční šťávy byl rozpuštěn v 20 mM octanovém pufru pH 4,0 a přefiltrován přes PTFE membránu s velikostí pórů 0,45  $\mu$ m. Takto připravený roztok (20 ml) byl aplikován na kolonu HEMA-BIO 1000 DEAE.

Kolona Bio-Spin (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) byla naplněna 0,5 ml sorbentu HEMA-BIO 1000 DEAE (Tessek, Praha, Česká republika) a byla postupně promyta 50 ml vody, 30 ml 20 mM octanového pufru pH 4,0, 30 ml 20 mM octanového pufru pH 4,0 obsahujícího 1 M NaCl a nakonec byla ekvilibrována 50 ml 20 mM octanového pufru pH 4,0. Poté byl na kolonu nanesen vzorek (10 ml aktivovaného homogenátu nebo 20 ml šťávy) a kolona byla promyta 20 ml 20 mM octanového pufru pH 4,0. Eluce pepsinů byla provedena 3 – 4 ml 20 mM octanového pufru pH 4,0 obsahujícího 1 M NaCl. Eluát byl dialyzován 1 × 2 hod proti vodě, 3 × 2 hod a 1 × 12 hod proti 10 mM HEPES pH 7,4.

### 3.3.4 Modifikace karboxylových skupin prasečího pepsinu A

#### 3.3.4.1 Amidace pepsinu s dimethylaminem, ethylaminem a isopropylaminem [159]

K roztoku pepsinu v 200 mM MES pH 5,5 (4 mg/6 ml) byl přidán přebytek dimethylamin hydrochloridu (0,24 mmol) nebo isopropylaminu (1,42 mmol) nebo ethylaminu (1,42 mmol). Po přidání 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (354  $\mu$ l) byl roztok zředěn vodou na 8 ml a inkubován 6 hod při 4 °C. Reakce byla ukončena přidáním 100 mM octanového pufru pH 5,0 (8 ml). Roztok pepsinu byl následně dialyzován 3  $\times$  2 hod a 1  $\times$  12 hod proti 0,1% kyselině octové při 4 °C. Výsledek modifikace pepsinu byl vyhodnocen pomocí MALDI-TOF MS.

#### 3.3.4.2 Esterifikace pepsinu HCl v methanolu [121]

K pepsinu (0.5 mg) byla přidána 4 M HCl v methanolu (1,5 ml) a směs byla inkubována 3 hod při 25 °C. Poté byl roztok pepsinu odpařen do sucha na vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn v 0,1% kyselině octové (2 ml). Výsledek modifikace pepsinu byl vyhodnocen pomocí MALDI-TOF MS.

#### 3.3.4.3 Esterifikace pepsinu diazomethanem [160, 161]

K roztoku pepsinu v 10 mM HEPES pH 7,4 (4 mg/4 ml) byl přidáván čerstvě připravený roztok diazomethanu v etheru (žlutý) tak dlouho, dokud docházelo k odbarvení etherového roztoku diazomethanu. Poté byla vodná fáze obsahující pepsin oddělena a dialyzována 3  $\times$  2 hod a 1  $\times$  12 hod proti 0,1% kyselině octové při 4 °C. Výsledek modifikace pepsinu byl vyhodnocen pomocí MALDI-TOF MS.

### 3.3.5 Defosforylace prasečího pepsinu A

Modifikovaná metoda popsaná Martinem a kol. [162] byla použita pro defosforylaci pepsinu. Roztok pepsinu v 10 mM octanovém pufru pH 5,5 obsahujícím 20 mM MgCl<sub>2</sub> (10 mg/10 ml) byl inkubován s kyselou fosfatázou z brambor (1 mg) 24 hod při 37 °C za neustálého míchání. Poté byl roztok dialyzován 3  $\times$  2 hod a 1  $\times$  12 hod proti 50 mM octanovému pufru pH 4,0.

### 3.3.6 Analytické metody

#### 3.3.6.1 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena BCA metodou [163]. Toto stanovení je založeno na reakci peptidové vazby s Cu<sup>2+</sup> ionty v alkalickém prostředí za vzniku Cu<sup>+</sup> iontů, které následně tvoří s BCA purpurově zbarvené komplexy. Pro sestavení kalibrační

přímky byly použity roztoky hovězího sérového albuminu o známé koncentraci (7,8 – 500  $\mu\text{g/ml}$ ).

Roztoky:

- roztok A: BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent A
- roztok B: 4% CuSO<sub>4</sub>
- roztok AB: směs roztoku A a roztoku B v poměru 50:1
- standardy: roztoky hovězího sérového albuminu o známé koncentraci

Provedení v mikrotitrační destičce (stanovení se provádí v duplikátu):

- do jamky se napipetuje 40  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu o známé koncentraci
- přidá se 200  $\mu\text{l}$  roztoku AB
- destička se promíchá na třepačce a inkubuje 30 min při 60 °C
- změří se absorbance při 540 nm

### 3.3.6.2 Stanovení proteolytické aktivity pepsinu

Proteolytická aktivita pepsinu byla stanovena modifikovanou metodou dle Ansona a Mirského [164]. Tato metoda je založena na štěpení hovězího hemoglobinu pepsinem za vzniku peptidů, jejichž množství je přímo úměrné aktivitě pepsinu a stanovuje se BCA metodou po vysrážení nerozštěpeného hemoglobinu a pepsinu trichloroctovou kyselinou (TCA). Proteolytická aktivita byla vyjádřena v jednotkách PU. 1 PU je takové množství enzymu, které přemění za 1 min při pH 2 a 37 °C takové množství hemoglobinu na peptidy, že uvolněné peptidy způsobí změnu absorbance  $\Delta A_{540}$  o 0,001, měřeno BCA metodou.

Roztoky:

- roztok hemoglobinu: 20 ml 2,5% roztoku hemoglobinu a 5 ml 0,3 M HCl
- 0,3 M TCA
- roztok AB: směs BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent A a 4% CuSO<sub>4</sub> v poměru 50:1

Provedení:

- 250  $\mu\text{l}$  roztoku hemoglobinu se napipetuje do mikrozkuřavky a roztok se nechá 10 min temperovat ve vodní lázni při 37 °C
- k roztoku se přidá 50  $\mu\text{l}$  vzorku
- přesně po 10 min se reakce zastaví 500  $\mu\text{l}$  0,3 M TCA
- po dalších 5 min se mikrozkuřavka vyndá z lázně a nechá se 15 min odstředovat na centrifuze rychlostí 12 000 otáček za min
- stanovení obsahu peptidů v supernatantu BCA metodou v mikrotitrační destičce (stanovení se provádí v duplikátu):
  - do jamky se napipetuje 20  $\mu\text{l}$  supernatantu
  - přidá se 200  $\mu\text{l}$  roztoku AB
  - destička se promíchá na třepačce a inkubuje 30 min při 60 °C

- změří se absorbance při 540 nm

### 3.3.6.3 Stanovení obsahu fosforu

Obsah fosforu v pepsinu byl stanoven pomocí „Phosphoprotein Phosphate Estimation Assay Kit“. Toto stanovení je založeno na alkalické hydrolyze fosfátových skupin ze serinových a threoninových zbytků fosfoproteinů a na kvantifikaci uvolněného fosfátu pomocí malachitové zeleně a molybdenanu amonného.

Roztoky:

- 2,0 M NaOH
- 4,7 M HCl
- fosfátový reagent: směs roztoku molybdenanu amonného a roztoku malachitové zeleně v poměru 1:3
- standardy: roztoky fosvitinu o známé koncentraci a známém množství fosforu

Provedení v mikrotitrační destičce (stanovení se provádí v triplicátu):

- do jamky se napipetuje 50  $\mu$ l vzorku nebo standardu o známé koncentraci a známém množství fosforu
- přidá se 50  $\mu$ l 2,0 M NaOH
- destička se promíchá na třepačce a inkubuje 30 min při 65 °C
- přidá se 50  $\mu$ l 4,7 M HCl a destička se promíchá
- přidá se 50  $\mu$ l fosfátového reagentu
- destička se promíchá a inkubuje 30 min při laboratorní teplotě
- změří se absorbance při 650 nm

## 3.4 Metody použité k analýze peptidů

### 3.4.1 Štěpení pepsinu $\alpha$ -chymotrypsinem

Roztoky:

- roztok A: 1,6 M hydrogenuhličitan amonný obsahující 7 M močovinu
- roztok B: 0,45 M dithiotreitol
- roztok C: 0,1 M jodacetamid
- $\alpha$ -chymotrypsin o koncentraci 1 mg/ml

Postup:

- do mikrozkušavky se napipetuje 500  $\mu$ l roztoku pepsinu o koncentraci 1 mg/ml a pH roztoku se upraví roztokem A na 7,5 – 8,0
- přidá se 10  $\mu$ l roztoku B, směs se zamíchá a inkubuje 25 min při 50 °C
- směs se nechá vychladnout na laboratorní teplotu
- přidá se 10  $\mu$ l roztoku C, směs se zamíchá a inkubuje 10 min při laboratorní

teplotě

- do směsi se přidá 50  $\mu$ l roztoku  $\alpha$ -chymotrypsinu o koncentraci 1 mg/ml (poměr pepsin :  $\alpha$ -chymotrypsin je 10:1) a směs se inkubuje za stálého míchání 18 hod při 37 °C
- reakce je ukončena okyselením roztoku na pH 4 TFA

Slepý pokus byl proveden úplně stejným způsobem, pouze místo pepsinu byl použit samotný pufr; takto byly získány autolytické štěpy  $\alpha$ -chymotrypsinu.

### 3.4.2 Přečištění a odsolení peptidů na špičkách s C18 fází

Označení špiček: PerfectPure C18 Tip

Roztoky:

- roztok A: 50% ACN
- roztok B: 0,1% TFA
- roztok C: 0,1% TFA obsahující 50% ACN

Postup – špička se postupně promyje:

- 10  $\times$  10  $\mu$ l roztoku A
- 10  $\times$  10  $\mu$ l roztoku B
- 10  $\times$  10  $\mu$ l vzorku
- 10  $\times$  10  $\mu$ l roztoku B
- 1  $\times$  4  $\mu$ l roztoku C (eluce)

Eluát byl podroben MALDI-TOF/TOF MS analýze.

### 3.4.3 Izolace fosfopeptidů na špičkách s TiO<sub>2</sub>

Označení špiček: TopTip TiO<sub>2</sub>

Roztoky:

- adsorpční roztok: 5% TFA obsahující 80% ACN
- eluční roztoky: 5 mM amoniak pH 10,5; 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9

Postup – špička se postupně promyje:

- 10  $\times$  10  $\mu$ l adsorpčního roztoku
- 10  $\times$  10  $\mu$ l vzorku (proteiny rozštěpené  $\alpha$ -chymotrypsinem)
- 10  $\times$  10  $\mu$ l adsorpčního roztoku
- eluce: 3  $\times$  5  $\mu$ l elučního roztoku

Eluáty byly podrobeny MALDI-TOF/TOF MS analýze.

### 3.4.4 Izolace fosfopeptidů na špičkách se sorbenty obsahujícími imobilizované $\text{Fe}^{3+}$ nebo $\text{Ga}^{3+}$ ionty

Označení špiček: TopTip IMAC ( $\text{Ga}^{3+}$ ) a TopTip IMAC ( $\text{Fe}^{3+}$ )

Roztoky:

- adsorpční roztoky: 0,1% kyselina octová; 0,1% kyselina octová obsahující 1 M NaCl
- eluční roztoky: 5 mM amoniak pH 10,5; 200 mM fosforečnanový pufr ( $\text{Na}^+$ ) pH 7,2; 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9

Postup – špička se postupně promyje:

- $5 \times 20 \mu\text{l}$  adsorpčního roztoku
- $5 \times 20 \mu\text{l}$  vzorku (proteiny rozštěpené  $\alpha$ -chymotrypsinem)
- $5 \times 20 \mu\text{l}$  adsorpčního roztoku
- eluce:  $3 \times 5 \mu\text{l}$  elučního roztoku

Eluáty byly podrobeny MALDI-TOF/TOF MS analýze.

### 3.4.5 Izolace fosfopeptidů na HPLC sorbentu obsahujícím imobilizované $\text{Fe}^{3+}$ ionty

Označení kolony: POROS MC20- $\text{Fe}^{3+}$

Roztoky:

- adsorpční roztok: 0,1% kyselina octová
- eluční roztoky: 5 mM amoniak, pH 10,5; 200 mM fosforečnanový pufr ( $\text{Na}^+$ ) pH 7,2; 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9

Postup:

- ekvilibrace HPLC kolony adsorpčním roztokem
- aplikace  $200 \mu\text{l}$  vzorku (proteiny rozštěpené  $\alpha$ -chymotrypsinem)
- promytí kolony adsorpčním roztokem (20 min)
- eluce elučním roztokem či roztoky (15 – 20 min)
- průtoková rychlost: 0,5 ml/min
- odebírány 0,5 ml frakce

Eluáty byly podrobeny MALDI-TOF/TOF MS analýze.\*

\*Po eluci fosforečnanovým pufrům byly frakce nejprve odsoleny na špičkách s C18 fází a pak analyzovány MALDI-TOF/TOF MS

## 3.5 MALDI-TOF a MALDI-TOF/TOF MS

MALDI-TOF a MALDI-TOF/TOF spektra byla naměřena v pozitivním módu na hmotnostním spektrometru Autoflex II TOF/TOF, který byl vybaven dusíkovým laserem (337 nm) a FlexControl softwarem.

### 3.5.1 Nanesení vzorků na MALDI terčíky

#### 3.5.1.1 Analýza fosfopeptidů (eluáty ze špiček s imobilizovanými $\text{Fe}^{3+}$ nebo $\text{Ga}^{3+}$ ionty, z HPLC kolony s imobilizovanými $\text{Fe}^{3+}$ ionty a ze špiček s $\text{TiO}_2$ )

0,5  $\mu\text{l}$  roztoku matrice (5 mg kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové / 1 ml 1% kyseliny fosforečné obsahující 30% ACN) bylo napipetováno na AnchorChip terčík a bylo ponecháno na vzduchu zaschnout, pak bylo přidáno 0,5  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu a roztok byl opět nechán na vzduchu zaschnout. Terčík byl vložen do hmotnostního spektrometru a peptidy byly podrobeny MS a MS/MS analýze.

#### 3.5.1.2 Analýza peptidů (eluáty ze špiček s C18 fází)

0,5  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu bylo napipetováno na standardní ocelový terčík a bylo ponecháno na vzduchu zaschnout, pak bylo přidáno 0,5  $\mu\text{l}$  roztoku matrice (1 ml ACN + 1 ml 1% kyseliny octové + 1 ml (3 mg kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxysořicové / 1 ml 2% TFA obsahující 50% ACN)) a roztok byl opět nechán na vzduchu zaschnout. Terčík byl vložen do hmotnostního spektrometru a peptidy byly podrobeny MS, případně MS/MS analýze.

#### 3.5.1.3 Analýza proteinů a modifikovaných proteinů

1  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu byl smíchán s 1  $\mu\text{l}$  2% TFA a 1  $\mu\text{l}$  roztoku matrice (7,6 mg 2,5-dihydroxyacetofenonu / 0,5 ml 20 mM hydrogencitrátu amonného obsahujícího 75% ethanol). Ze směsi byl 1  $\mu\text{l}$  napipetován na AnchorChip terčík a byl nechán na vzduchu zaschnout. Terčík byl vložen do hmotnostního spektrometru a proteiny byly podrobeny MS analýze.

### 3.5.2 MS a MS/MS analýza peptidů a fosfopeptidů

Hmotnostní spektrometr byl před analýzou vzorků externě kalibrován pomocí standardu „Peptide Calibration Standard“, který obsahoval angiotensin II, angiotensin I, substanci P, bombesin, ACTH (1-17), ACTH (18-39) a somatostatin 28. Po kalibraci byly vzorky peptidů a fosfopeptidů nejprve podrobeny MS analýze. Ze získaných MALDI-TOF spekter byly vybrány nejintenzivnější píky a ty byly podrobeny MS/MS analýze.



### 3.5.3 MS analýza proteinů

Hmotnostní spektrometr byl před analýzou proteinových vzorků externě kalibrován pomocí standardu „Protein Calibration Standard I“, který obsahoval insulin, ubikvitin I, cytochrom C a myoglobin. Po kalibraci byly vzorky podrobeny MS analýze.

### 3.5.4 Identifikace peptidů

Programy FlexAnalysis a BioTools (Bruker Daltonics, Bremen, Německo) spolu s vyhledávacím programem Mascot (Matrix Sciences, Londýn, UK) a databází Swiss-Prot (SIB, Ženeva, Švýcarsko) byly použity k identifikaci peptidů z naměřených MALDI-TOF a MALDI-TOF/TOF spekter. Byly použity následující vyhledávací parametry: tolerance hmotnosti peptidu – 150 ppm a tandemová tolerance hmotnosti – 0,7 Da, enzym – chymotrypsin, „missed cleavage“ – 5.

## 4. Výsledky a diskuze

V první části práce jsme se zabývali metodami umožňujícími separaci fosforylovaného proteinu. V další části práce jsme věnovali pozornost metodám separace fosfopeptidů po proteolytickém štěpení studovaného fosfoproteinu. Použití těchto metod umožňuje nejenom určení stupně fosforylace proteinu, ale i identifikaci fosforylačních míst.

V naší práci jsme používali pro vypracování vhodných postupů modelové fosfoproteiny (prasečí pepsin A a kuřecí ovalbumin), u kterých je znám počet fosfátových skupin i místa fosforylace. Vypracované metody jsme pak použili pro separaci a charakterizaci různých forem lidských pepsinů. Pro selektivní separaci fosfoproteinů a fosfopeptidů jsme zvolili afinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech (IMAC). Pro separaci fosfopeptidů byla použita také afinitní chromatografie na oxidu titaničitém. Pro identifikaci fosforylačních míst jsme využili tandemové hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF/TOF MS).

### 4.1 HP-IMAC fosfoproteinů

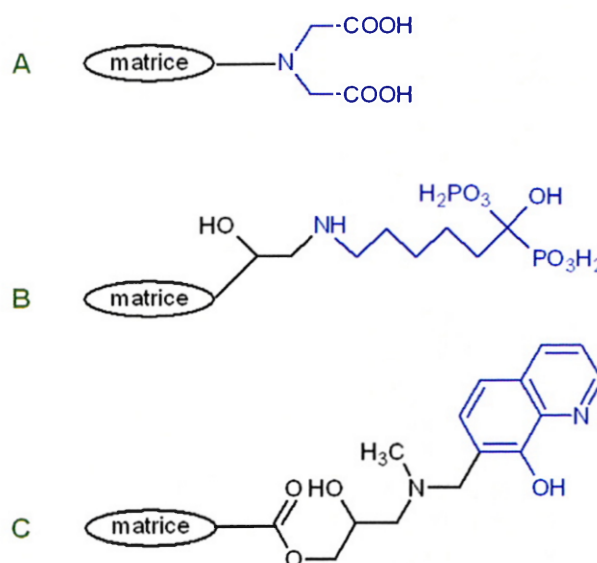
Cílem této části práce bylo porovnat schopnosti několika HP-IMAC sorbentů separovat intaktní fosfoproteiny za podmínek HPLC. Tyto sorbenty se lišily typem matrice a chelátového ligandu i imobilizovanými kovovými ionty. Byly testovány matrice na bázi poly(glycidyl methakrylát-*co*-ethylen dimethakrylátu) a poly(styren-*co*-divinylbenzenu) obsahující následující kovalentně vázané chelátové ligandy: (6-amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl) bisfosfonovou kyselinu (BP), iminodioctovou kyselinu (IDA) a 8-hydroxychinolin (HQ). Na tyto ligandy pak byly imobilizovány železité, galité nebo uranylové ionty.

Aplikovatelnost vybraných HP-IMAC sorbentů v separaci a analýze fosfoproteinů byla testována na dvou modelových fosfoproteinech – prasečím pepsinu A a kuřecím ovalbuminu. Prasečí pepsin A obsahuje ve své molekule jednu fosfátovou skupinu vázanou na serinový zbytek [61] a jeho izoelektrický bod je nižší než jedna [51, 58]. Naproti tomu ovalbumin obsahuje ve své molekule dvě fosfátové skupiny vázané na serinové zbytky [165] a jeho izoelektrický bod je 4,6 [166].

