

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Enzymatická stabilita vybraných antimikrobiálních peptidů
z jedu hmyzu řádu Hymenoptera a jejich
strukturních analogů

Enzymatic stability of selected antimicrobial peptides
from the venom of the Hymenoptera order
and their structural analogs

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza



Vedoucí diplomové práce: RNDr. Václav Čerovský, CSc.

Praha 2009

Veronika Ševců

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Václava Čeřovského CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i a Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu.

V Praze dne 20. dubna 2009.

Veronika Ševců

Poděkování

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a byla podpořena grantem 203/08/0536 z Grantové Agentury České Republiky a výzkumným projektem Z40550506, ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

Za odborné vedení, velkou ochotu a cenné rady bych chtěla především poděkovat vedoucímu své diplomové práce RNDr. Václavu Čerovskému, CSc.

Dále děkuji RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za konzultace a ochotu s řešením problémů při obsluze hmotnostního spektrometru.

Také děkuji celému kolektivu v laboratoři za vytvoření přátelského prostředí.

Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům za všestrannou podporu během celého studia.

Seznam použitých zkratek a symbolů

A	alanin
ACN	acetonitril
Aib	kyselina aminoisomáselná
AMK	aminokyselina
AMPs	antimikrobiální peptidy
C	cystein
D	kyselina glutamová
E	kyselina asparagová
ESI	elektrosprej
F	fenylalanin
FA	kyselina mravenčí
G	glycin
G ⁺	grampozitivní
G ⁻	gramnegativní
H	histidin
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
I	isoleucin
K	lysin
kDa	kilodalton
L	leucin
LL-III	lasioglossin III
M	methionin
m/z	hmotnost/náboj
MALDI	ionizace laserem za spoluúčasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MEP	melectin
MS	hmotnostní spektrometrie
N	asparagin
Orn	ornithin
P	prolin

PDD-B peptid izolovaný z jedu vosy *Polistes dorsalis dorsalis*

Q glutamin

R arginin

RP-HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích

S serin

T threonin

TFA trifluoroctová kyselina

TOF analyzátor doby letu (time of flight)

t_R retenční čas

UV ultrafialové světlo

V valin

W tryptofan

Y tyrosin

OBSAH:

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY.....	9
2.1.1 Struktura α -helikálních AMPs.....	9
2.1.2 Výskyt.....	10
2.1.3 Mechanismus působení.....	12
2.1.4 Modely narušení bakteriální stěny.....	13
2.2 ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ.....	14
2.2.1 Vybraní zástupci.....	15
2.3 METODA HPLC.....	17
2.3.1 Mobilní fáze reverzního systému.....	18
2.3.2 Typy sorbentů používané pro kolony HPLC systému.....	19
2.3.3 Materiály stacionárních fází pro RP-HPLC.....	20
2.4 DETEKCE POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS).....	21
2.4.1 Ionizace vzorku.....	21
2.4.1.1 Technika MALDI.....	21
2.4.1.2 Ionizace pomocí elektrospreje.....	22
2.4.2 Hmotnostní analyzátoři.....	23
2.4.2.1 Kvadrupólový analyzátor.....	24
2.4.2.2 TOF- Analyzátor doby letu.....	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
3.1 REAGENCIE A MATERIÁL.....	25
3.2 INSTRUMENTACE.....	25
3.3 POSTUP.....	26
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	28
4.1. ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ MELECTINU (MEP).....	28
4.1.1 Štěpení MEP trypsinem.....	29
4.1.2 Štěpení MEP α -chymotrypsinem.....	31
4.1.3 Štěpení MEP subtilisinem.....	33
4.1.4 Štěpení MEP s bakteriální kulturou <i>Bacillus subtilis</i>	35
4.1.5 Štěpení MEP krevním sérem.....	36
4.2. ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ LASIOGLOSSINU III (LL-III) A JEHO ANALOGŮ.....	37
4.2.1 Štěpení LL-III s trypsinem.....	37
4.2.2 Štěpení LL-III α -chymotrypsinem.....	39
4.2.3 Štěpení LL-III krevním sérem.....	41
4.2.4 Štěpení LL-III/12 trypsinem.....	41
4.2.5 Štěpení LL-III/13 trypsinem.....	42
4.2.6 Štěpení LL-III/13 α -chymotrypsinem.....	43
4.2.7 Štěpení LL-III/19 trypsinem.....	43
4.2.8 Štěpení LL-III/21 subtilisinem.....	45
4.2.9 Štěpení LL-III/24 trypsinem.....	46
4.2.10 Štěpení LL-III/24 α -chymotrypsinem.....	48
4.3. ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ PEPTIDU PDD-B A JEHO ANALOGU.....	50
4.3.1. Štěpení PDD-B α -chymotrypsinem.....	50
4.3.2 Štěpení PDD-B-1 α -chymotrypsinem.....	51
5. ZÁVĚR.....	53
6. LITERATURA.....	55