### 4.1.1 Výběr sorbentů pro HP-IMAC fosfoproteinů

Pro separaci fosfoproteinů byly vybrány následující matrice s kovalentně vázanými chelátovými ligandy (obr. 4.1), které bylo možné použít za podmínek HPLC:

- POROS MC20 – sorbent na bázi poly(styren-*co*-divinylbenzenu) obsahující vázanou iminodioctovou kyselinu (IDA)
- MA-BP – sorbent na bázi poly(glycidyl methakrylát-*co*-ethylen dimethakrylátu) obsahující vázanou (6-amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl) bisfosfonovou kyselinu (BP)
- MA-HQ – sorbent na bázi poly(glycidyl methakrylát-*co*-ethylen dimethakrylátu) obsahující vázaný 8-hydroxychinolin (HQ)



**Obr. 4.1:** Schématické znázornění polymerních sorbentů vybraných pro imobilizaci kovových iontů

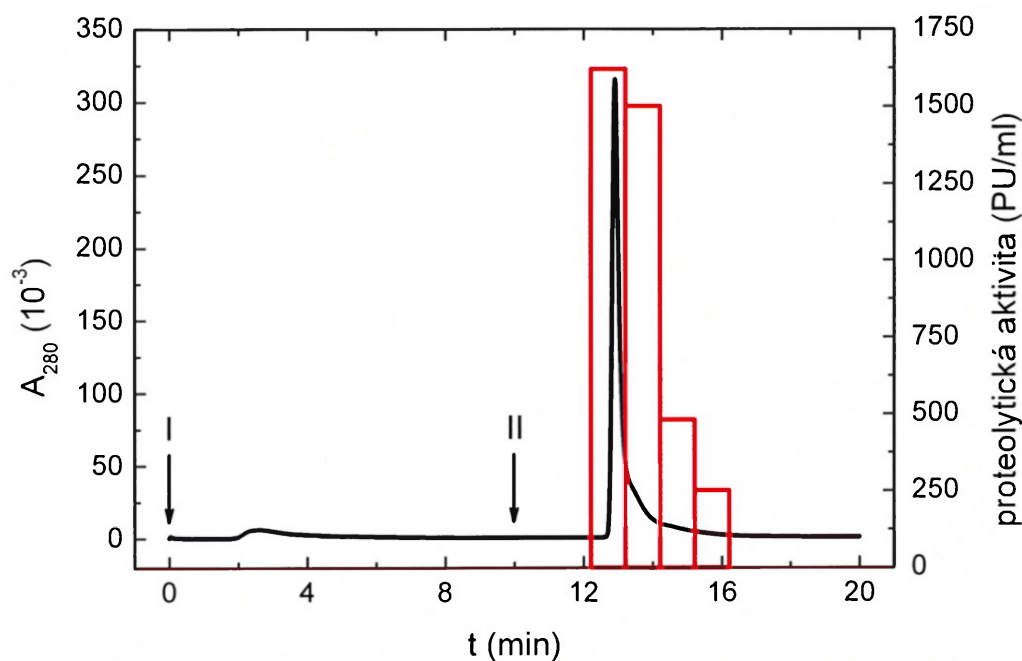
(A) POROS MC20 obsahující vázanou iminodioctovou kyselinu (IDA), (B) MA-BP obsahující vázanou (6-amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl) bisfosfonovou kyselinu (BP) a (C) sorbent MA-HQ obsahující vázaný 8-hydroxychinolin (HQ). Ligandy IDA, BP a HQ jsou označeny modře.

#### 4.1.1.1 Vliv matrice a chelátového ligandu na adsorpci prasečího pepsinu A

V prvních experimentech byla testována možná interakce prasečího pepsinu A s chelátovými ligandy vázanými na inertní matrice bez přítomnosti imobilizovaných kovových iontů. Bylo zjištěno, že za kyselých adsorpčních podmínek (0,1% kyselina octová nebo 50 mM octanový pufr pH 4,0) se na sorbenty obsahující BP a IDA adsorbovalo jen malé množství aplikovaného pepsinu (10%, respektive 15%), které se ještě nepatrně snížilo se zvýšením iontové síly (0,1% kyselina octová obsahující 1 M NaCl nebo 50 mM

octanový pufr pH 4,0 obsahující 1 M NaCl). Naproti tomu na sorbentu obsahujícím HQ byla za kyselých adsorpčních podmínek (50 mM octanový pufr pH 3,5 nebo 4,0) pozorována téměř kompletní adsorpce pepsinu.

Odlišnému chování pepsinu na sorbentu obsahujícím 8-hydroxychinolin byla věnována větší pozornost. Bylo zjištěno, že adsorpce pepsinu na tomto sorbentu se mírně zvyšuje se zvyšujícím se pH. K úplné adsorpci aplikovaného pepsinu došlo při nízké iontové síle a pH 5,5 – 6,0 nezávisle na složení adsorpčního pufru (50 mM octanový nebo 50 mM fosforečnanový pufr). Kompletní desorpce bylo dosaženo zvýšením iontové síly adsorpčního pufru (1 M NaCl) (obr. 4.2). Adsorbovaný prasečí pepsin A bylo možné eluovat také adsorpčním pufrům obsahujícím 20 mM N-acetyl-L-fenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosin, který se používá jako substrát specifický pro pepsin A.



**Obr. 4.2:** Chromatografie prasečího pepsinu A na sorbentu MA-HQ

Černě – absorbance při 280 nm; červeně – proteolytická aktivita; aplikováno 250  $\mu$ l roztoku prasečího pepsinu A (1,5 mg/ml 50 mM octanového pufru pH 6,0); I – 50 mM octanový pufr pH 6,0; II – 50 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 1 M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min.

Vzhledem k vysoké adsorpci prasečího pepsinu A na MA-HQ sorbent v nepřítomnosti kovových iontů byly pro imobilizaci kovových iontů vybrány pouze sorbenty obsahující BP (MA-BP) a IDA (POROS MC20).

#### 4.1.1.2 HP-IMAC sorbenty

Pro separaci fosfoproteinů byly použity HP-IMAC sorbenty, jejichž složení a používané označení je uvedeno v tab. 4.1. Tyto sorbenty byly připraveny imobilizací železitých, galitých a uranylových iontů na chelátové ligandy vázané na inertní matici. Pro imobilizaci kovových iontů byly vybrány následující dva chelátové ligandy: IDA (POROS MC20), běžně používaná při afinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech, a BP (MA-BP).

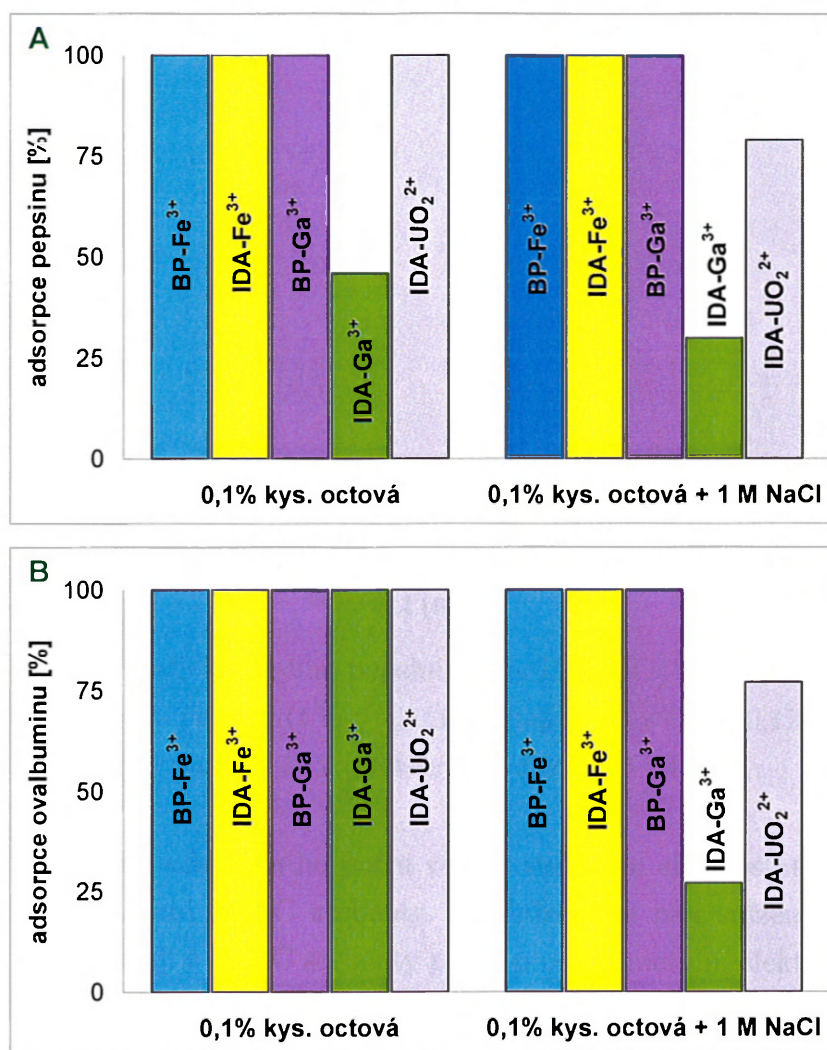
Tab. 4.1: Složení použitých HP-IMAC sorbentů

	Matrice	Ligand	Kovový ion	Označení
BP-MA	poly(glycidyl methakrylát- <i>co</i> -ethylen dimethakrylát)	(6-amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl) bis(fosfonová kyselina) (BP)	Fe <sup>3+</sup>	BP-Fe <sup>3+</sup>
			Ga <sup>3+</sup>	BP-Ga <sup>3+</sup>
			UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	BP-UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>
POROS MC20	poly(styren- <i>co</i> -divinylbenzen)	iminodioctová kyselina (IDA)	Fe <sup>3+</sup>	IDA-Fe <sup>3+</sup>
			Ga <sup>3+</sup>	IDA-Ga <sup>3+</sup>
			UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	IDA-UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>

V literatuře je uvedeno, že u nízko- a střednětlakých IMAC sorbentů bylo pozorováno vymývání imobilizovaných kovových iontů; tyto sorbenty vykazovaly až 4% ztrátu kovových iontů v jednom chromatografickém cyklu [167]. Naproti tomu námi používané HP-IMAC sorbenty vázaly železité, galité a uranylové ionty dostatečně pevně; v průběhu chromatografií nebylo pozorováno jejich uvolňování. Jedinou výjimku představoval MA-BP sorbent s imobilizovanými uranylovými ionty, které se z tohoto sorbentu uvolňovaly. Proto nebyl tento sorbent dále používán.

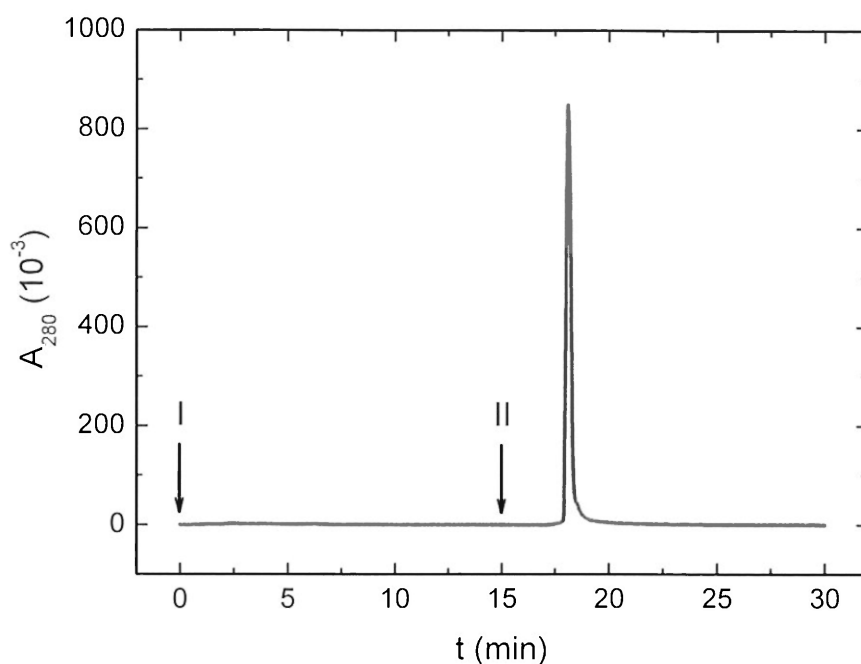
#### 4.1.2 IMAC modelových fosfoproteinů

Připravené HP-IMAC sorbenty byly porovnány s ohledem na jejich schopnost adsorbovat modelové fosfoproteiny – kuřecí ovalbumin a prasečí pepsin A. Oba proteiny byly na připravených IMAC sorbentech s výjimkou IDA-Ga<sup>3+</sup> kompletně adsorbovány v kyselé oblasti pH (50 mM octanový pufr pH 4,0 nebo 0,1% kyselina octová) a při nízké iontové síle (obr. 4.3), obdobně, jak bylo popsáno v literatuře [89, 105, 106]. Chování proteinů na IMAC sorbentech za těchto podmínek je ukázáno na obr. 4.4; obdobné chromatogramy byly získány na všech použitých sorbentech. Zvýšení iontové síly adsorpčního pufru (50 mM octanový pufr pH 4,0 obsahující 1 M NaCl nebo 0,1% kyselina octová pH 3,2 obsahující 1 M NaCl) nemělo vliv na adsorpci proteinů na BP-Fe<sup>3+</sup>, IDA-Fe<sup>3+</sup> a BP-Ga<sup>3+</sup> sorbentech, ale způsobilo pokles jejich adsorpce na IDA-UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> a IDA-Ga<sup>3+</sup> sorbentech (obr. 4.3).



Obr. 4.3: Adsorpce prasečího pepsinu A (A) a kuřecího ovalbuminu (B) na IMAC sorbentech s imobilizovanými Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup> a UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> ionty

Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu$ l roztoku proteinu (1 mg/ml adsorpčního roztoku); adsorpční roztok – 0,1% kyselina octová nebo 0,1% kyselina octová obsahující 1 M NaCl; průtoková rychlost 0,5 ml/min. Osa y: množství adsorbovaného proteinu vyjádřené v procentech množství aplikovaného proteinu.



Obr. 4.4: Chromatografie prasečího pepsinu A na IDA- $\text{UO}_2^+$  sorbentu  
Aplikováno 200  $\mu\text{l}$  roztoku pepsinu (1 mg/ml 0,1% kyseliny octové); I – 0,1% kyselina octová;  
II – 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7; průtoková rychlost 0,5 ml/min.

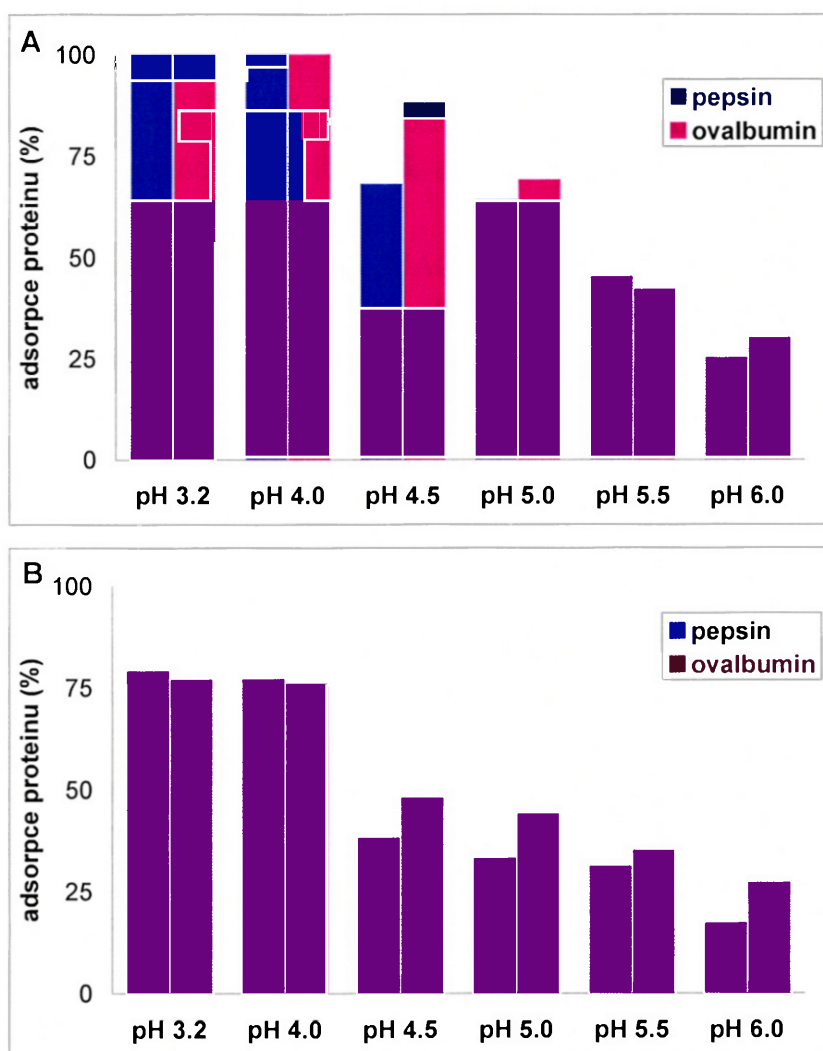
Zvýšení iontové síly adsorpčního pufru vede k zeslabení elektrostatických interakcí mezi proteiny a nabitými IMAC sorbenty. Důsledkem je pak snížení adsorpce těch proteinů, které interagují s IMAC sorbenty právě prostřednictvím elektrostatických interakcí. V případě našich sorbentů došlo k poklesu adsorpce proteinů na IDA- $\text{UO}_2^+$  a IDA- $\text{Ga}^{3+}$  sorbentech. Na adsorpci proteinů na těchto sorbentech se tedy pravděpodobně podílejí elektrostatické interakce. Obdobné výsledky byly zjištěny i v případě adsorpce sérových proteinů na chelatovaných  $\text{Ga}^{3+}$  a  $\text{Al}^{3+}$  iontech [168], jejich adsorpce se také v nízkém pH snižovala se zvyšující se iontovou silou.

Naproti tomu adsorpce pepsinu a ovalbuminu na IDA- $\text{Fe}^{3+}$ , BP- $\text{Fe}^{3+}$  a BP- $\text{Ga}^{3+}$  sorbentech nebyla v nízkém pH adsorpčního pufru ovlivněna přítomností 1 M NaCl; adsorpce tedy pravděpodobně nebyla založena na elektrostatických interakcích. K podobnému závěru dospěla i Muzsynska a kol. [110] v případě adsorpce fosfopeptidů a  $\beta$ -kaseinu na chelatovaných  $\text{Fe}^{3+}$  iontech, která nebyla ovlivněna přítomností 1 M NaCl v adsorpčním pufru. Obdobné výsledky byly získány i v případě zkoumání vlivu iontové síly na adsorpci ovalbuminu [107], fosvitinu [108] a dalších fosfopeptidů [117] na chelatovaných  $\text{Fe}^{3+}$  iontech. Porathova skupina [107, 110] vysvětluje adsorpci fosforylovaných proteinů a peptidů na chelatovaných železitých iontech tvorbou komplexu mezi fosfátovými skupinami proteinů a chelatovanými železitémi ionty; dva kyslíkové atomy fosfátové skupiny jsou donory elektroného páru a železitý ion funguje jako akceptor



elektroných párů.

Zkoumali jsme také vliv pH na adsorpci proteinů. Zatímco vzrůst pH na 6,0 měl za následek pokles adsorpce proteinů na IDA-Ga<sup>3+</sup> a IDA-UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> sorbentech (obr. 4.5), změna pH neovlivnila adsorpci proteinů na BP-Fe<sup>3+</sup>, IDA-Fe<sup>3+</sup> a BP-Ga<sup>3+</sup> sorbentech. Další zvýšení pH vedlo k poklesu adsorpce i na těchto sorbentech. Snížená adsorpce na chelatovaných železitých a galitých iontech při vyšším pH byla pozorována i v případě jiných fosfoproteinů a fosfopeptidů [107, 118, 119].



**Obr. 4.5:** Adsorpce prasečího pepsinu A a kuřecího ovalbuminu na IDA-UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> sorbentu za různých chromatografických podmínek

Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu$ l roztoku proteinu (1 mg/ml adsorpčního roztoku); adsorpční roztok – 0,1% kyselina octová nebo 50 mM octanový pufr pH 4,0 – 6,0 neobsahující NaCl (A) nebo obsahující 1 M NaCl (B); eluční pufr – 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7; průtoková rychlost 0,5 ml/min. Osa y: množství adsorbovaného proteinu vyjádřené v procentech množství aplikovaného proteinu.



Retence proteinů a peptidů na IMAC sorbentech může být ovlivňována také charakterem chelátového ligandu, jak bylo ukázáno na následujících příkladech. Neville a kol. [122] a Cirulli a kol. [124] zjistili, že složení peptidů adsorbovaných na železité ionty imobilizované prostřednictvím IDA se liší od složení peptidů adsorbovaných na železité ionty imobilizované pomocí nitrilotrioctové kyseliny. Obdobně Collins a kol. [169] pozoroval, že adsorpce fosfoproteinů na železitých a galitých iontech imobilizovaných přes IDA se liší od adsorpce fosfoproteinů na železitých a galitých iontech imobilizovaných přes nitrilotrioctovou kyselinu. V naší práci jsme použily dva typy chelátových ligandů: IDA, používanou v řadě studiích (např. [124, 170]), a nový ligand BP. Porovnáním výsledků se ukázalo, že oba proteiny byly silněji adsorbovány na IMAC sorbenty obsahující železité a galité ionty imobilizované pomocí BP než na ty obsahující železité a galité ionty imobilizované pomocí IDA. K jejich desorpci stačily mírnější eluční podmínky (viz dále).

Desorpce pepsinu a ovalbuminu z IMAC sorbentů byla provedena několika způsoby: specificky fosfátovými ionty (kompetitivní látky), nespecificky zvýšením pH a také chelatačním činidlem (disodnou solí kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA-Na<sub>2</sub>)). V tab. 4.2 je shrnuto, které eluční pufrы desorbovaly proteiny z jednotlivých IMAC sorbentů.

**Eluce roztoky obsahujícími fosfátové ionty.** Z tab. 4.2 vyplývá, že desorpce pepsinu a ovalbuminu ze sorbentů obsahujících IDA lze dosáhnout za mírnějších podmínek než ze sorbentů obsahujících BP. Například zatímco z IDA-Ga<sup>3+</sup> sorbentu byly oba proteiny desorbovány pouhým přidáním dihydrogenfosforečnanu sodného do adsorpčního pufru, aniž by se změnilo pH pufru, k desorpci z BP-Ga<sup>3+</sup> sorbentu bylo třeba použít fosforečnanového pufru a zároveň zvýšit pH. Obdobně k desorpci pepsinu a ovalbuminu z IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu stačila přítomnost fosfátových iontů v adsorpčním pufru, zatímco pro desorpci pepsinu z BP-Fe<sup>3+</sup> sorbentu byl nezbytný fosforečnanový pufr o pH nejméně 6. Navíc ovalbumin byl na BP-Fe<sup>3+</sup> sorbent vázán natolik pevně, že k jeho desorpci bylo nutné použít EDTA-Na<sub>2</sub>. K desorpci proteinů z IDA-UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> sorbentu nebylo možné použít roztoky obsahující fosfátové ionty, protože UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> ionty tvoří s fosfátovými ionty nerozpustné produkty.

Už Trojer a kol. [127] ve své práci ukázal, že desorpce fosfopeptidů z IMAC sorbentů může být závislá na pH fosforečnanového pufru. Zjistil, že se zvyšujícím se pH fosforečnanového pufru se zvyšuje množství desorbovaných fosfopeptidů. Toto pozorování si vysvětluje deprotonací fosfátových iontů při vyšších pH, případně vytěsňováním fosfopeptidů OH<sup>-</sup> ionty, které jsou hojnější při vyšších pH (bazická eluce). Ve většině dalších prací se pro desorpci fosfopeptidů a fosfoproteinů z IMAC sorbentů obsahujících železité a galité ionty používají fosforečnanové pufrы o pH 7 – 9 [117–119, 171, 172].

**Eluce vzrůstem pH.** Jak je patrné z tab. 4.2, pepsin i ovalbumin byly z pou-

**Tab. 4.2:** Desorpce prasečího pepsinu A a kuřecího ovalbuminu z IMAC sorbentů s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  a  $\text{UO}_2^{2+}$  ionty

Eluční pufr	IDA- $\text{Fe}^{3+}$	BP- $\text{Fe}^{3+}$	IDA- $\text{Ga}^{3+}$	BP- $\text{Ga}^{3+}$	IDA- $\text{UO}_2^{2+}$
adsorpční pufr obsahující 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	+ / +	- / -	+ / +	- / -	N
gradient 0 – 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ v adsorpčním pufru	+ / +	- / -	+ / +	- / -	N
200 mM fosforečnanový roztok pH 3,0	+ / +	- / -	+ / +	- / -	N
200 mM fosforečnanový roztok pH 4,0	+ / +	- / -	+ / +	- / -	N
200 mM fosforečnanový pufr pH 6,0	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	N
200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	N
50 mM MES pH 7,2	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +
25 mM Tris-HCl pH 7,2	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +
200 mM uhličitanový pufr pH 10,7	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +
50 mM EDTA- $\text{Na}_2$ obsahující 1 M NaCl	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +

modře: desorpce pepsinu; červeně: desorpce ovalbuminu; + desorbováno; - nedesorbováno; N: roztoky obsahující fosfátové ionty tvoří s  $\text{UO}_2^{2+}$  ionty nerozpustné produkty, proto tyto roztoky nemohly být použity pro desorpci proteinů z IDA- $\text{UO}_2^{2+}$  sorbentu

žitých sorbentů (IDA-Fe<sup>3+</sup>, IDA-Ga<sup>3+</sup>, IDA-UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>, BP-Fe<sup>3+</sup> a BP-Ga<sup>3+</sup>) desorbovány také vzrůstem pH a to i za nepřítomnosti fosfátových iontů v elučním pufru. Jedinou výjimku reprezentoval ovalbumin adsorbovaný na BP-Fe<sup>3+</sup> sorbent; ten se nepodařilo desorbovat ani puftrem o pH 10,7. K podobným výsledkům dospěla i Muzsynska a kol. [110], která zjistila, že některé fosforylované proteiny (fosforylovaný protamin) a peptidy lze desorbovat z chelátovaných Fe<sup>3+</sup> iontů zvýšením pH, zatímco jiné ( $\beta$ -kasein) ne. Desorpce zvýšením pH je přesto jedním z nejčastějších způsobů desorpce fosfopeptidů a fosfoproteinů z IMAC sorbentů obsahujících železité a galité ionty, zvláště pokud jsou desorbované proteiny a peptidy detegovány hmotnostní spektrometrií [122–124, 132].

**Eluce roztokem disodné soli EDTA.** Jak je patrné z tab. 4.2, roztok EDTA-Na<sub>2</sub> kompletně desorboval pepsin i ovalbumin ze všech studovaných sorbentů. Protože se jedná o chelatační činidlo, byly spolu s proteiny z IMAC kolon odstraněny také kovové ionty, a proto bylo nutné po každé provedené chromatografii sorbent znovu nasytit kovovými ionty. Jak vyplývá z dalších studií, roztokem EDTA-Na<sub>2</sub> lze úspěšně desorbovat fosfopeptidy i z jiných IMAC sorbentů obsahujících železité a galité ionty [169, 173, 174].

**Tab. 4.3:** HP-IMAC prasečího pepsinu A a kuřecího ovalbuminu: podmínky adsorpce a desorpce

IMAC sorbent	Adsorpce	Desorpce
BP-Fe <sup>3+</sup>	50 mM octanový pufr pH 4,0 obsahující 0 – 1 M NaCl; 0,1% kyselina octová obsahující 0 – 1 M NaCl	50 mM EDTA-Na <sub>2</sub> obsahující 1 M NaCl
IDA-Fe <sup>3+</sup>	50 mM octanový pufr pH 4,0 obsahující 0 – 1 M NaCl; 0,1% kyselina octová obsahující 0 – 1 M NaCl	200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2
BP-Ga <sup>3+</sup>	50 mM octanový pufr pH 4,0 obsahující 0 – 1 M NaCl; 0,1% kyselina octová obsahující 0 – 1 M NaCl	200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2
IDA-Ga <sup>3+</sup>	50 mM octanový pufr pH 4,0; 0,1% kyselina octová	200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2
BP-UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	NP	NP
IDA-UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	50 mM octanový pufr pH 4,0; 0,1% kyselina octová	200 mM uhličitanový pufr pH 10,7

NP – BP-UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> sorbent nelze použít v důsledku vymývání UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> iontů

Interakce pepsinu a ovalbuminu s imobilizovanými kovovými ionty (železitými, galitými a uranylovými) se významně nelišily, ačkoliv malé rozdíly v optimálních podmínkách pro adsorpci a desorpci jednotlivých proteinů byly pozorovány. Chromatografické podmínky pro kompletní adsorpci a desorpci obou proteinů na zkoumaných IMAC sorbentech jsou shrnuty v tab. 4.3.

Chromatografické charakteristiky IMAC sorbentů obsahujících imobilizované  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  a  $\text{UO}_2^{2+}$  ionty byly stanoveny za podmínek uvedených v tab. 4.3 a jsou porovnány v tab. 4.4. Použité IMAC sorbenty byly charakterizovány vysokou reprodukovatelností (RSD kolem 1%) a vysokým výtěžkem proteinů (88 – 100%). Sorbenty s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty vykazaly vyšší kapacitu než sorbent obsahující imobilizované  $\text{UO}_2^{2+}$  ionty. Na sorbentech BP- $\text{Ga}^{3+}$  a IDA- $\text{Fe}^{3+}$  byla zkoumána i závislost plochy elučního píku na koncentraci aplikovaného prasečího pepsinu A. Bylo zjištěno, že je lineární v rozmezí koncentrací 20 – 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $R^2 = 0,9981$ ) pro sorbent BP- $\text{Ga}^{3+}$  a 30 – 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $R^2 = 0,9990$ ) pro sorbent IDA- $\text{Fe}^{3+}$ .

**Tab. 4.4:** Chromatografické charakteristiky HP-IMAC sorbentů obsahujících imobilizované  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$  a  $\text{UO}_2^{2+}$  ionty

IMAC sorbent	Kapacita	Výtěžek (%)		Reprodukovatelnost	
	(mg/ml)	pepsin	ovalbumin	pepsin	ovalbumin
BP- $\text{Fe}^{3+}$	2,4	88	×	1,3	×
IDA- $\text{Fe}^{3+}$	2,4	95	100	0,8	1,3
BP- $\text{Ga}^{3+}$	2,2	100	100	1,2	2,0
IDA- $\text{Ga}^{3+}$	×*	46*	95	0,7	0,8
BP- $\text{UO}_2^{2+}$	NP	NP	NP	NP	NP
IDA- $\text{UO}_2^{2+}$	0,6	100	98	1,0	1,3

× nebylo stanoveno

\* pepsin byl pouze částečně adsorbován

Reprodukovatelnost – vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) plochy elučního píku, která byla stanovena v deseti identických experimentech. Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu\text{l}$  roztoku proteinu (1 mg/ml adsorpčního roztoku); adsorpční roztok – 0.1% kyselina octová nebo 50 mM octanový pufr pH 4,0; eluční pufr – 200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2 nebo v případě IDA- $\text{UO}_2^{2+}$  sorbentu 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7.

Všechny sorbenty také prokázaly poměrně dlouhou životnost. Sorbenty BP- $\text{Fe}^{3+}$  a BP- $\text{Ga}^{3+}$  byly používány téměř tři roky než došlo k jejich poškození a na každém z nich bylo provedeno kolem dvou set experimentů. Obdobný počet experimentů byl proveden během dvou let i na každém ze sorbentů IDA- $\text{Fe}^{3+}$ , IDA- $\text{Ga}^{3+}$  a IDA- $\text{UO}_2^{2+}$ , aniž by došlo k viditelné změně v chromatografickém chování proteinů.

### 4.1.3 Shrnutí

Provedené pokusy ukázaly, že všechny testované sorbenty s výjimkou BP- $\text{UO}_2^{2+}$  mohou být použity pro HP-IMAC fosfoproteinů. Síla interakce mezi jednotlivými IMAC sorbenty a modelovými proteiny (pepsin a ovalbumin) se ale lišila. BP- $\text{Fe}^{3+}$  sorbent interagoval s proteiny velmi silně a pro jejich desorpci byla nutná EDTA- $\text{Na}_2$ . Naproti tomu IDA- $\text{Ga}^{3+}$  sorbent interagoval s pepsinem jen slabě; byla pozorována nekompletní adsorpce pepsinu na tomto sorbentu. IDA- $\text{UO}_2^{2+}$  také neinteragoval se sorbenty příliš silně a navíc vykazoval nižší kapacitu. Proto byly pro adsorpci a desorpci studovaných fosfoproteinů jako nejvhodnější sorbenty vyhodnoceny IDA- $\text{Fe}^{3+}$  a BP- $\text{Ga}^{3+}$ .

## 4.2 Separace fosforylované a nefosforylované formy pepsinu

Cílem této části práce bylo vypracovat jednoduchou IMAC metodu k rozlišení rozdílně fosforylovaných forem lidských pepsinů. K tomuto účelu byly použity dva afinitní sorbenty: \*IDA- $\text{Fe}^{3+}$  a †BP- $\text{Ga}^{3+}$ . Jako modelový protein byl zvolen prasečí pepsin A, obsahující ve svém molekule jednu fosfátovou skupinu [61], a jeho defosforylovaná forma. Vypracovaná metoda byla použita pro separaci lidských pepsinů.

### 4.2.1 Separace fosforylované a nefosforylované formy prasečího pepsinu A

#### 4.2.1.1 Defosforylace prasečího pepsinu A

Aby bylo možné studovat separaci fosforylované a nefosforylované formy jednoho proteinu, bylo nejprve nutné připravit nefosforylovanou formu modelového fosfoproteinu prasečího pepsinu A. K odstranění fosfátové skupiny jsme použili kyselou fosfatasa z brambor. Tato fosfatasa umožňuje provést defosforylaci za mírně kyselého pH [175], a tím zachovat nativní konformaci pepsinu. Za zvolených podmínek (pH 5,5) byl pepsin defosforylován pouze částečně. Získaný preparát obsahoval  $2 \times 10^{-5}$  molů fosforu na jeden gram proteinu, což odpovídá přítomnosti 0,7 molů fosfátových skupin v jednom molu prasečího pepsinu A. V souladu s dřívějším pozorováním [176], defosforylace pepsinu neměla vliv na jeho proteolytickou aktivitu. Toto zachování proteolytické aktivity by ale mohlo být jednou z příčin pouze částečné defosforylace pepsinu v důsledku štěpení

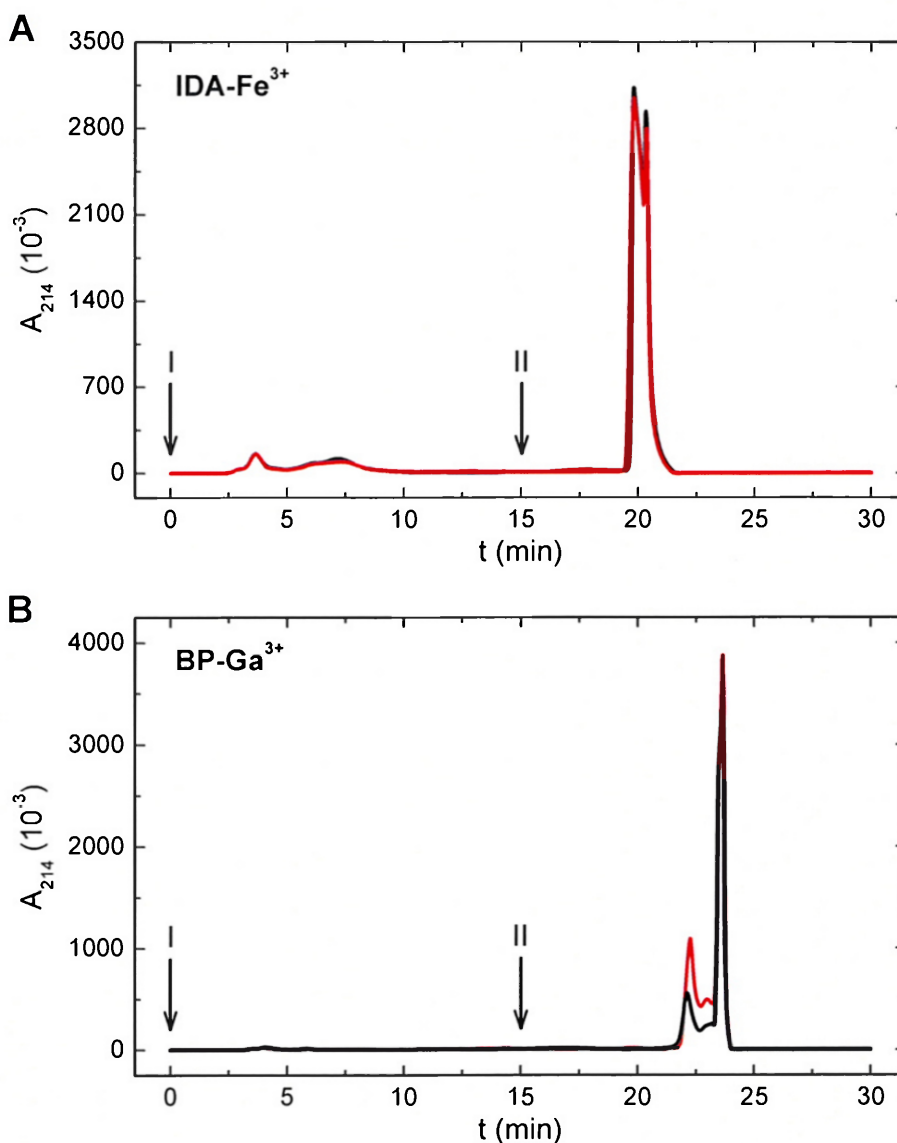
\*sorbent na bázi poly(styren-*co*-divinylbenzen) obsahující vázanou iminodioctovou kyselinu (IDA) a imobilizované železitě ionty

†sorbent na bázi poly(glycidyl methakrylát-*co*-ethylen dimethakrylátu) obsahující vázanou (6-amino-1-hydroxyhexan-1,1-diyl) bisfosfonovou kyselinu (BP) a imobilizované galité ionty

fosfatasy účinkem pepsinu. Další příčinou by mohla být inhibice fosfatasy uvolněnými fosfátovými ionty [177, 178].

#### 4.2.1.2 IMAC prasečího pepsinu A a jeho defosforylované formy

Chromatografické chování částečně defosforylovaného pepsinu na HP-IMAC sorbentech bylo porovnáno s chováním nativního pepsinu. Výsledky chromatografií jsou ukázány na obr. 4.6. Jak je patrné, nebyl pozorován žádný rozdíl ve schopnosti obou forem



Obr. 4.6: HP-IMAC nativního prasečího pepsinu A (červený chromatogram) a jeho částečně defosforylované formy (černý chromatogram) na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu (A) a BP-Ga<sup>3+</sup> sorbentu (B)

Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu$ l roztoku proteinu (1 mg/ml 0,1% kyseliny octové); I – 0,1% kyselina octová; II – 200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2; průtoková rychlost 0,5 ml/min.

pepsinu se adsorbovat na imobilizované  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty. Tento výsledek naznačuje, že nejenom fosfátové skupiny pepsinu se účastní interakcí s IMAC sorbenty.

Jak ve své práci ukázala Muzsyńska a kol. [110], proteiny se na IMAC sorbenty obsahující železité ionty mohou vázat také prostřednictvím volných karboxylových skupin zbytků asparagových a glutamových kyselin a C-koncových aminokyselin. Podobně bylo prokázáno, že se na tyto sorbenty mohou adsorbovat i nefosforylované peptidy [116–118, 121–124]. Adsorpce peptidů a proteinů prostřednictvím volných karboxylových skupin byla zjištěna i v případě IMAC sorbentů obsahujících galité ionty [116, 118, 171, 172]. Afinita karboxylových skupin k imobilizovaným kovovým iontům je ale oproti fosfátovým skupinám nižší; tyto skupiny vytváří pouze jednu koordinačně-kovalentní vazbu s kovovými ionty, zatímco fosfátové skupiny tvoří dvě [106, 110]. Tato afinita ale výrazně vzrůstá, pokud jsou karboxylové skupiny lokalizovány vedle sebe [110, 179]. Pokud budeme uvažovat, že 13% všech aminokyselin tvořících prasečí pepsin A obsahuje volnou karboxylovou skupinu [53] a že řada těchto aminokyselin je lokalizována vedle sebe, lze předpokládat, že k adsorpci pepsinu na IMAC sorbentech budou přispívat i karboxylové skupiny pepsinu.

#### 4.2.1.3 Modifikace karboxylových skupin prasečího pepsinu A

Abychom potlačili vliv karboxylových skupin pepsinu na interakci s IMAC sorbenty, byly karboxylové skupiny pepsinu modifikovány esterifikací methanolicou HCl nebo diazomethanem nebo amidací dimethylaminem, ethylaminem nebo isopropylaminem. Pro zhodnocení jednotlivých modifikací byly technikou MALDI-TOF MS změřeny relativní molekulové hmotnosti pepsinu před a po jeho modifikaci. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.5 jako rozdíl relativní molekulové hmotnosti pepsinu po modifikaci a před modifikací. Výpočet teoretického nárůstu hmotnosti pepsinu po jeho modifikaci byl založen na předpokladu, že každá karboxylová skupina přítomná v molekule pepsinu bude modifikována. Zatímco pro omezení sorpce nefosforylovaných peptidů se osvědčila esterifikace HCl v methanolu [116, 121, 127], u proteinu prasečího pepsinu A bylo nejvyššího stupně modifikace karboxylových skupin (98% modifikováno) dosaženo při esterifikaci diazomethanem, jak je patrné z tab. 4.5. Při esterifikaci částečně defosforylovaného pepsinu diazomethanem bylo modifikováno téměř 97% karboxylových skupin.