1. Úvod

Když v roce 1928 Sir Alexandr Fleming objevil penicilin zdálo se, že je lidstvo před hrozbami bakteriálních infekcí zachráněno. Lidé si zvykli užívat antibiotika na vše. Lékaři často předepisovali antibiotické léky chybně (proti rezistentnímu původci) nebo nadbytečně (např. při virových infekcích). Pacienti pod vlivem subjektivního zlepšení přestávali s terapií příliš brzy, čímž se neznížily nejvíce odolné kmeny, které se mohly dále pomnožit a mutovat. Dříve se přidávaly antibiotika jako stimulatory růstu do krmných směsí hospodářských zvířat pro větší přírůstky [1-3]. Dnes již víme, že toto vše zapříčiňuje nárůst rezistence mikroorganismů proti antibiotikům. Donedávna velmi účinná tradiční antibiotika jsou dnes v některých případech nefunkční. Proto je třeba hledat nové možnosti léčby.

Jedním z teoretických možností se zdají být antimikrobiální peptidy (AMPs), které mají jiný mechanismus účinku než tradiční antibiotika. K zavedení nového léku do praxe je ale velmi dlouhá cesta a my stojíme na úplném začátku. Doposud bylo objeveno velké množství peptidů, které mají antimikrobiální účinek na řadu mikrobiálních kmenů. Databáze AMPs již obsahuje více jak 950 AMPs. Účinkují jak proti grampozitivním bakteriím (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*,...), tak i proti gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*,...). Řada z nich však poškozují i eukaryotní buňky, což znamená, že mohou být toxické vyšším živočichům. V laboratoři se míra jejich toxicity jednoduše stanovuje měřením tzv. hemolytické aktivity. Vysoká hemolytická aktivita tedy omezuje jejich použití v praxi. [2,4,5,6]. Antimikrobiální peptidy by v nejbližší době měly najít uplatnění především při topických aplikacích, jako třeba při léčení vážného syndromu diabetické nohy.

Nežádoucí vlastností je i jejich omezená stabilita v přítomnosti proteolytických enzymů, kterému by byly *in vivo* vystaveny. Tato diplomová práce je zaměřena právě na problematiku enzymatické stability vybraných AMPs. Jejím cílem bylo charakterizovat stabilitu přirozených AMPs (a jejich analogů se zaměněnými AMK v sekvenci) v přítomnosti daných proteolytických enzymů v závislosti na době enzymatického působení. Obě varianty peptidů, přírodní i pozměněné (analogy), mají antimikrobiální aktivity a jsou tedy potenciálními nástroji pro další výzkum v oblasti léčby bakteriálních

infekcí. Zároveň bylo cílem identifikovat peptidové fragmenty enzymatického štěpení. Jinými slovy, určit polohy enzymatického štěpení peptidových vazeb v sekvenci peptidů. K tomu byly využity metody RP-HPLC a hmotnostní spektrometrie. Získané výsledky byly diskutovány s literárními údaji o specifitě proteolytických enzymů.

2. Teoretická část

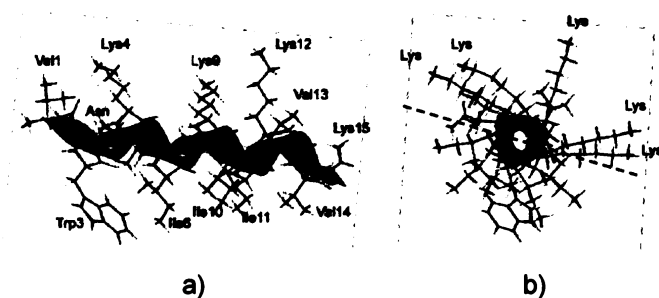
2.1 Antimikrobiální peptidy

Mnohobuněčný organismus se neustále brání proti útokům mikrobů. K tomu organismu slouží celá řada mechanismů. Setkáváme se s pojmy humorální a buněčná imunita, imunita získaná a vrozená. Vrozená humorální imunita zahrnuje i pojem antimikrobiální peptidy.

2.1.1 Struktura α -helikálních AMPs

Peptidy obecně jsou organické látky skládající se z aminokyselin. V přírodě vznikají proteosyntézou na ribozomech jako bílkoviny a poté jejich štěpením na peptidové fragmenty, je ale známa i neribozomální syntéza [2,3].