**Tab. 4.5:** Modifikace karboxylových skupin prasečího pepsinu A

Modifikace	Teoretická $\Delta M_{r,\text{pepsin}}^a$	Změřená $\Delta M_{r,\text{pepsin}}^b$	Stupeň mo- difikace (%)	Výsledek
Amidace				
dimethylamin	1 134	2 588	228	vedlejší reakce [180]
ethylamin	1 134	450	40	neúplná modifikace
isopropylamin	1 722	1 509	88	neúplná modifikace
Esterifikace				
methanolká HCl	588	-10 579	-	rozštěpení pepsinu
diazomethan	588	577 (570 <sup>c</sup> )	98 (97 <sup>c</sup> )	optimální

<sup>a</sup> teoretický nárůst  $M_r$  pepsinu po modifikaci všech jeho karboxylových skupin

<sup>b</sup> nárůst, případně pokles (-),  $M_r$  pepsinu po jeho modifikaci zjištěný pomocí MALDI-TOF MS a vyjádřený jako rozdíl  $m/z$  modifikovaného a nemodifikovaného pepsinu

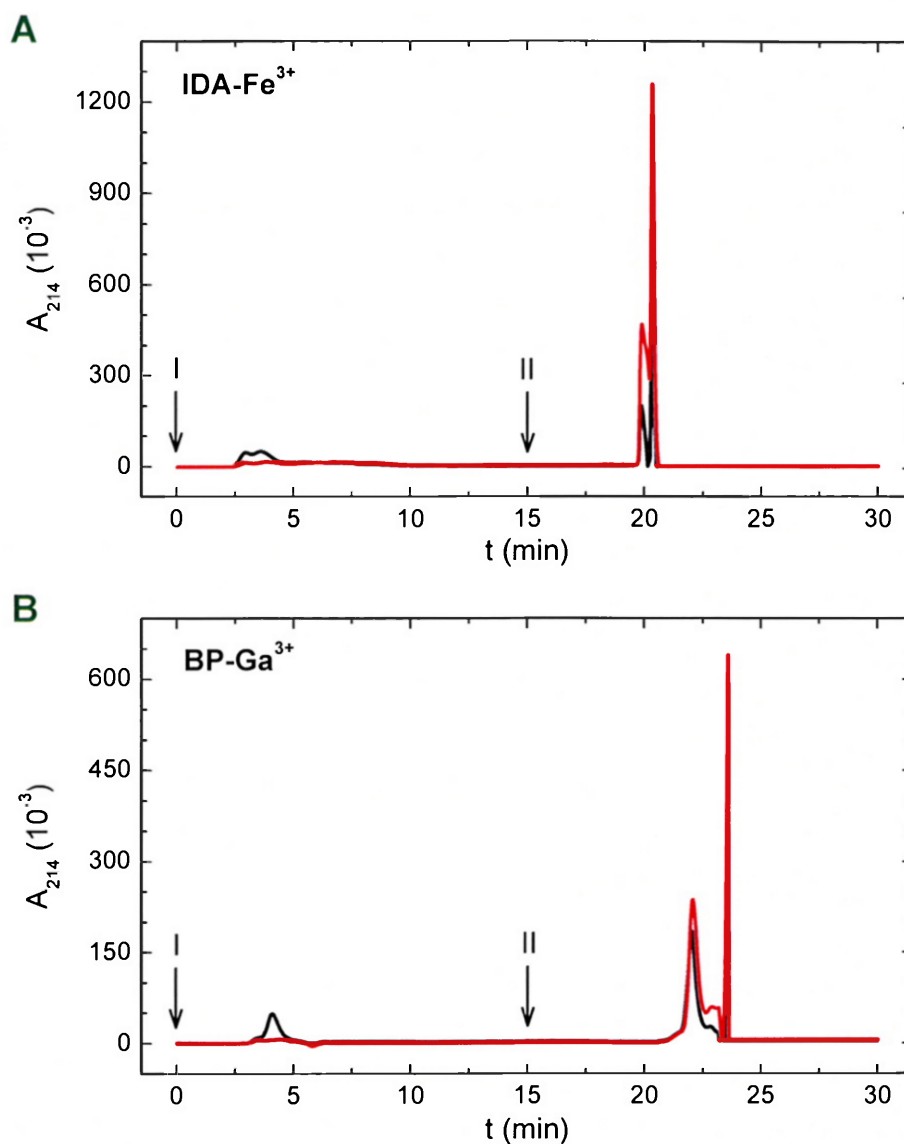
<sup>c</sup> výsledky pro částečně defosforylovaný pepsin

#### 4.2.1.4 IMAC dvou forem prasečího pepsinu A lišících se stupněm fosforylace po modifikaci karboxylových skupin

Pepsin a jeho částečně defosforylovaný derivát, oba esterifikované diazomethanem, byly podrobeny IMAC za stejných podmínek jako jejich nemodifikované analogy (viz kap. 4.2.1.2). Výsledky chromatografických separací jsou ukázány na obr. 4.7. Modifikace karboxylových skupin nativního prasečího pepsinu A neovlivnila jeho schopnost interagovat s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty (BP- $\text{Ga}^{3+}$  a IDA- $\text{Fe}^{3+}$ ); pepsin byl kompletně adsorbován (obr. 4.7). V případě částečně defosforylované formy enzymu, modifikace jeho karboxylových skupin snížila množství enzymu adsorbované na imobilizované kovové ionty (obr. 4.7). Neadsorbovaná část modifikovaného částečně defosforylovaného pepsinu reprezentovala 30 – 32% aplikovaného vzorku. Množství neadsorbovaného proteinu korespondovalo s poklesem obsahu fosfátu v pepsinu po jeho defosforylaci. Tyto výsledky naznačují, že fosfátová skupina pepsinu je po modifikaci karboxylových skupin odpovědná za interakci s IMAC sorbenty.

Výsledky jednotlivých pokusů ukázaly, že prasečí pepsin A interaguje s imobilizovanými kovovými ionty nejen prostřednictvím své fosfátové skupiny, ale také prostřednictvím volných karboxylových skupin. Separace fosforylovaných a defosforylovaných forem pepsinu metodou afinitní chromatografie na imobilizovaných železitých a galitých iontech může být dosaženo v případě, že jsou karboxylové skupiny předem esterifikovány diazomethanem. Obdobné výsledky byly získány v případě separace fosfopeptidů z komplexních biologických směsí technikou IMAC [115, 116, 121, 127].





**Obr. 4.7:** HP-IMAC diazomethanem estrifikovaného prasečího pepsinu A (červený chromatogram) a jeho částečně defosforylované formy také estrifikované diazomethanem (černý chromatogram) na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu (A) a BP-Ga<sup>3+</sup> sorbentu (B)

Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu$ l roztoku proteinu (30  $\mu$ g/ml 0,1% kyseliny octové); I – 0,1% kyselina octová; II – 200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2; průtoková rychlost 0,5 ml/min.

#### 4.2.2 Separace fosforylovaných a nefosforylovaných forem lidských pepsinů

Použitelnost vypracované metody separace fosforylovaných a nefosforylovaných forem pepsinu afinitní chromatografií na imobilizovaných železitých a galitých iontech byla ověřována na vzorcích lidské žaludeční šťávy (získané od zdravého jedince) a lidské žaludeční sliznice (získané od pacienta trpícího karcinomem žaludku). Z obou vzorků

byly nejprve pomocí iontově-výměnné chromatografie izolovány lidské pepsiny, které byly následně modifikovány diazomethanem a separovány IMAC.

#### 4.2.2.1 Izolace lidských pepsinů iontově-výměnnou chromatografií

Lidské pepsiny byly izolovány ze žaludeční šťávy zdravého jedince a ze žaludeční sliznice pacienta s karcinomem žaludku pomocí iontově-výměnné chromatografie. Protože žaludeční sliznice obsahuje pepsinogeny, bylo je nutné nejprve převést na pepsiny. K aktivaci pepsinogenů dochází při pH nižším než 5 [52]. Proto jsme pH homogenátu lidské žaludeční sliznice upravili na 3.

Takto upravený homogenát lidské žaludeční sliznice stejně jako lidská žaludeční šťáva byl separován pomocí iontově-výměnné chromatografie na anexu HEMA-BIO 1000 DEAE. Při volbě chromatografických podmínek bylo využito velmi nízkého izoelektrického bodu pepsinu ( $pI < 1$  [51, 58]). Enzym byl adsorbován při pH 4,0, a tím byla značně omezena možnost sorpce jiných proteinů než pepsinu. Izolované pepsiny byly eluovány zvýšením iontové síly. Průběh chromatografií byl sledován stanovením obsahu proteinů (viz kap. 3.3.6.1) a proteolytické aktivity (viz kap. 3.3.6.2) v jednotlivých frakcích; výsledky jsou shrnuty v tab. 4.6 a tab. 4.7.

Výsledkem chromatografie lidské žaludeční šťávy (tab. 4.6) byla separace proteolyticky neaktivních proteinů a peptidů, které se na anex neadsorbovaly, a proteolyticky aktivních proteinů (pepsiny), které byly na anexu zadrženy. Adsorbované pepsiny byly uvolněny zvýšením iontové síly a jejich specifická aktivita se zvýšila 1,3× v porovnání s lidskou žaludeční šťávou. Obdobné výsledky byly získány i při purifikaci pepsinů z homogenátu lidské žaludeční sliznice, jehož pH bylo upraveno na 3 (tab. 4.7). Oproti žaludeční šťávě tento vzorek obsahoval mnohem větší množství proteolyticky neaktivních proteinů a v průběhu chromatografie se specifická aktivita pepsinu zvýšila asi 9×.

**Tab. 4.6:** Výsledky purifikace lidských pepsinů ze žaludeční šťávy iontově-výměnnou chromatografií na HEMA-BIO 1000 DEAE

	Koncentrace proteinu (mg/ml)	Objem (ml)	Množství proteinu (mg)	Výtěžek (%)	Specifická aktivita* (PU/mg)
Vzorek	0,521	20	10,42	100	94 000
Neadsorbováno	0,058	40	2,32	22	0
Eluováno	2,020	4	8,08	78	120 900

\* proteolytická aktivita pepsinu vztažená na 1 mg proteinu

Chromatografické podmínky: vzorek – lidská žaludeční šťáva; adsorpce – 20 mM octanový pufr pH 4,0; eluce – 20 mM octanový pufr pH 4,0 obsahující 1 M NaCl.

Tab. 4.7: Výsledky purifikace lidských pepsinů ze žaludeční sliznice iontově-výměnnou chromatografií na HEMA-BIO 1000 DEAE

	Koncentrace proteinu (mg/ml)	Objem (ml)	Množství proteinu (mg)	Výtěžek (%)	Specifická aktivita* (PU/mg)
Vzorek	6,792	10	67,92	100	5 924
Neadsorbováno	2,027	30	60,81	90	0
Eluováno	2,306	3	6,92	10	53 420

\* proteolytická aktivita pepsinu vztažená na 1 mg proteinu

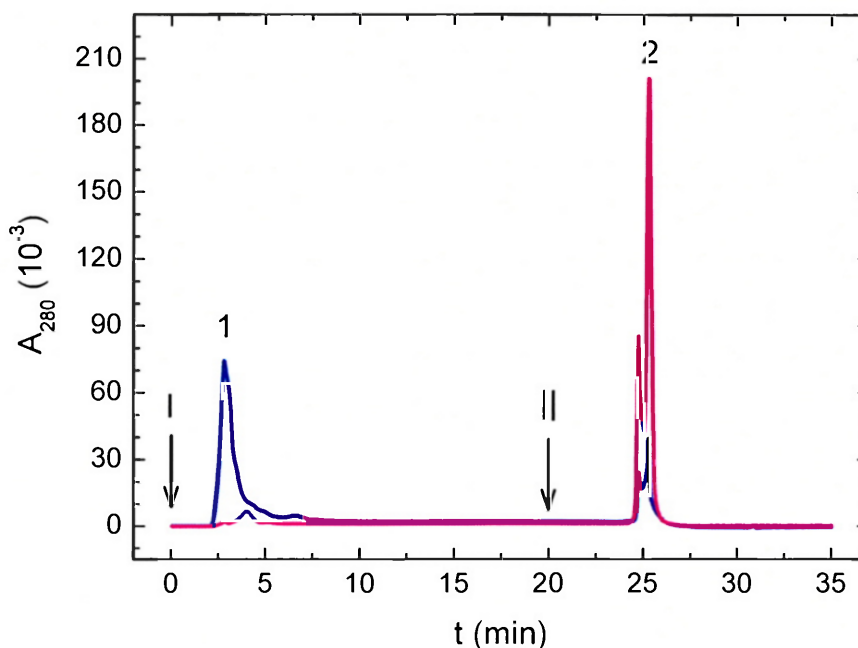
Chromatografické podmínky: vzorek – homogenát lidské žaludeční sliznice, jehož pH bylo upraveno na 3; adsorpce – 20 mM octanový pufr pH 4,0; eluce – 20 mM octanový pufr pH 4,0 obsahující 1 M NaCl.

#### 4.2.2.2 IMAC lidských pepsinů a jejich esterifikovaných derivátů

V kap. 4.2.1 byl vypracován postup separace fosforylovaných a nefosforylovaných forem prasečího pepsinu A na HP-IMAC sorbentech, který zahrnoval esterifikaci volných karboxylových skupin pepsinu. Tento postup byl použit i při analýze lidských pepsinů. Lidské pepsiny izolované ze žaludeční šťávy zdravého jedince a ze žaludeční sliznice pacienta s karcinomem žaludku byly nejprve dialyzovány proti 10 mM HEPES pH 7,4. Část z nich byla modifikována diazomethanem a po úpravě pH na 4 byla separována pomocí HP-IMAC na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu. Druhá část byla po úpravě pH na 4 separována pomocí HP-IMAC na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu přímo bez předchozí modifikace karboxylových skupin. Výsledky obou HP-IMAC jsou ukázány na obr. 4.8 a obr. 4.9. Ve frakcích odebíraných v průběhu chromatografií byl stanoven obsah proteinů (viz kap. 3.3.6.1) a fosfátových skupin (viz kap. 3.3.6.3).

Na obr. 4.8 jsou porovnány chromatogramy lidských pepsinů izolovaných ze žaludeční šťávy zdravého jedince a jejich diazomethanem esterifikovaných forem. Oba aplikované vzorky lidských pepsinů (nativní i modifikovaný) obsahovaly  $8,6 \times 10^{-6}$  molů fosforu na jeden gram proteinu. To odpovídá přítomnosti 0,3 molů fosfátových skupin v jednom molu pepsinu. Pokud vezmeme v úvahu, že pepsiny zdravého člověka mohou obsahovat maximálně jednu fosfátovou skupinu v molekule [67], lze z výsledků stanovení obsahu fosforu předpokládat, že 30% molekul aplikovaných pepsinů bylo fosforylováno. Z porovnání obr. 4.8 a tab. 4.8 vyplývá, že všechny nemodifikované pepsiny byly adsorbovány na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu bez ohledu na přítomnost fosfátových skupin ve svých molekulách. Naproti tomu po esterifikaci pepsinů došlo ke značnému snížení jejich adsorpce; pouze 30% proteinů se adsorbovalo (pík 2 na obr. 4.8). Jak bylo zjištěno ze stanovení obsahu fosforu ve frakcích odpovídajících píku 1, neadsorbované modifikované pepsiny fosfátové skupiny neobsahovaly (tab. 4.8). Lze tedy předpokládat, že na

IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbent byly adsorbovány pouze modifikované pepsiny obsahující fosfátové skupiny.



**Obr. 4.8:** Separace pepsinů izolovaných z lidské žaludeční šťávy (růžový chromatogram) a jejich diazomethanem modifikovaných derivátů (modrý chromatogram) na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu

Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu$ l roztoku proteinu (0,3 mg/ml 10 mM HEPES okyseleného na pH 4,0); I – 0,1% kyselina octová; II – 200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2; průtoková rychlost 0,5 ml/min.

**Tab. 4.8:** Separace lidských pepsinů izolovaných ze žaludeční šťávy zdravého jedince na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu

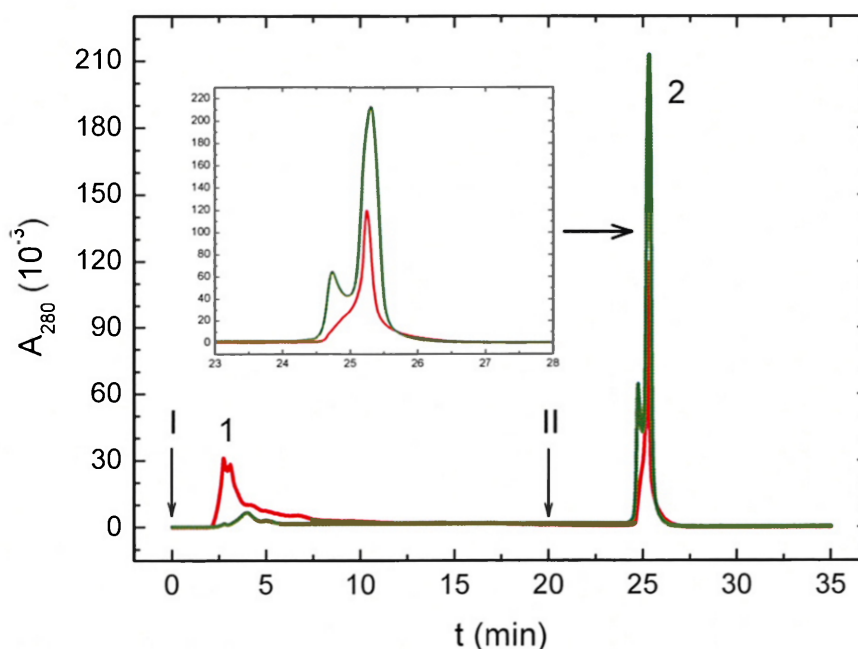
Vzorek	IMAC	Protein	P/molekula pepsinu
Lidské pepsiny	Aplikováno vzorku	100%	0,3
	Neadsorbováno (pík 1)	0%	0,0
	Eluováno (pík 2)	100%	N
Esterifikované lidské pepsiny	Aplikováno vzorku	100%	0,3
	Neadsorbováno (pík 1)	70%	0,0
	Eluováno (pík 2)	29%	N

P/molekula pepsinu – počet fosfátových skupin připadající na jednu molekulu pepsinu

N – nelze určit, eluční mobilní fáze znemožňuje stanovení obsahu fosforu

Chromatografické podmínky: vzorek – lidské pepsiny izolované ze žaludeční šťávy; adsorpce – 0,1% kyselina octová; eluce – 200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2. Ve vzorku a ve frakcích odpovídajících píku 1 a píku 2 (viz obr. 4.8) byl stanoven obsah proteinu (viz kap. 3.3.6.1) a fosfátových skupin (viz. kap. 3.3.6.3).

Výsledky chromatografických separací lidských pepsinů získaných ze žaludeční sliznice pacienta s karcinomem žaludku a jejich esterifikovaných derivátů jsou porovnány na obr. 4.9. Z chromatogramů je patrné, že neesterifikované pepsiny byly kompletně adsorbovány na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu, zatímco jejich esterifikované deriváty byly adsorbovány pouze částečně. Ze stanovení obsahu proteinů v odebíraných frakcích odpovídajících píku 1 a píku 2 (tab. 4.9) bylo zjištěno, že se adsorbovalo pouze 49% esterifikovaných pepsinů (pík 2 na obr. 4.9). Stanovení obsahu fosforu (tab. 4.9) ukázalo, že aplikovaný vzorek obsahoval  $3,2 \times 10^{-5}$  molů fosforu na jeden gram proteinu, což odpovídá 1,1 fosfátové skupině na molekulu pepsinu, zatímco v neadsorbovaných proteinech nebyla přítomnost fosfátových skupin detegována. Je velmi pravděpodobné, že fosforylované pepsiny byly na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbent adsorbovány.



**Obr. 4.9:** Separace pepsinů izolovaných z lidské žaludeční sliznice (zelený chromatogram) a jejich diazomethanem modifikovaných derivátů (červený chromatogram) na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu

Vložený graf – výřez. Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu$ l roztoku proteinu (0,3 mg/ml 10 mM HEPES okyseleného na pH 4,0); I – 0,1% kyselina octová; II – 200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2; průtoková rychlost 0,5 ml/min.

Porovnáním obsahu fosfátových skupin v molekulách lidských pepsinů pocházejících od zdravého a nemocného člověka (tab. 4.8 a tab. 4.9) se ukázalo, že pepsiny pacienta s karcinomem žaludku vykazovaly vyšší stupeň fosforylace (zhruba 3,5 $\times$ ) ve srovnání s pepsiny zdravého člověka. Toto zjištění je v souladu s dříve publikovanými pracemi [68, 111, 112], které ukázaly, že u pacientů s rakovinou žaludku může dojít nejen ke zvýšené fosforylaci pepsinu A, ale také k fosforylaci pepsinu C, jehož fosforylace nebyla

**Tab. 4.9:** Separace lidských pepsinů izolovaných ze žaludeční sliznice pacienta s karcinomem žaludku na IDA-Fe<sup>3+</sup> sorbentu

Vzorek	IMAC	Protein	P/molekula pepsinu
Lidské pepsiny	Aplikováno vzorku	100%	1,1
	Neadsorbováno (pík 1)	0%	0,0
	Eluováno (pík 2)	100%	N
Esterifikované lidské pepsiny	Aplikováno vzorku	100%	1,1
	Neadsorbováno (pík 1)	51%	0,0
	Eluováno (pík 2)	48%	N

P/molekula pepsinu – počet fosfátových skupin připadající na jednu molekulu pepsinu

N – nelze určit, eluční mobilní fáze znemožňuje stanovení obsahu fosforu

Chromatografické podmínky: vzorek – lidské pepsiny izolované ze žaludeční sliznice; adsorpce – 0,1% kyselina octová; eluce – 200 mM fosforečnanový pufr pH 7,2. Ve vzorku a ve frakcích odpovídajících píku 1 a píku 2 (viz obr. 4.9) byl stanoven obsah proteinu (viz kap. 3.3.6.1) a fosfátových skupin (viz. kap. 3.3.6.3).

u zdravých jedinců pozorována [67].

### 4.2.3 Shrnutí

V této části práce byl na modelovém proteinu, prasečím pepsinu A, vypracován postup separace fosforylovaných a nefosforylovaných forem pepsinů vysokotlakou afinitní chromatografií na imobilizovaných železitých iontech. Separace bylo dosaženo po esterifikaci volných karboxylových skupin pepsinu diazomethanem. Dále bylo ukázáno, že tato metoda je použitelná pro separaci fosforylovaných a nefosforylovaných forem lidských pepsinů.

## 4.3 Izolace fosfopeptidů a identifikace fosforylačních míst

Pro charakterizaci fosforylace určitého proteinu za daného stavu organismu je důležité nejen určit stechiometrii fosforylace, ale také určit místa fosforylace [17, 18, 73]. V předchozí kapitole byla řešena otázka stupně fosforylace pepsinů, a proto jsme se v této části práce zaměřili na určení místa fosforylace. Jak už bylo zmíněno výše, zatímco v lidském pepsinu C zdravého člověka nebyly fosfátové skupiny detegovány, u některých izoform lidského pepsinu A byla nalezena jedna fosfátová skupina v molekule [67]. Ačkoli bylo zjištěno, že tato fosfátová skupina je vázána na serinovém zbytku [67], není doposud známa její pozice v sekvenci aminokyselin.

Cílem této části práce bylo vypracovat postup pro určení fosforylačních míst pepsinů. K tomuto účelu byl použit modelový fosfoprotein prasečí pepsin A, který obsahuje jednu fosfátovou skupinu vázanou na serinový zbytek v pozici 68 [61]. Vypracovaný postup byl použit k určení fosforylačních míst pepsinů obsažených v lidské žaludeční šťávě.

### 4.3.1 Izolace a identifikace fosfopeptidu prasečího pepsinu A

Pepsin byl nejprve rozštěpen vhodnou endoproteasou na peptidy. Následovala izolace fosfopeptidů z peptidové směsi. Nakonec byly izolované fosfopeptidy analyzovány MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrií a identifikovány pomocí vyhledávání v proteinové databázi.

#### 4.3.1.1 Štěpení prasečího pepsinu A

Ke štěpení proteinů se nejčastěji používá trypsin, který štěpí peptidový řetězec za zbytky lysinu a argininu. Protože pepsiny obsahují velmi málo bazických aminokyselin (pouze dva zbytky argininu a jeden lysinu) [53], byl pro štěpení prasečího pepsinu A vybrán  $\alpha$ -chymotrypsin.  $\alpha$ -Chymotrypsin preferuje štěpení peptidových vazeb, kterých se účastní zbytky aromatických aminokyselin (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) nebo zbytky některých dalších hydrofobních aminokyselin (leucin, methionin) [181].

Před vlastním štěpením byl pepsin denaturován močovinou, disulfidové můstky byly redukovány pomocí dithiothreitolu a thiolové skupiny byly blokovány jodacetamidem.

#### 4.3.1.2 Izolace fosfopeptidu z prasečího pepsinu A rozštěpeného $\alpha$ -chymotrypsinem

##### 4.3.1.2.1 Výběr sorbentů pro izolaci fosfopeptidu

Pro izolaci fosfopeptidu ze směsi peptidů získaných rozštěpením prasečího pepsinu A  $\alpha$ -chymotrypsinem byly zvoleny následující sorbenty:

- sorbent obsahující imobilizovaný komplex (IDA-Fe<sup>3+</sup>) naplněný ve špičkách pro analýzu menších množství; komerční název: TopTip IMAC (Fe<sup>3+</sup>)
- analogický sorbent jako v předchozím případě, ale obsahující imobilizované Ga<sup>3+</sup> ionty; komerční název: TopTip IMAC (Ga<sup>3+</sup>)
- HPLC sorbent obsahující imobilizovaný komplex IDA-Fe<sup>3+</sup>; komerční název: POROS MC20-Fe<sup>3+</sup>
- TiO<sub>2</sub> naplněný ve špičkách; komerční název: Toptip TiO<sub>2</sub>

##### 4.3.1.2.2 Izolace fosfopeptidu prasečího pepsinu A na sorbentech s chelovanými Fe<sup>3+</sup> a Ga<sup>3+</sup> ionty naplněných ve špičkách

Při hledání vhodných chromatografických podmínek pro izolaci fosfopeptidu z peptidové směsi vzniklé rozštěpením prasečího pepsinu A  $\alpha$ -chymotrypsinem na imobilizova-

ných  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  iontech se vycházelo z podmínek použitých při separaci fosfoproteinů (viz kap. 4.2). Na ekvilibraci sorbentů a vymytí neadsorbovaných peptidů byla použita 0,1% kyselina octová; zvýšení iontové síly tohoto roztoku (1 M NaCl) nemělo na adsorpci peptidů žádný vliv. Adsorbované peptidy byly desorbovány různými elučními roztoky a eluáty byly analyzovány MALDI-TOF MS.

K desorpci adsorbovaných peptidů byly použity následující roztoky:

- 200 mM fosforečnanový pufr ( $\text{Na}^+$ ) pH 7,2. Příklad získaného spektra je na obr. 4.10 A. Kromě hlavních píků ( $m/z$  1321,7; 1670,9; 1819,0) jsou ve spektru patrné i tzv. adukty peptidů s jedním až třemi sodíkovými ionty (označeny hvězdičkou).
- 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9. Vzhledem k tomu, že amonné ionty netvoří na rozdíl od sodíkových iontů s peptidy adukty [179], je naměřené spektrum jednodušší (obr. 4.10 B).
- 5 mM hydroxid amonný pH 10,5. Získané spektrum je na obr. 4.10 C. Následná eluce 200 mM hydrogenfosforečnanem amonným pH 7,9 uvolnila ještě další peptidy (obr. 4.10 D).

Obdobné výsledky byly získány i v případě použití sorbentu s imobilizovanými  $\text{Ga}^{3+}$  ionty.

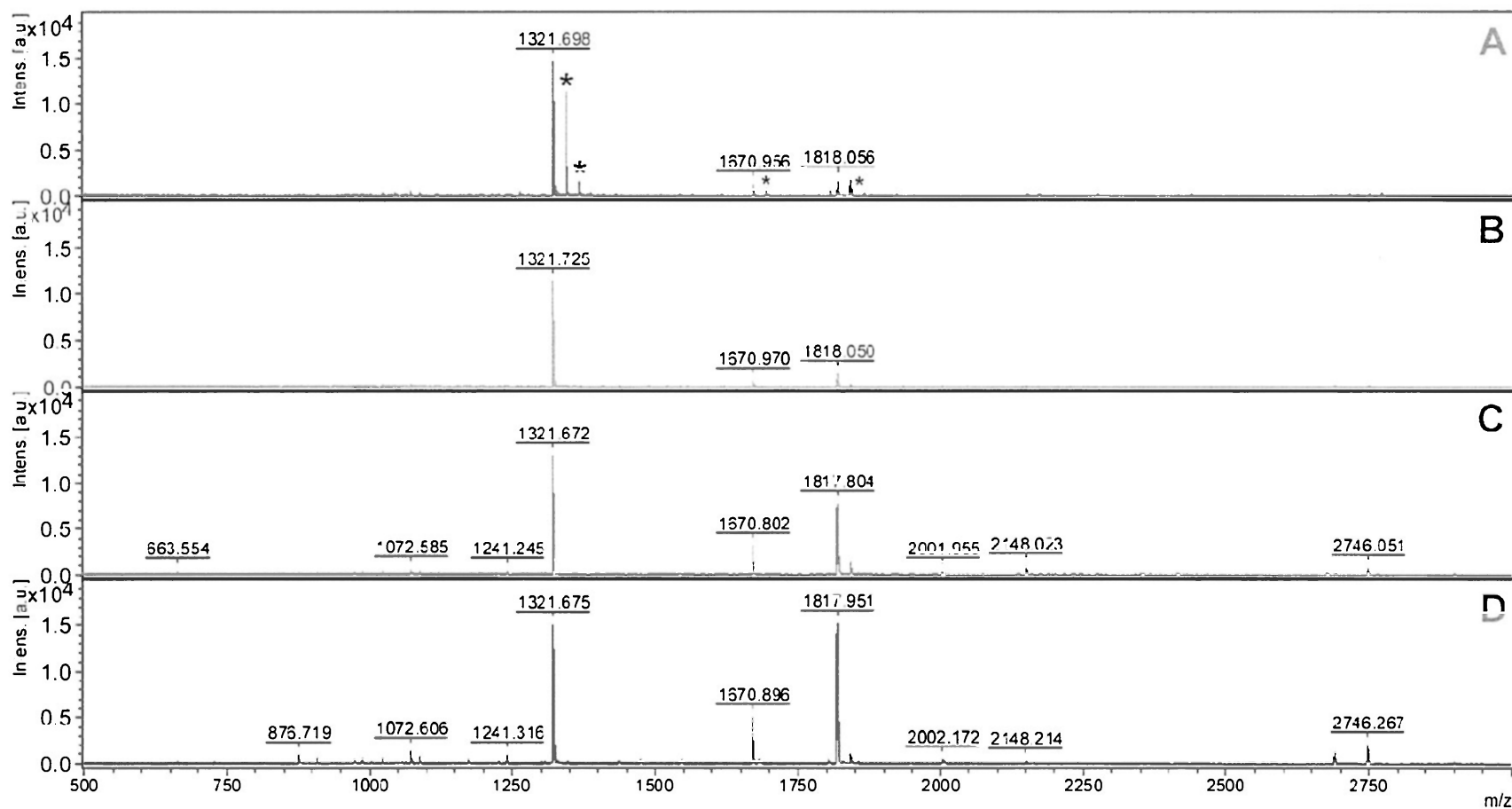
#### 4.3.1.2.3 Izolace fosfopeptidu prasečího pepsinu A na HPLC sorbentu s imobilizovanými $\text{Fe}^{3+}$ ionty

Pro izolaci fosfopeptidu z peptidové směsi vzniklé rozštěpením prasečího pepsinu A  $\alpha$ -chymotrypsinem na HPLC sorbentu (POROS MC20) s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty byly použity analogické chromatografické podmínky jako v případě separace fosforylované a nefosforylované formy pepsinu (viz kap. 4.2). Po aplikaci peptidové směsi byly neadsorbované peptidy vymyty 0,1% kyselinou octovou. Adsorbované peptidy pak byly desorbovány různými elučními roztoky a eluáty byly analyzovány MALDI-TOF MS.

K desorpci adsorbovaných peptidů byly použity následující roztoky:

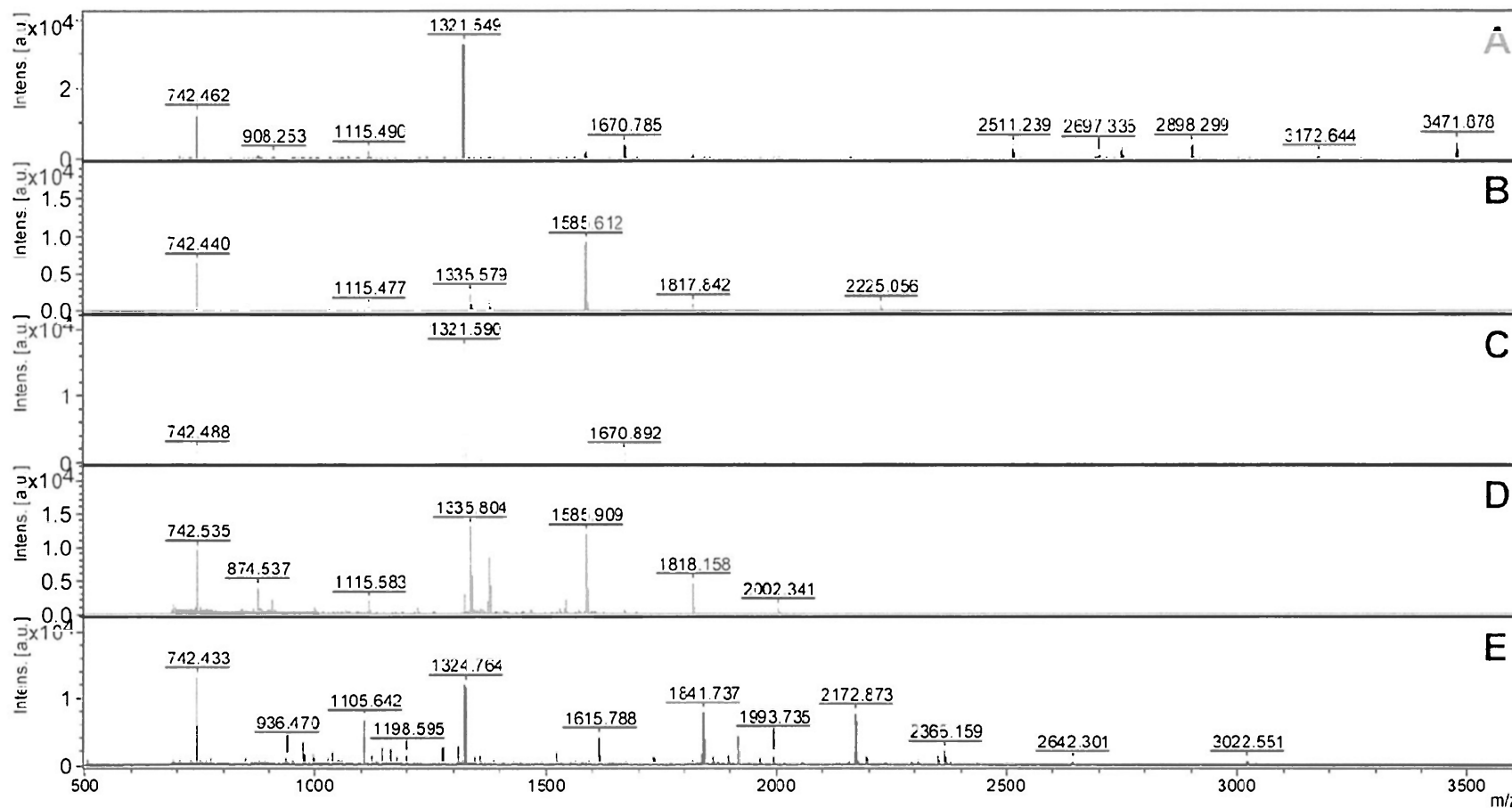
- 200 mM fosforečnanový pufr ( $\text{Na}^+$ ) pH 7,2. Tento pufr desorboval větší množství peptidů, jak vyplývá z MALDI-TOF MS analýzy elučního píku (obr. 4.11 A,B).
- 5 mM hydroxid amonný a následně 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9. Získaný chromatogram je ukázán na obr. 4.12. MALDI-TOF MS analýzou obou elučních píků bylo zjištěno, že roztok hydroxidu amonného (obr. 4.11 C) desorboval pouze čtyři peptidy, z nichž jeden poskytl velmi intenzivní signál ( $m/z$  1321,5). Naproti tomu roztok hydrogenfosforečnanu amonného (obr. 4.11 D) desorboval celou řadu peptidů. Porovnáním těchto spekter se spektrem vzorku aplikovaného na HPLC sorbent (obr. 4.11 E) se ukázalo,





Obr. 4.10: MALDI-TOF MS analýza peptidů prasečího pepsinu A eluovaných různými roztoky ze sorbentu s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty naplněném ve špičce

Hvězdička označuje adukty se sodíkem. Podmínky separace: vzorek – prasečí pepsin A rozštěpený  $\alpha$ -chymotrypsinem; adsorpce – 0,1% kyselina octová; eluce – 200 mM fosforečnanový pufr ( $\text{Na}^+$ ) pH 7,2 (A) nebo 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9 (B) nebo 5 mM hydroxid amonný pH 10,5 (C) a poté 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9 (D).

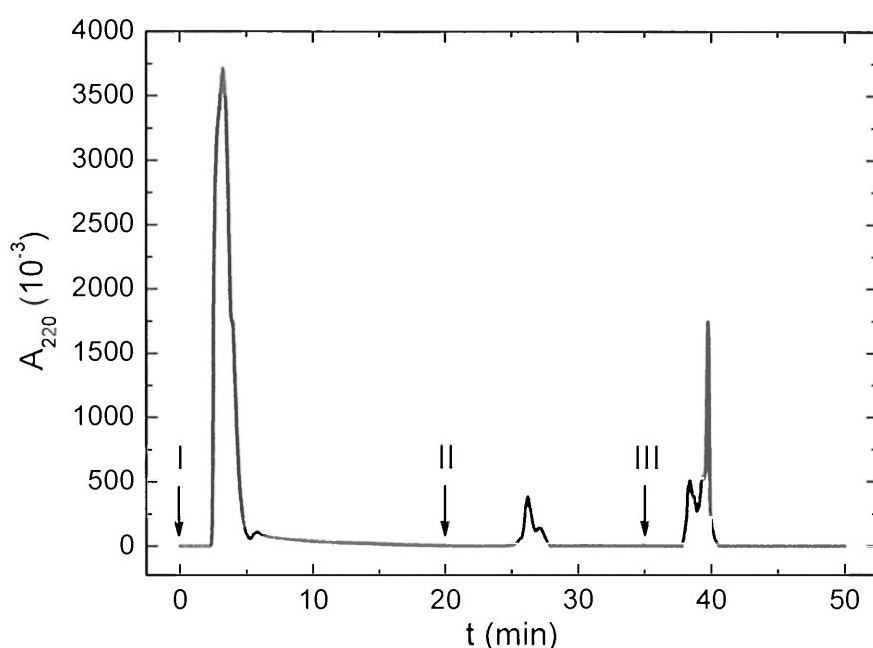


Obr. 4.11: MALDI-TOF MS analýza peptidů prasečího pepsinu A eluovaných různými roztoky z HPLC sorbentu s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty

Podmínky separace: vzorek – prasečí pepsin A rozštěpený  $\alpha$ -chymotrypsinem (E); adsorbce – 0,1% kyselina octová; eluce – 200 mM fosforečnanový pufr ( $\text{Na}^+$ ) pH 7,2 (A – frakce odebraná v 36. min analýzy, B – frakce odebraná v 37. min analýzy) nebo 5 mM hydroxid amonný pH 10,5 (C) a poté 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9 (D).

že ze vzorku byly adsorbovány pouze některé peptidy. Navíc signály těchto peptidů měly v MS spektru aplikovaného vzorku jen malou intenzitu nebo nebyly vůbec viditelné, zřejmě v důsledku potlačení jejich ionizace.

Z porovnání obr. 4.10 a obr. 4.11 vyplývá, že z HPLC sorbentu s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty byly daným elučním pufrem desorbovány obdobné peptidy jako ze sorbentů s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty, které byly naplněny ve špičkách. Nicméně v MS spektrech eluátů z jednotlivých sorbentů jsou patrné drobné rozdíly v množství a intenzitě jednotlivých peptidových signálů.

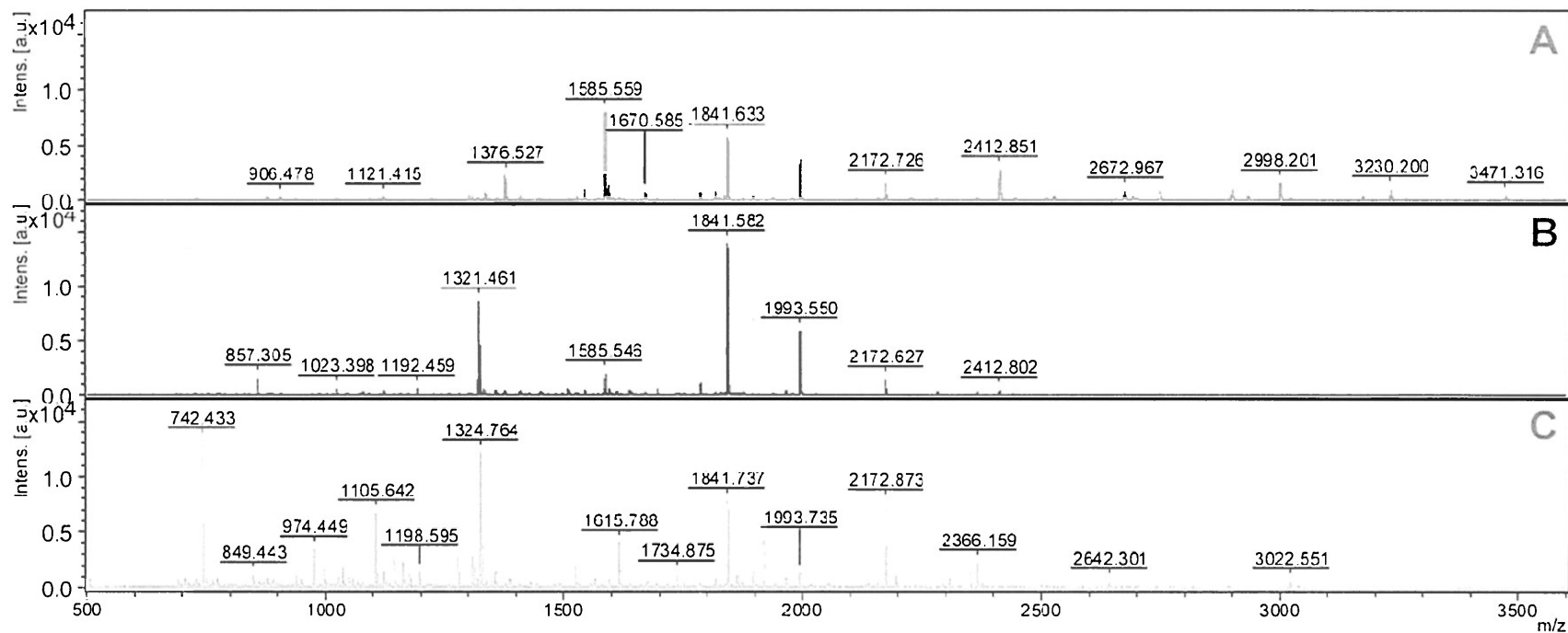


**Obr. 4.12:** Separace peptidů vzniklých štěpením prasečího pepsinu A  $\alpha$ -chymotrypsinem na HPLC sorbentu s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty

Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu\text{l}$  prasečího pepsinu A rozštěpeného  $\alpha$ -chymotrypsinem; I – 0.1% kyselina octová; II – 5 mM hydroxid amonný pH 10,5 (MALDI-TOF MS spektrum na obr. 4.11 C); III – 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9 (MALDI-TOF MS spektrum na obr. 4.11 D); průtoková rychlost 0,5 ml/min.

#### 4.3.1.2.4 Izolace fosfopeptidu prasečího pepsinu A na $\text{TiO}_2$ naplněném ve špičkách

Podmínky pro izolaci fosfopeptidu z prasečího pepsinu A rozštěpeného  $\alpha$ -chymotrypsinem na  $\text{TiO}_2$  byly převzaty od výrobce špiček (Glygen) a upraveny dle literatury [97]. Na ekvilibraci  $\text{TiO}_2$  a vymytí nenavázaných peptidů byla použita 5% TFA obsahující 80% ACN. Eluce byla provedena 5 mM hydroxidem amonným pH 10,5 a eluát byl analyzován MALDI-TOF MS. Získané MS spektrum (obr. 4.13 A) ukázalo, že roztok



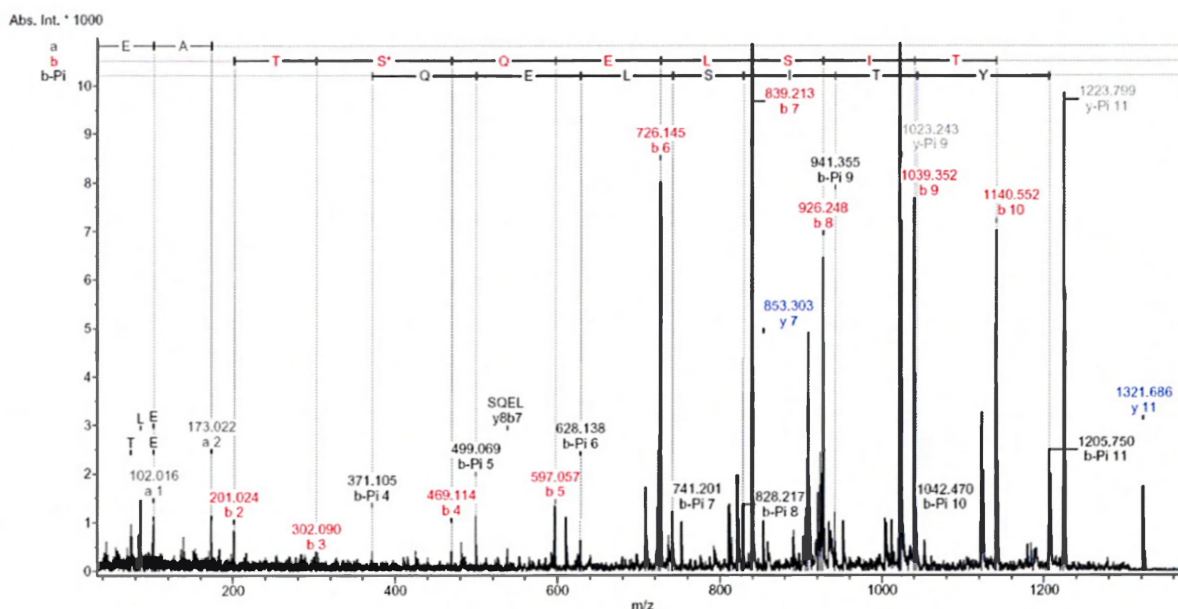
Obr. 4.13: MALDI-TOF MS analýza peptidů prasečího pepsinu A eluovaných z  $\text{TiO}_2$  roztokem hydroxidu amonného (A) a následně roztokem hydrogenfosforečnanu amonného (B)

Podmínky separace: vzorek – prasečí pepsin A rozštěpený  $\alpha$ -chymotrypsinem (C); adsorpce – 5% TFA obsahující 80% ACN; eluce – 5 mM hydroxid amonný pH 10,5 (A) a poté 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9 (B).

hydroxidu amonného desorboval z  $\text{TiO}_2$  větší množství peptidů. Navíc následná eluce 200 mM hydrogenfosforečnanem amonným pH 7,9 uvolnila ještě další peptidy (obr. 4.13 B). Porovnáním spekter eluátů z  $\text{TiO}_2$  (obr. 4.13 A,B) a spektra vzorku\* aplikovaného na  $\text{TiO}_2$  (obr. 4.13 C) se ukázalo, že v případě prasečího pepsinu A rozštěpeného  $\alpha$ -chymotrypsinem se na  $\text{TiO}_2$  absorbovalo velké množství peptidů, tedy i peptidy neobsahující fosfátovou skupinu.

#### 4.3.1.3 Identifikace peptidů prasečího pepsinu A desorbovaných ze sorbentů s imobilizovanými $\text{Fe}^{3+}$ a $\text{Ga}^{3+}$ ionty a z $\text{TiO}_2$

Pro identifikaci fosfopeptidu prasečího pepsinu A byly všechny peptidy desorbované ze sorbentů s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty a z  $\text{TiO}_2$  podrobeny MALDI-TOF/TOF MS analýze. Jediným nalezeným fosfopeptidem byl peptidový ion  $m/z$  1321, jehož MS/MS spektrum je na obr. 4.14. Sekvence tohoto iontu byla identifikována pomocí Mascot vyhledávacího algoritmu a databáze Swiss-Prot jako EATpSQELSITY, která obsahovala jednu fosfátovou skupinu vázanou na serinový zbytek. Tato sekvence odpovídá zbytkům 124 – 134 prasečího pepsinogenu A s fosforylovaným serinovým zbytkem v pozici 127. Mascot přiřadil uvedené sekvenci (EATpSQELSITY) skóre 79,



Obr. 4.14: MALDI-TOF/TOF MS spektrum rodičovského iontu  $m/z$  1321,6

Pokrytí aminokyselinové sekvence je ukázáno a, b a (b-Pi) fragmentovými ionty. Ztráta 97,9 Da ( $m/z$  1223,7) ukazuje na monofosforylaci rodičovského peptidu. Rozdíl hmotností 167,0 Da mezi fragmentačními ionty b4 ( $m/z$  469,1) a b3 ( $m/z$  302,0) odpovídá fosfoserinovému zbytku; to indikuje fosforylaci na prvním serinovém zbytku.

\*Pro odstranění močoviny byl vzorek před MALDI-TOF MS analýzou purifikován na sorbentu s C18 fází naplněném ve špičce

což bylo výrazně nad limitem statistické významnosti (skóre 37) pro identitu/intenzivní homologii. Nalezené místo fosforylace se shoduje s dříve zjištěnou pozicí fosfátové skupiny v prasečí pepsinu A vázanou na serinovém zbytku v pozici 68 [61].

Další peptidové ionty, které se podařilo identifikovat z naměřených MS/MS spekter, byly nefosforylované peptidy pocházející z prasečího pepsinu A ( $m/z$  742; 1670; 1818; 1841), případně z  $\alpha$ -chymotrypsinu ( $m/z$  1376). Většina z těchto identifikovaných peptidů obsahovala několik zbytků asparagových a glutamových kyselin, které byly lokalizovány vedle sebe (peptidové ionty  $m/z$  1670; 1818; 1841), což mohlo výrazně přispět ke zvýšení pravděpodobnosti jejich adsorpce na IMAC sorbenty [110, 179]. Sorpce nefosforylovaných peptidů bohatých na zbytky asparagových a glutamových kyselin na sorbentech s imobilizovanými železitými a galitými ionty a na  $\text{TiO}_2$  byla pozorována již dříve [94, 116, 116–118, 121–124, 171, 172].

Adsorpční a eluční podmínky, za kterých bylo na použitých sorbentech dosaženo největšího obohacení fosfopeptidu ( $m/z$  1321) pocházejícího z prasečího pepsinu A, shrnuje tab. 4.10. Vysoké obohacení fosfopeptidu ( $m/z$  1321) a zároveň nízká adsorpce nefosforylovaných peptidů byla pozorována v případě použití špiček naplněných sorbenty s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  nebo  $\text{Ga}^{3+}$  ionty (obr. 4.10 B).

**Tab. 4.10:** Optimální podmínky pro izolaci fosfopeptidu z prasečího pepsinu A rozštěpeného  $\alpha$ -chymotrypsinem na sorbentech s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty a na  $\text{TiO}_2$

Sorbent	Adsorpční podmínky	Eluční podmínky
HPLC sorbent s $\text{Fe}^{3+}$ ionty	0,1% kyselina octová	5 mM hydroxid amonný pH 10,5 + 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9
Sorbent s $\text{Fe}^{3+}$ ionty ve špičce	0,1% kyselina octová	200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9
Sorbent s $\text{Ga}^{3+}$ ionty ve špičce	0,1% kyselina octová	200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9
$\text{TiO}_2$ ve špičce	5% TFA v 80% ACN	5 mM hydroxid amonný pH 10,5 + 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9

Tučně označeny mobilní fáze, které uvolnily fosfopeptid ze sorbentů.

Dobré separace fosfopeptidu ( $m/z$  1321) bylo dosaženo také na HPLC sorbentu s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty (obr. 4.11 C). Nevýhodou použití tohoto sorbentu bylo značné zředění vzorku, z 200  $\mu\text{l}$  aplikovaného vzorku byly získány asi 2 ml eluátu.

Nejhorších výsledků bylo dosaženo na  $\text{TiO}_2$  naplněném ve špičce. Na  $\text{TiO}_2$  se adsorbovalo velké množství nefosforylovaných peptidů. Aby byl fosforylovaný peptid ( $m/z$  1321)

dobře viditelný v MS spektru eluátu, bylo nutné část adsorbovaných peptidů nejprve eluovat roztokem hydroxidu amonného a pak fosforylovaný peptid ( $m/z$  1321) a další peptidy desorbovat roztokem hydrogenfosforečnanu amonného. Navíc ani při postupném uvolňování peptidů z  $\text{TiO}_2$  nebyl fosfopeptid nejintenzivnějším iontem v MS spektru, jak je patrné z obr. 4.13 B. Zajímavé je, že pokud bychom se striktně řídili doporučením výrobce špiček naplňených  $\text{TiO}_2$  a eluovali adsorbované peptidy pouze roztokem hydroxidu amonného, pak by se nám nepodařilo fosforylovaný peptid ( $m/z$  1321) vůbec desorbovat.

Získané výsledky také ukázaly, že k detekci fosforylovaných peptidů MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií, je nezbytné tyto peptidy nejprve alespoň částečně separovat vhodnou metodou. Ve spektru získaném MALDI-TOF MS analýzou směsi peptidů vzniklých rozštěpením prasečího pepsinu A  $\alpha$ -chymotrypsinem nelze přítomnost fosfopeptidu ( $m/z$  1321) detegovat (obr. 4.11 E, obr. 4.13 C). To je zřejmě důsledek potlačení ionizace fosfopeptidu přítomnými nefosforylovanými peptidy [17, 73].

### 4.3.2 Izolace a analýza fosfopeptidů získaných z proteinů lidské žaludeční šťávy

Postup izolace fosfopeptidu a určení fosforylačního místa prasečího pepsinu A byl použit pro analýzu lidské žaludeční šťávy získané od zdravého jedince. Proteiny lidské žaludeční šťávy byly nejprve rozštěpeny  $\alpha$ -chymotrypsinem. Poté byly fosfopeptidy odděleny na sorbentech obsahujících  $\text{Fe}^{3+}$  nebo  $\text{Ga}^{3+}$  ionty nebo na  $\text{TiO}_2$ , analyzovány MALDI-TOF/TOF hmotnostním spektrometrem a identifikovány pomocí vyhledávání v proteinové databázi.

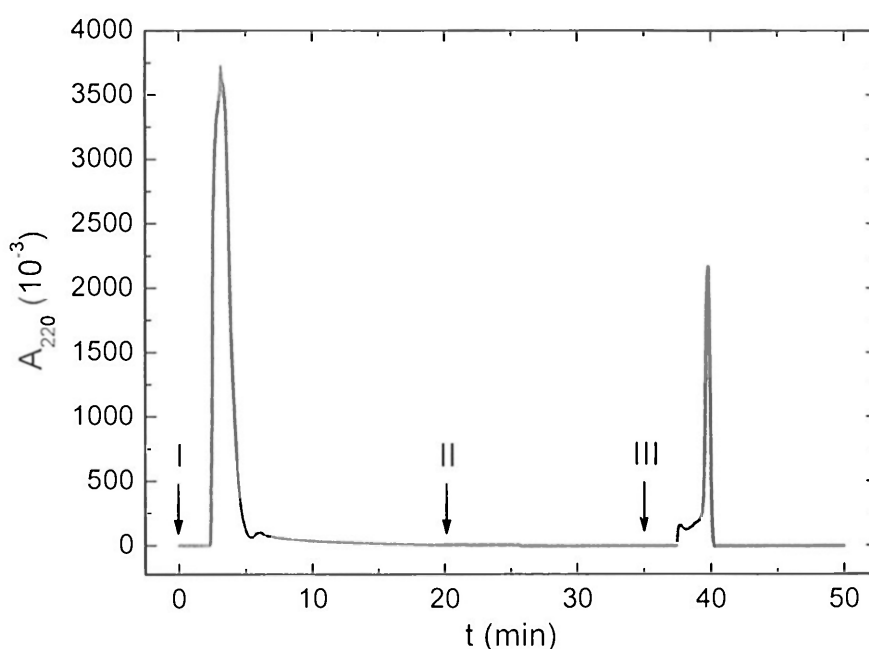
#### 4.3.2.1 Štěpení proteinů lidské žaludeční šťávy $\alpha$ -chymotrypsinem

Štěpení lyofilizátu lidské žaludeční šťávy získané od zdravého jedince bylo provedeno stejným způsobem jako štěpení prasečího pepsinu A. Proteiny byly nejdříve denaturovány močovinou, disulfidové můstky byly redukovány dithiothreitem a thiolové skupiny byly blokovány jodacetamidem. Štěpení bylo provedeno  $\alpha$ -chymotrypsinem.

#### 4.3.2.2 Izolace fosfopeptidů na sorbentech obsahujících $\text{Fe}^{3+}$ a $\text{Ga}^{3+}$ ionty a na $\text{TiO}_2$

Ze směsi peptidů získaných štěpením proteinů lidské žaludeční šťávy  $\alpha$ -chymotrypsinem byly na sorbentech obsahujících imobilizované  $\text{Fe}^{3+}$  nebo  $\text{Ga}^{3+}$  ionty nebo na  $\text{TiO}_2$  izolovány fosfopeptidy. Pro jejich adsorpci a desorpci byly převzaty podmínky, za nichž bylo dosaženo nejvyššího obohacení fosfopeptidu prasečího pepsinu A (tab. 4.10). Adsorbované peptidy byly ze sorbentů obsahujících imobilizované  $\text{Fe}^{3+}$  nebo  $\text{Ga}^{3+}$  ionty (špičky) eluovány 200 mM hydrogenfosforečnanem amonným pH 7,9, z HPLC sorbentu

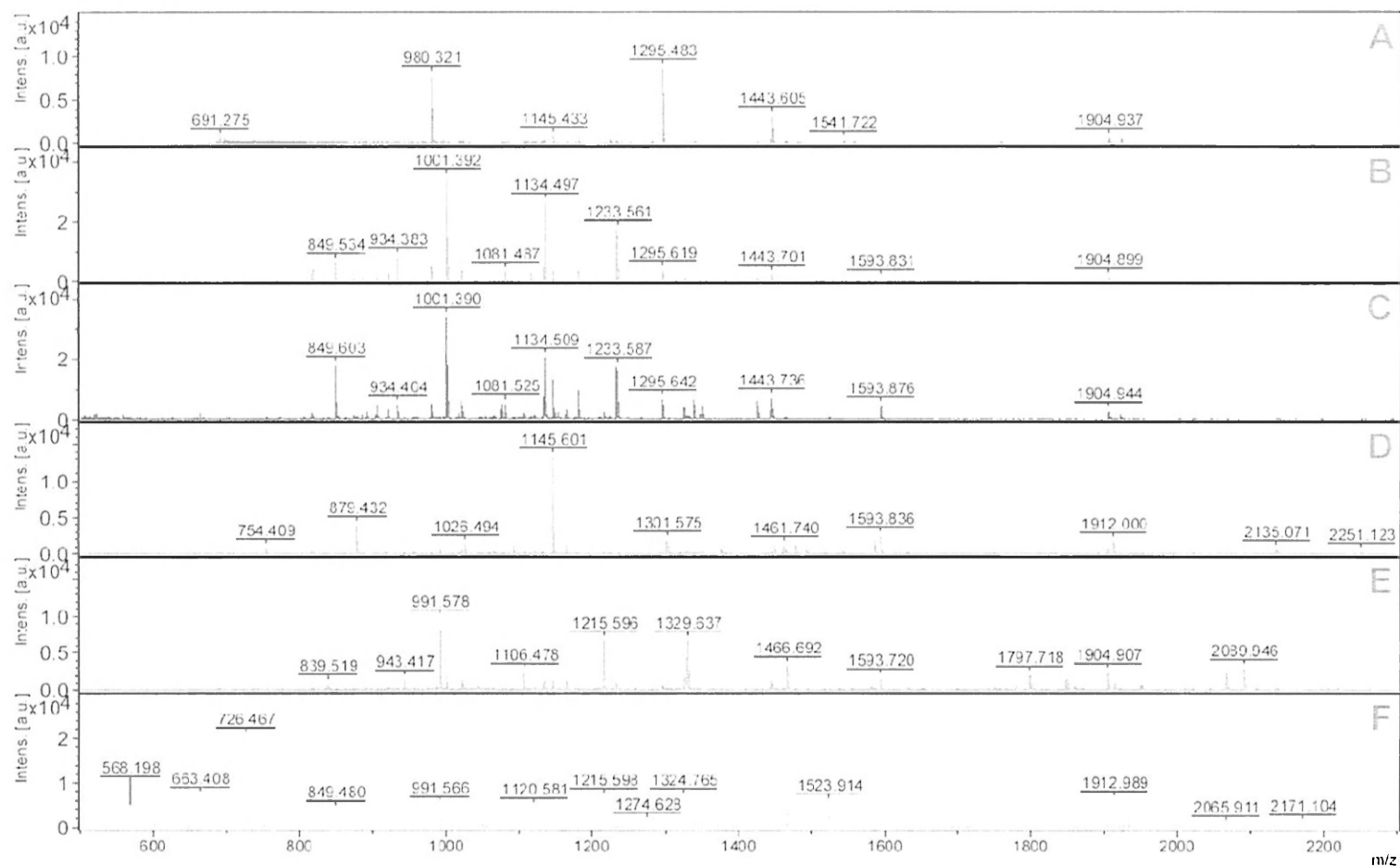
s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty a z  $\text{TiO}_2$  postupně 5 mM hydroxidem amonným pH 10,5 a 200 mM hydrogenfosforečnanem amonným pH 7,9. Roztok hydroxidu amonného z HPLC sorbentu s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty žádné peptidy nedesorboval; desorpce se zdařila až roztokem hydrogenfosforečnanu amonného (obr. 4.15). Získaná MS spektra eluátů ze sorbentů obsahujících  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty a z  $\text{TiO}_2$  jsou zobrazena na obr. 4.16. Intenzivní píky z jednotlivých MS spekter byly podrobeny MS/MS analýze a identifikovány pomocí vyhledávání v proteinové databázi.



Obr. 4.15: Separace peptidů z proteinů lidské žaludeční šťávy rozštěpených  $\alpha$ -chymotrypsinem na HPLC sorbentu s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty

Chromatografické podmínky: aplikováno 200  $\mu\text{l}$  směsi peptidů vzniklých štěpením lidské žaludeční šťávy  $\alpha$ -chymotrypsinem; I – 0,1% kyselina octová; II – 5 mM hydroxid amonný pH 10,5; III – 200 mM hydrogenfosforečnan amonný pH 7,9 (MALDI-TOF MS spektrum na obr. 4.16 A); průtoková rychlost 0,5 ml/min.





**Obr. 4.16:** MALDI-TOF MS analýza peptidů z proteinů lidské žaludeční šťávy desorbovaných ze sorbentů s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty a z  $\text{TiO}_2$

HPLC sorbent s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty – eluce 200 mM hydrogenfosforečnanem amonným pH 7,9 (A); sorbent s imobilizovanými  $\text{Ga}^{3+}$  ionty (špička) (B); sorbent s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  ionty (špička) (C);  $\text{TiO}_2$  (špička) – eluce 5 mM hydroxidem amonným pH 10,5 (D) a poté 200 mM hydrogenfosforečnanem amonným pH 7,9 (E); směs peptidů vzniklá rozštěpením proteinů lidské žaludeční šťávy  $\alpha$ -chymotrypsinem (vzorek) a odsolená na špičkách s C18 fází (F). Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tab. 4.10.

#### 4.3.2.3 Identifikace peptidů izolovaných na imobilizovaných kovových iontech a na $\text{TiO}_2$ z proteinů lidské žaludeční šťávy rozštěpených $\alpha$ -chymotrypsinem; určení fosforylačního místa lidského pepsinu A

Pro identifikaci fosfopeptidů z proteinů lidské žaludeční šťávy byly peptidy desorbované ze sorbentů s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Ga}^{3+}$  ionty a z  $\text{TiO}_2$  analyzovány MALDI-TOF/TOF MS. Identifikované peptidy jsou uvedeny v tab. 4.11. Bylo nalezeno šest fosfopeptidů\* ( $m/z$  934; 1001; 1081; 1134; 1233; 1295), z nichž čtyři byly identifikovány. Tři ( $m/z$  1081, 1134 a 1233) pocházely z lidského slinného kyselého PRP<sup>†</sup> 1/2 (viz tab. 4.11) a jeden ( $m/z$  1295) z lidského pepsinu/pepsinogenu A.

V lidském slinném kyselém PRP 1/2 byla identifikována dvě místa fosforylace. Jedna fosfátová skupina byla vázána na serinový zbytek v pozici 24, jak bylo zjištěno z MS/MS spektra iontu  $m/z$  1081 (sekvence DVpSQEDVPL). Druhá fosfátová skupina byla vázána na serinový zbytek v pozici 38, jak vyplynulo z MS/MS spekter iontů  $m/z$  1134 (sekvence ISDGGDpSEQF) a  $m/z$  1233 (sekvence VISDGGDpSEQF). Identifikovaná místa fosforylace v lidském slinném kyselém PRP 1/2 se shodují s údaji publikovanými v literatuře [182] a uvedenými v databázi Expasy (SIB, Ženeva, Švýcarsko).

Sekvence peptidového iontu  $m/z$  1295, jehož MS/MS spektrum je zobrazeno na obr. 4.17, byla identifikována jako QSTpSETVSITY a odpovídala zbytkům 127 – 137 lidského pepsinogenu A s fosforylovaným serinovým zbytkem v pozici 130 (tab. 4.11). Mascot přiřadil uvedené sekvenci (QSTpSETVSITY) skóre 59, což bylo výrazně nad limitem statistické významnosti (skóre 39) pro identitu/intenzivní homologii. Zjištění, že je fosfátová skupina vázána na serinovém zbytku lidského pepsinu/pepsinogenu A, se shoduje s dřívějším pozorováním, že některé izoformy lidského pepsinogenu A zdravých lidí obsahují fosfoserin [67]. Dále se ukázalo, že určené místo fosforylace (Ser130) se shoduje s pozicí předpovězenou Expasy (SIB, Ženeva, Švýcarsko) dle homologie s pepsinogeny A jiných živočišných druhů.

V MS spektru směsi peptidů získané proteolytickým štěpením proteinů lidské žaludeční šťávy<sup>‡</sup> (obr. 4.16 F) byl mimo jiné nalezen také peptidový ion  $m/z$  1215, který sice nebyl fosforylován, ale jehož sekvence (QSTSETVSITY) se shodovala se sekvencí peptidového iontu  $m/z$  1295 a odpovídala zbytkům 127 – 137 lidského pepsinogenu A. To by mohlo naznačovat, že ne všechny molekuly lidského pepsinu/pepsinogenu A jsou fosforylovány. Tento poznatek by odpovídal dřívějšímu zjištění, že u zdravých lidí jsou pouze některé izoformy lidského pepsinu/pepsinogenu A fosforylovány [67].

\*Peptidy byly označeny jako fosfopeptidy, pokud v MS/MS spektru vykazaly ztrátu 80 Da (ztráta  $\text{HPO}_3$ ) a/nebo 98 Da ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

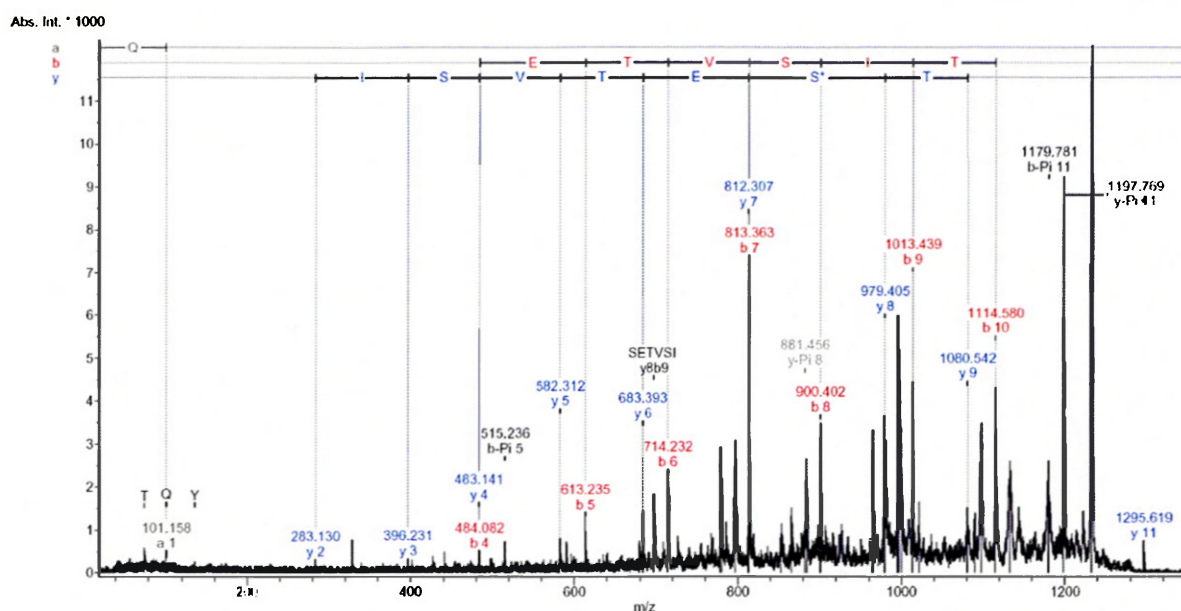
<sup>†</sup>PRP – „proline-rich phosphoprotein“

<sup>‡</sup>Pro odstranění mocoviny byl vzorek před MALDI-TOF MS analýzou purifikován na sorbentu s C18 fází naplněném ve špičce

Tab. 4.11: Identifikované peptidy a fosfopeptidy pocházející z proteinů lidské žaludeční šťávy

<i>m/z</i>	Protein	Sekvence		Skóre	Skóre pro identitu	„Missed cleavage“
849	lidský kathepsin D, kathepsin E, pepsinogen A nebo pepsinogen C	WILGDVFL		38	37	2
879	lidský kathepsin D, kathepsin E, pepsinogen A nebo pepsinogen C	DTGSSNLW		53	38	1
991	lidský pepsinogen C	DLGNNRVGF	376 – 384	38	38	1
1021	lidský pepsinogen C	WQIGIEEF	250 – 257	40	38	1
1023	lidský pepsinogen A	GLSETEPGSF	164 – 173	70	38	1
<b>1081</b>	<b>lidský slinný kyselý PRP 1/2</b>	DVpSQEDVPL	22 – 30 (24 fosfo)	41	40	0
1106	lidský pepsinogen A	VDEQPLENY	63 – 71	46	38	1
<b>1134</b>	<b>lidský slinný kyselý PRP 1/2</b>	ISDGGDpSEQF	32 – 41 (38 fosfo)	46	34	0
1145	lidský pepsinogen A	NLPTESGELW	352 – 361	73	69	1
1164	lidský pepsinogen C	GLSENEPGTNF	161 – 171	66	39	1
1176	lidský pepsinogen A	GTIGIGTPAQDF	78 – 89	79	38	0
1215	lidský pepsinogen A	QSTSETVSITY	127 – 137	59	40	0
<b>1233</b>	<b>lidský slinný kyselý PRP 1/2</b>	VISDGGDpSEQF	31 – 41 (38 fosfo)	56	36	0
<b>1295</b>	<b>lidský pepsinogen A</b>	QSTpSETVSITY	127 – 137 (130 fosfo)	59	39	0
1337	lidský pepsinogen A	LSADDQSGSVVIF	217 – 229	57	40	1
1349	lidský pepsinogen A	NWVPVTVEGYW	242 – 252	49	40	2
1443	lidský pepsinogen C	QATGAQEDEYGQF	294 – 306	66	40	1
1461	lidský pepsinogen A	QGMNLPTESGELW	349 – 361	56	39	1
1477	lidský pepsinogen A	QGoxidMNLPTESGELW	349 – 361	44	37	1
1593	lidský pepsinogen A	DTVQVGGISDTNQIF	149 – 163	71	41	0
1757	lidský pepsinogen A	VDEQPLENYLDMEY	63 – 76	67	40	3
1904	lidský pepsinogen A	VDEQPLENYLDMEYF	63 – 77	71	42	4
1912	lidský pepsinogen A	AYPSISSSGATPVFDNIW	186 – 203	76	41	1

Skóre – skóre přiřazené dané sekvenci programem Mascot; Skóre pro identitu – limit statistické významnosti pro identitu/intenzivní homologii; „Missed cleavage“ – počet vazeb, které nebyly v identifikovaném peptidu rozštěpeny  $\alpha$ -chymotrypsinem, ačkoliv měly být



Obr. 4.17: MALDI-TOF/TOF MS spektrum rodičovského iontu  $m/z$  1295,6

Pokrytí aminokyselinové sekvence je ukázáno a, b a y fragmentovými ionty. Ztráta 98 Da ( $m/z$  1197,7) ukazuje na monofosforylaci rodičovského peptidu. Rozdíl hmotností 167,1 Da mezi fragmentačními ionty y8 ( $m/z$  979,4) a y7 ( $m/z$  812,3) odpovídá fosfoserinovému zbytku; to indikuje fosforylaci na druhém serinovém zbytku.

Z naměřených MS spekter (obr. 4.16) a z uvedených výsledků identifikace peptidů (tab. 4.11) vyplývá, že nejvyššího obohacení fosfopeptidů bylo dosaženo na sorbentech s imobilizovanými  $\text{Fe}^{3+}$  nebo  $\text{Ga}^{3+}$  ionty naplněných ve špičkách. Naproti tomu nejmenší obohacení fosfopeptidů bylo pozorováno na  $\text{TiO}_2$  naplněném ve špičce. V eluátech z  $\text{TiO}_2$  bylo nalezeno velké množství nefosforylovaných peptidů. Navíc signály fosfopeptidů v MS spektrech eluátů měly velmi nízkou intenzitu. To mohlo být způsobeno potlačením jejich ionizace přítomnými nefosforylovanými ionty [17, 73].

### 4.3.3 Shrnutí

V této části práce byl na modelovém proteinu, prasečím pepsinu A, vypracován postup identifikace místa fosforylace. Postup zahrnoval nejprve rozštěpení pepsinu  $\alpha$ -chymotrypsinem, poté separaci fosfopeptidu na sorbentech obsahujících železité nebo galitové ionty nebo na oxidu titaničitým a nakonec analýzu MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrií. Ze získaných spekter pak byl pomocí vyhledávání v proteinové databázi identifikován fosfopeptid a určeno místo fosforylace. Vypracovaný postup byl použit pro proteiny lidské žaludeční šťávy zdravého jedince. Podařilo se identifikovat několik fosfopeptidů pocházejících ze dvou odlišných proteinů a určit místo fosforylace lidského pepsinu A.

## 5. Závěr

- Porovnali jsme schopnosti několika sorbentů určených pro vysokotlakou afinitní chromatografii na imobilizovaných kovových iontech (HP-IMAC) separovat intaktní fosfoproteiny – pepsin a ovalbumin. Ukázali jsme, že všechny testované sorbenty s výjimkou BP- $\text{UO}_2^{2+}$  mohou být použity pro HP-IMAC fosfoproteinů, ale nejlepších výsledků jsme dosáhli s IDA- $\text{Fe}^{3+}$  a BP- $\text{Ga}^{3+}$  sorbenty.
- Na modelovém proteinu, prasečím pepsinu A, jsme vypracovali metodu separace fosforylovaných a defosforylovaných forem pepsinu na sorbentech IDA- $\text{Fe}^{3+}$  a BP- $\text{Ga}^{3+}$ . Ukázali jsme, že na retenci pepsinu na těchto sorbentech se kromě fosfátových skupin pepsinů podílí i karboxylové skupiny. Separace fosforylované a defosforylované formy pepsinu jsme dosáhli po esterifikaci volných karboxylových skupin diazomethanem.
- Vypracovanou metodu separace fosforylovaných a nefosforylovaných forem prasečího pepsinu A vysokotlakou afinitní chromatografií na imobilizovaných železitých a galitých iontech jsme použili pro separaci lidských pepsinů. Z lidské žaludeční šťávy získané od zdravého jedince a z lidské žaludeční sliznice získané od pacienta trpícího karcinomem žaludku jsme nejprve iontově-výměnnou chromatografií izolovali lidské pepsiny, které jsme následně podrobili esterifikaci diazomethanem. Modifikované lidské pepsiny jsme separovali afinitní chromatografií na imobilizovaných železitých iontech v závislosti na přítomnosti fosfátových skupin v jejich molekulách. Dále jsme zjistili, že pepsiny pacienta s karcinomem žaludku měly vyšší stupeň fosforylace než pepsiny zdravého jedince.
- Pomocí modelového fosfoproteinu prasečího pepsinu A jsme vypracovali postup pro identifikaci fosforylačního místa pepsinu. Tento postup zahrnoval rozštěpení pepsinu  $\alpha$ -chymotrypsinem, dále separaci vzniklého fosfopeptidu afinitní chromatografií na imobilizovaných železitých nebo galitých iontech nebo afinitní chromatografií na oxidu titaničitém a nakonec analýzu MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometrií. Ze získaných spekter byl pak pomocí vyhledávání v proteinové databázi identifikován fosfopeptid a určeno místo fosforylace.
- Vypracovaný postup identifikace místa fosforylace jsme použili na proteiny lidské žaludeční šťávy, kterou jsme získali od zdravého jedince. Podařilo se nám identifikovat několik fosfopeptidů pocházejících ze dvou odlišných proteinů a určit místo fosforylace v lidském pepsinu A.

# Literatura

- [1] Pyerin W., Taniguchi H.: *EMBO J.* 8 (1989) 3003-3010.
- [2] Martinez A., Haavik J., Flatmark T., Arrondo J. L., Muga A.: *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 19737-19742.
- [3] Arena S., Benvenuti S., Bardelli A.: *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 2092-2099.
- [4] Seet B. T., Dikic I., Zhou M. M., Pawson T.: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7 (2006) 473-483.
- [5] Hunter T.: *Cell* 100 (2000) 113-127.
- [6] Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N.: *Cell Prolif.* 36 (2003) 131-149.
- [7] BurrIDGE K., Sastry S. K., Sallee J. L.: *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 15593-15596.
- [8] Sallee J. L., Wittchen E. S., BurrIDGE K.: *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 16189-16192.
- [9] Storey K. B.: *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 1670-1673.
- [10] Cohen P.: *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5001-5010.
- [11] Hjerrild M., Gammeltoft S.: *FEBS Lett.* 580 (2006) 4764-4770.
- [12] Reinders J., Sickmann A.: *Proteomics* 5 (2005) 4052-4061.
- [13] Ubersax J. A., Ferrell J. E. Jr.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 530-541.
- [14] Sickmann A., Meyer H. E.: *Proteomics* 1 (2001) 200-206.
- [15] Pas H. H., Robillard G. T.: *Biochemistry* 27 (1988) 5835-5839.
- [16] Han G., Ye M., Zou H.: *Analyst* 133 (2008) 1128-1138.
- [17] Halada P.: *Chem. Listy* 99 (2005) 922-929.
- [18] Nita-Lazar A., Saito-Benz H., White F. M.: *Proteomics* 8 (2008) 4433-4443.
- [19] Kennelly P. J., Potts M.: *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4759-4764.
- [20] Yan J. X., Packer N. H., Gooley A. A., Williams K. L.: *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 23-41.
- [21] Raggiaschi R., Gotta S., Terstappen G. C.: *Biosci. Rep.* 25 (2005) 33-44.
- [22] Dhanasekaran N., Premkumar Reddy E.: *Oncogene* 17 (1998) 1447-1455.
- [23] Beausoleil S. A., Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J. E., Villen J., Li J., Cohn M. A., Cantley L. C., Gygi S. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12130-12135.
- [24] Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S.: *Science* 298 (2002) 1912-1934.
- [25] Attwood P. V., Piggott M. J., Zu X. L., Besant P. G.: *Amino Acids* 32 (2007) 145-156.
- [26] Besant P. G., Attwood P. V.: *Biochim. Biophys. Acta* 1754 (2005) 281-290.
- [27] Kennelly P. J.: *FEMS Microbiol. Lett.* 206 (2002) 1-8.
- [28] Kobe B., Kampmann T., Forwood J. K., Listwan P., Brinkworth R. I.: *Biochim.*

- Biophys. Acta 1754 (2005) 200-209.
- [29] Obenauer J. C., Cantley L. C., Yaffe M. B.: *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3635-3641.
- [30] Johnson S. A., Hunter T.: *Nat. Methods* 2 (2005) 17-25.
- [31] Kennelly P. J., Krebs E. G.: *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 15555-15558.
- [32] Biondi R. M., Nebreda A. R.: *Biochem. J.* 372 (2003) 1-13.
- [33] Cornell T. T., Shanley T. P., v knize: *Pediatric Critical Care Medicine, Basic Science and Clinical Evidence* (Wheeler D. S., Wong H. R., Shanley T. P., eds.), kap. 17. Springer, London 2007.
- [34] Barford D., Das A. K., Eglhoff M. P.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27 (1998) 133-164.
- [35] Klumpp S., Kriegstein J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1754 (2005) 291-295.
- [36] Alonso A., Sasin J., Bottini N., Friedberg I., Friedberg I., Osterman A., Godzik A., Hunter T., Dixon J., Mustelin T.: *Cell* 117 (2004) 699-711.
- [37] Honkanen R. E., Golden T.: *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 2055-2075.
- [38] Stenberg K. A., Riikonen P. T., Vihinen M.: *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 369-371.
- [39] Lim Y. P.: *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 3163-3169.
- [40] Fusek M., Vetvicka V.: *Aspartic Proteinases*. CRC Press, Houston 1995.
- [41] Kageyama T.: *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 288-306.
- [42] Nielsen P. K., Foltmann B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 322 (1995) 417-422.
- [43] Chiang L., Sanchez-Chiang L., Mills J. N., Tang J.: *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 3098-3102.
- [44] Muto N., Murayama K., Akahane K., Tani S.: *J. Biochem.* 87 (1980) 717-723.
- [45] Kageyama T., Takahashi K.: *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 4395-4405.
- [46] Kageyama T., Takahashi K.: *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 4406-4419.
- [47] Kageyama T., Tanabe K., Koiwai O.: *Eur. J. Biochem.* 202 (1991) 205-215.
- [48] Samloff I. M.: *Gastroenterology* 57 (1969) 659-669.
- [49] Athauda S. B., Tanji M., Kageyama T., Takahashi K.: *J. Biochem.* 106 (1989) 920-927.
- [50] Tang J., Sepulveda P., Marciniuszyn J. Jr., Chen K. C., Huang W. Y., Tao N., Liu D., Lanier J. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 3437-3439.
- [51] Gritti I., Banfi G., Roi G. S.: *Pharmacological Research* 41 (2000) 265-281.
- [52] Richter C., Tanaka T., Yada R. Y.: *Biochem. J.* 335 (1998) 481-490.
- [53] Moravsek L., Kostka V.: *FEBS Lett.* 43 (1974) 207-211.
- [54] Ong E. B., Perlmann G. E.: *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 6104-6109.
- [55] Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y., Mizukami Y., Ichihara Y., Takahashi K.: *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5306-5311.
- [56] Hayana T., Sogawa K., Ichihara Y., Fujii-Kuriyama Y., Takahashi K.: *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 1382-1385.

- [57] Majercakova P., Kucerova Z., Desvaux F. X., Peltre G.: *Electrophoresis* 21 (2000) 2919-2924.
- [58] Tang J., v knize: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F., eds.), kap. 272. Academic Press, San Diego 1998.
- [59] Bohak Z.: *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 4638-4648.
- [60] Foltmann B., v knize: *Pepsinogens in Man, Clinical and Genetic Advances* (Kreuning J., Samloff I. M., Rotter J. I., Eriksson A. W., eds.), str. 1-13. Alan R. Liss, New York 1985.
- [61] Tang J., Hartley B. S.: *Biochem. J.* 118 (1970) 611-623.
- [62] Williams S. P., Bridger W. A., James M. N.: *Biochemistry* 25 (1986) 6655-6659.
- [63] Idrissa-Sidikou D., Remy B., Gerardin-Otthiers N., Joris B., Beckers J.-F.: *J. Anim. Vet. Adv.* 4 (2005) 891-901.
- [64] Meitner P. A., Kassell B.: *Biochem. J.* 121 (1971) 249-256.
- [65] Ryle A. P., Hamilton M. P.: *Biochem. J.* 101 (1966) 176-183.
- [66] Baudys M., Kostka V.: *Eur. J. Biochem.* 136 (1983) 89-99.
- [67] Jensen A. L., Foltmann B.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56 (1996) 69-74.
- [68] Hynek R., Kasicka V., Kucerova Z., Kas J.: *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 688 (1997) 213-220.
- [69] Majercakova P., Kucerova Z.: *Chem. listy* 94 (2000) 655.
- [70] Hynek R., Vankova H., Tesarova M., Kas J.: *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 24 (2001) 2801-2814.
- [71] Kučerová Z., v knize: *Současné směry v patologické fyziologii* (Janoušek V., špála M., ed.), str. 229. Univerzita Karlova, Praha 1989.
- [72] Delom F., Chevet E.: *Proteome Sci.* 4 (2006) 15.
- [73] Mamm M., Ong S. E., Gronborg M., Steen H., Jensen O. N., Pandey A.: *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 261-268.
- [74] Ballif B. A., Villen J., Beausoleil S. A., Schwartz D., Gygi S. P.: *Mol. Cell. Proteomics* 3 (2004) 1093-1101.
- [75] Gruhler A., Olsen J. V., Mohammed S., Mortensen P., Faergeman N. J., Mamm M., Jensen O. N.: *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 310-327.
- [76] Villen J., Beausoleil S. A., Gerber S. A., Gygi S. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 1488-1493.
- [77] Han G., Ye M., Zhou H., Jiang X., Feng S., Jiang X., Tian R., Wan D., Zou H., Gu J.: *Proteomics* 8 (2008) 1346-1361.
- [78] Brooks C. L., Isaacs L. A., Wicks J. R.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 99 (1994) 301-305.
- [79] Ramasubbu N., Reddy M. S., Bergey E. J., Haraszthy G. G., Soni S. D., Levine M. J.: *Biochem. J.* 280 (1991) 341-352.
- [80] Matsushima K., Shiroo M., Kung H. F., Copeland T. D.: *Biochemistry* 27 (1988)



- 3765-3770.
- [81] Wilden U., Kulm H.: *Biochemistry* 21 (1982) 3014-3022.
- [82] Aton B. R., Litman B. J., Jackson M. L.: *Biochemistry* 23 (1984) 1737-1741.
- [83] Kim B. G., Brooks C. L.: *Biochem. J.* 296 (1993) 41-47.
- [84] McDowell J. H., Nawrocki J. P., Hargrave P. A.: *Biochemistry* 32 (1993) 4968-1974.
- [85] Rush J., Moritz A., Lee K. A., Guo A., Goss V. L., Spek E. J., Zhang H., Zha X. M., Polakiewicz R. D., Comb M. J.: *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 94-101.
- [86] Zheng H., Hu P., Quinn D. F., Wang Y. K.: *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 721-730.
- [87] Blagoev B., Ong S. E., Kratchmarova I., Mann M.: *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1139-1145.
- [88] Gronborg M., Kristiansen T. Z., Stensballe A., Andersen J. S., Ohara O., Mann M., Jensen O. N., Pandey A.: *Mol. Cell. Proteomics* 1 (2002) 517-527.
- [89] Schmidt S. R., Schweikart F., Andersson M. E.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 849 (2007) 154-162.
- [90] Marcus K., Immler D., Sternberger J., Meyer H. E.: *Electrophoresis* 21 (2000) 2622-2636.
- [91] Gatti A.: *Anal. Biochem.* 321 (2003) 252-255.
- [92] Zhang G., Neubert T. A.: *Proteomics* 6 (2006) 571-578.
- [93] Matsuda H., Nakamura H., Nakajima T.: *Anal. Sci.* 6 (1990) 911-912.
- [94] Pinkse M. W., Uitto P. M., Hilhorst M. J., Ooms B., Heck A. J.: *Anal. Chem.* 76 (2004) 3935-3943.
- [95] Sano A., Nakamura H.: *Anal. Sci.* 20 (2004) 565-566.
- [96] Sano A., Nakamura H.: *Anal. Sci.* 20 (2004) 861-864.
- [97] Larsen M. R., Thingholm T. E., Jensen O. N., Roepstorff P., Jorgensen T. J.: *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 873-886.
- [98] Simon E. S., Young M., Chan A., Bao Z. Q., Andrews P. C.: *Anal. Biochem.* 377 (2008) 234-242.
- [99] Kweon H. K., Hakansson K.: *Anal. Chem.* 78 (2006) 1743-1749.
- [100] Zhou H. J., Tian R. J., Ye M. L., Xu S. Y., Feng S., Pan C. S., Jiang X. G., Li X., Zou H. F.: *Electrophoresis* 28 (2007) 2201-2215.
- [101] Han L., Shan Z., Chen D., Yu X., Yang P., Tu B., Zhao D.: *J. Colloid Interface Sci.* 318 (2008) 315-321.
- [102] Li Y., Liu Y., Tang J., Lin H., Yao N., Shen X., Deng C., Yang P., Zhang X.: *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 57-71.
- [103] Li Y., Lin H., Deng C., Yang P., Zhang X.: *Proteomics* 8 (2008) 238-249.
- [104] Ficarro S. B., Parikh J. R., Blank N. C., Marto J. A.: *Anal. Chem.* 80 (2008) 4606-4613.
- [105] Gooding K. M., Rassi Z. E., Horvath C., v knize: *HPLC of Biological Macromo-*

- lecules, Second Edition, Revised and Expanded* (Gooding K. M., Regnier F. E., ed.), kap. 6. Marcel Dekker, New York 2002.
- [106] Holmes L. D., Schiller M. R.: *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 20 (1997) 123-142.
- [107] Andersson L., Porath J.: *Anal. Biochem.* 154 (1986) 250-254.
- [108] Muszynska G., Andersson L., Porath J.: *Biochemistry* 25 (1986) 6850-6853.
- [109] Anguenot R., Yelle S., Nguyen-Quoc B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 365 (1999) 163-169.
- [110] Muszynska G., Dobrowolska G., Medin A., Ekman P., Porath J. O.: *J. Chromatogr.* 604 (1992) 19-28.
- [111] Kucerova Z., Majercakova P.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 523-531.
- [112] Kucerova Z., Kucera J.: *Chem. Listy* 94 (2000) 578.
- [113] Black T. M., Andrews C. L., Kilili G., Ivan M., Tsihchlis P. N., Vouros P.: *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2269-2276.
- [114] Li X., Gerber S. A., Rudner A. D., Beausoleil S. A., Haas W., Villen J., Elias J. E., Gygi S. P.: *J. Proteome Res.* 6 (2007) 1190-1197.
- [115] Moser K., White F. M.: *J. Proteome Res.* 5 (2006) 98-104.
- [116] Brill L. M., Salomon A. R., Ficarro S. B., Mukherji M., Stettler-Gill M., Peters E. C.: *Anal. Chem.* 76 (2004) 2763-2772.
- [117] Haydon C. E., Evers P. A., Aveline-Wolf L. D., Resing K. A., Maller J. L., Ahn N. G.: *Mol. Cell. Proteomics* 2 (2003) 1055-1067.
- [118] Posewitz M. C., Tempst P.: *Anal. Chem.* 71 (1999) 2883-2892.
- [119] Machida M., Kosako H., Shirakabe K., Kobayashi M., Ushiyama M., Inagawa J., Hirano J., Nakano T., Bando Y., Nishida E., Hattori S.: *FEBS J.* 274 (2007) 1576-1587.
- [120] Dubrovskaya A., Souchelnytskyi S.: *Proteomics* 5 (2005) 4678-4683.
- [121] Ficarro S. B., McClelland M. L., Stukenberg P. T., Burke D. J., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., White F. M.: *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 301-305.
- [122] Neville D. C. A., Rozanas C. R., Price E. M., Gruis D. B., Verkman A. S., Townsend R. R.: *Protein Sci.* 6 (1997) 2436-2445.
- [123] Zhang X., Ye J., Jensen O. N., Roepstorff P.: *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 2032-2042.
- [124] Cirulli C., Chiappetta G., Marino G., Mauri P., Amoresano A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 147-159.
- [125] Tsai C., Wang Y., Chen Y., Lai C., Lin P., Pan K., Chen J., Khoo K., Chen Y.: *J. Proteome Res.* 7 (2008) 4058-4069.
- [126] Imanishi S. Y., Kochin V., Eriksson J. E.: *Proteomics* 7 (2007) 171-176.
- [127] Trojer L., Stecher G., Feuerstein I., Lubbad S., Bonn G. K.: *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 197-207.

- [128] Zhou H., Ye M., Dong J., Han G., Jiang X., Wu R., Zou H.: *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3957-3967.
- [129] Yu Z., Han G., Sun S., Jiang X., Chen R., Wang F., Wu R., Ye M., Zou H.: *Anal. Chim. Acta* 636 (2009) 34-41.
- [130] Feng S., Ye M., Zhou H., Jiang X., Jiang X., Zou H., Gong B.: *Mol. Cell. Proteomics* 6 (2007) 1656-1665.
- [131] Kinoshita E., Yamada A., Takeda H., Kinoshita-Kikuta E., Koike T.: *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 155-162.
- [132] Sykora C., Hoffmann R., Hoffmann P.: *Protein Pept. Lett.* 14 (2007) 489-496.
- [133] Zhou W., Merrick B. A., Khaledi M. G., Tomer K. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 273-282.
- [134] Jaffe H., Veerama, Pant H. C.: *Biochemistry* 37 (1998) 16211-16224.
- [135] Oda Y., Nagasu T., Chait B. T.: *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 379-382.
- [136] Zhou H., Watts J. D., Aebersold R.: *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 375-378.
- [137] Vyetrogon K., Tebbji F., Olson D. J., Ross A. R., Matton D. P.: *Proteomics* 7 (2007) 232-247.
- [138] Kim S., Chudapongse N., Lee S., Levin M. C., Oh J., Park H., Ho I. K.: *Mol. Brain Res.* 133 (2005) 58-70.
- [139] Nakanishi T., Ando E., Furuta M., Tsumasawa S., Nishimura O.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 847 (2007) 24-29.
- [140] Kaufmann H., Bailey J. E., Fussenegger M.: *Proteomics* 1 (2001) 194-199.
- [141] Yamagata A., Kristensen D. B., Takeda Y., Miyamoto Y., Okada K., Inamatsu M., Yoshizato K.: *Proteomics* 2 (2002) 1267-1276.
- [142] Raggiaschi R., Lorenzetto C., Diodato E., Caricasole A., Gotta S., Terstappen G. C.: *Proteomics* 6 (2006) 748-756.
- [143] Zhang X., Herring C. J., Romano P. R., Szczepanowska J., Brzeska H., Hinnebusch A. G., Qin J.: *Anal. Chem.* 70 (1998) 2050-2059.
- [144] Larsen M. R., Sorensen G. L., Fey S. J., Larsen P. M., Roepstorff P.: *Proteomics* 1 (2001) 223-238.
- [145] Stensballe A., Andersen S., Jensen O. N.: *Proteomics* 1 (2001) 207-222.
- [146] Liao P. C., Leykam J., Andrews P. C., Gage D. A., Allison J.: *Anal. Biochem.* 219 (1994) 9-20.
- [147] Annan R. S., Carr S. A.: *Anal. Chem.* 68 (1996) 3413-3421.
- [148] Schmolzer M., Lehmann W. D.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 169/170 (1997) 263-271.
- [149] Klemm C., Otto S., Wolf C., Haseloff R. F., Beyermann M., Krause E.: *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 1623-1632.
- [150] Schmidt A., Csaszar E., Ammerer G., Mechtler K.: *Proteomics* 8 (2008) 4577-

- 4592.
- [151] Kjellstrom S., Jensen O. N.: *Anal. Chem.* 76 (2004) 5109-5117.
- [152] Kuyama H., Sonomura K., Nishimura O.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 1109-1116.
- [153] Asara J. M., Allison J.: *Am. Soc. Mass Spectrom.* 10 (1999) 35-44.
- [154] Raska C. S., Parker C. E., Dominski Z., Marzluff W. F., Glish G. L., Pope R. M., Borchers C. H.: *Anal. Chem.* 74 (2002) 3429-3433.
- [155] Carr S. A., Huddleston M. J., Amman R. S.: *Anal. Biochem.* 239 (1996) 180-192.
- [156] Amman R. S., Huddleston M. J., Verma R., Deshaies R. J., Carr S. A.: *Anal. Chem.* 73 (2001) 393-404.
- [157] Schlosser A., Pipkorn R., Bossemeyer D., Lehmann W. D.: *Anal. Chem.* 73 (2001) 170-176.
- [158] Steen H., Kuster B., Fernandez M., Pandey A., Mann M.: *Anal. Chem.* 73 (2001) 1440-1448.
- [159] Tawfik D. S., v knize: *The Protein Protocols Handbook, Second Edition* (Walker J. M., ed.), kap. 67. Humana Press, Totowa 2002.
- [160] Stout P. R., Claffey D. J., Ruth J. A.: *Drug Metab. Dispos.* 26 (1998) 689-700.
- [161] Sodeoka M., Sampe R., Kojima S., Baba Y., Usui T., Ueda K., Osada H.: *J. Med. Chem.* 44 (2001) 3216-3222.
- [162] Martin P., Trieu-Cuot P., Corre C., Ribadeau Dumas B.: *Biochimie* 64 (1982) 55-64.
- [163] Walker J. M., v knize: *The Protein Protocols Handbook, Second Edition* (Walker J. M., ed.), kap. 3. Humana Press, Totowa 2002.
- [164] Anson M. L., Mirsky A. E.: *J. Genet. Physiol.* 16 (1932) 59-63.
- [165] Nisbet A. D., Saundry R. H., Moir A. J. G., Fothergill L. A., Fothergill J. E.: *Eur. J. Biochem.* 115 (1981) 335-345.
- [166] The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 12th Edition on CD-ROM, Version 12.3 (Budavari S., ed.). Chapman & Hall/CRCnetBase, Boca Raton 2000.
- [167] Chaga G. S.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 313-334.
- [168] Porath J., Olin B., Granstrand B.: *Arch Biochem Biophys.* 1983 225 (1983) 543-547.
- [169] Collins M. O., Yu L., Coba M. P., Husi H., Campuzano I., Blackstock W. P., Choudhary J. S., Grant S. G.: *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5972-5982.
- [170] Tan F., Zhang Y., Mi W., Wang J., Wei J., Cai Y., Qian X.: *J. Proteome Res.* 7 (2008) 1078-1087.
- [171] Schlosser A., Bodem J., Bossemeyer D., Grummt I., Lehmann W. D.: *Proteomics* 2 (2002) 911-916.

- [172] Seeley E. H., Riggs L. D., Regnier F. E.: *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 81-88.
- [173] Greene C. R., Holt P. S.: *J. Immunol. Methods* 209 (1997) 155-164.
- [174] Scauff P., Yvon M., Pelissier J. P.: *J. Chromatogr.* 539 (1991) 425-432.
- [175] van Hekken D. L., Thompson M. P., Strange E. D.: *J. Dairy Sci.* 73 (1990) 2720-2730.
- [176] Perlmann G. E.: *J. Gen. Physiol.* 41 (1958) 441-450.
- [177] Molina A. C. T., Alli L., Konishi Y., Kermasha S.: *Food Chem.* 101 (2007) 1263-1271.
- [178] Bingham E. W., Farrell Jr. H. M., Dahl K. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 429 (1976) 448-460.
- [179] Wang J., Zhang Y., Jiang H., Cai Y., Qian X.: *Proteomics* 6 (2006) 404-411.
- [180] Nakajima N., Ikada Y.: *Bioconjug. Chem.* 6 (1995) 123-130.
- [181] Štosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebela M.: *Chem. Listy* 99 (2005) 896-905.
- [182] Inzitari R., Cabras T., Omnis G., Olmi C., Mastinu A., Sanna M. T., Pellegrini M. G., Castagnola M., Messina I.: *Proteomics* 5 (2005) 805-815.

## Publikace

Části této dizertační práce byly publikovány v odborném tisku v níže uvedených článcích a prezentovány na konferencích formou následujících posterů.

### Články:

- Sustrova B., Novotna L., Kucerova Z., Ticha M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 60 (2009) 22 – 28. (I. F. pro rok 2007: 1,973)
- Novotna L., Hruby M., Benes M. J., Kucerova Z.: *Chromatographia* 68 (2008) 381 – 386. (I. F. pro rok 2007: 1,145)
- Novotna L., Hruby M., Benes M. J., Kucerova Z.: *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1662 – 1668. (I. F. pro rok 2007: 2,632)
- Novotna L., Hruby M., Benes M. J., Kucerova Z.: *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 108 – 112. (I. F. pro rok 2005: 3,096)

### Postery:

- Novotná L., Kučerová Z.: Identifikace fosforylačních míst pepsinů. Analytické metody a zdravie človeka, Nový Smokovec, Slovensko 20. – 23. 10. 2008.
- Novotná L., Kučerová Z.: The Combination of IMAC ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ) and MALDI-TOF/TOF MS for Analysis of Pepsin Phosphorylation Sites. 14<sup>th</sup> International Symposium On Separation Sciences. New Achievements in Chromatography, Primošten, Chorvatsko 30. 9. – 3. 10. 2008.
- Novotná L., Kučerová Z.: Phosphorylation of Human Pepsin. 17. konference českých a slovenských patofyziologů, Praha 11. – 12. 9. 2008.
- Novotná L., Hrubý M., Beneš M. J., Kučerová Z.: Study of Pepsin Phosphorylation Using IMAC. 1<sup>st</sup> Central and Eastern European Proteomic Conference and 3<sup>rd</sup> Czech Proteomic Conference, Praha 29. – 31. 10. 2007.
- Novotná L., Hrubý M., Beneš M. J., Kučerová Z.: Immobilized Metal Affinity Chromatography as a Tool For Study of Pepsin Molecular Interaction. 13<sup>th</sup> International Symposium On Separation Sciences, Strbské pleso, Slovensko 27. – 29. 6. 2007.

- Novotná L., Hrubý M., Beneš M. J., Kučerová Z.: Chromatography of phosphorylated proteins on different IMAC stationary phases. *Advances in Chromatography and Electrophoresis 2007 & Chiranal 2007*, Olomouc 24. – 27. 6. 2007.
- Novotná L., Hrubý M., Beneš M. J., Kučerová Z.: Phosphate mediated sorption of porcine pepsin in IMAC. *11<sup>th</sup> International Symposium On Separation Sciences*, Pardubice 12. – 14. 9. 2005.
- Novotná L., Hrubý M., Beneš M. J., Kučerová Z.: Affinity Chromatography of Porcine Pepsin A Using Quinolin-8-ol as a Ligand. *12<sup>th</sup> International Symposium Advances and Applications of Chromatography in Industry*, Bratislava, Slovensko 29. 6. – 1. 7. 2004.
- Novotná L., Kučerová Z.: Afinitní chromatografie prasečího pepsinu A na 8-hydroxychinolinu. *5. studentská vědecká konference 1. LF UK*, Praha 24. 5. 2001.
- Novotná L., Hrubý M., Beneš M. J., Kučerová Z.: Purification of Phosphorylated Pepsin by Immobilized Metal ( $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$ ) Affinity Chromatography. *8<sup>th</sup> International Symposium on Polymer Designs for Bioseparation and Nanobiotechnology*, Compiègne, Francie 2003.