Nejvíce studované jsou lineární, kationické, α -helikální peptidy. To je skupina peptidů, tvořených 10- až 40-ti aminokyselinovými zbytky. Většinou jejich řetězec obsahuje bazické AMK lysin, arginin nebo histidin, které dávají molekule kladný náboj (kationické aminokyseliny). Ty se střídají s aminokyselinami hydrofobními (Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp) [3,9,10]. Pokud se na α -helikální molekulu podíváme ve směru osy spirály, vidíme ji jako kružnici s aminokyselinovými zbytky po obvodu (Obr. 2.1).



Obr. 2.1 Struktura amfipatického helixu lasioglossinu III s aminokyselinovými zbytky rozmístěnými do prostoru; a) pohled laterální, b) pohled v ose helixu, červeně je naznačeno rozhraní hydrofobního a hydrofilního sektoru [5].

Pro jednoduchost se amfipatické struktury těchto peptidů většinou znázorňují tzv. Schiffer-Edmunsonovým diagramem. Tato projekce odhaluje důmyslnost stavby peptidu, kdy vidíme, že jedna strana α -helikálního peptidu má hydrofobní a protilehlá

bolest, zánět, místní tkáňové poškození a mohou způsobit až smrt i větších obratlovců.

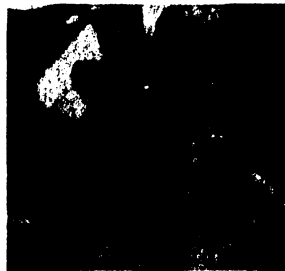
V této práci byly použity antimikrobiální peptidy nalezené v jedových rezervoárech divokých včel a vos. Konkrétně jde o druhy: *Melecta albifrons* (melectin), *Lasioglossum laticeps* (lasioglossin III) a *Polistes dorsalis dorsalis* (peptid PDD-B).

Druh *Melecta albifrons* (Obr. 2.3) náleží mezi kleptoparazitické včely, také nazývané „kukaččí včely“. Jak už název napovídá, nestaví si vlastní hnízdo, ale vniká do hnízd jiných včel a klade svá vajíčka do jejich pláství. Když se larva vylíhne, požírá potravinové zásoby hostitelské larvy a nakonec i samotnou larvu [4].



Obr. 2.3 *Melecta albifrons* [15]

Lasioglossum laticeps (Obr. 2.4) patří mezi divoké eusociální včely – žijící ve společenství. Hnízda si staví v jílovité hlíně nebo v puklinách kamenných zdí. Vyskytují se po celé Evropě [5].



Obr. 2.4 *Lasioglossum laticeps* [16]

Poslední zmíněná je neotropická sociální vosa *Polistes dorsalis dorsalis* (Obr. 2.5), která žije v poměrně velkých společenstvích. Jako většina vos si staví papírová hnízda ze ztrouchnivělého dřeva. Vyskytuje se převážně na americkém kontinentě, v Karibiku a Africe [6].



Obr. 2.5 *Polistes dorsalis dorsalis* [17]

Uvedené druhy patří do řádu blanokřídlých – *Hymenoptera*. Složení jedu hmyzu tohoto řádu je intenzivně studováno. Byla izolována celá řada enzymů (hyaluronidasa, fosfolipasa A₂, fosfolipasa B), nízkomolekulárních látek, neurotoxinů a početná skupina středně velkých biologicky aktivních peptidů. Nejvíce jsou studované peptidy, například mastoparany způsobující po bodnutí degranulaci žírných buněk (mast cells) a následné vyplavení histaminů způsobující bolest, chemotaktické peptidy, které vyvolávají atrakci leukocytů do místa vpichu, kininy způsobující bolest obratlovců nebo paralýzu loveného hmyzu [18]. Dále byly popsány cytolytické bombolitiny z jedu čmeláků a ponericyny z jedu mravenců podčeledi *Ponerinae*. Z hlediska dalšího výzkumu jsou z vyjmenovaných zajímavé hlavně mastoparany a ponericyny, které vykazují aktivitu proti široké škále G⁺ i G⁻ bakterií [4]. Mastoparany jsou kationické, α-helikální peptidy složené ze 14 aminokyselin mající na C-konci Leu-NH₂. Některé z nich, kromě toho, že mají silný antimikrobiální účinek [6], narušují i strukturu membrán červených krvinek, čímž způsobují hemolýzu [5].

2.1.3 Mechanismus působení

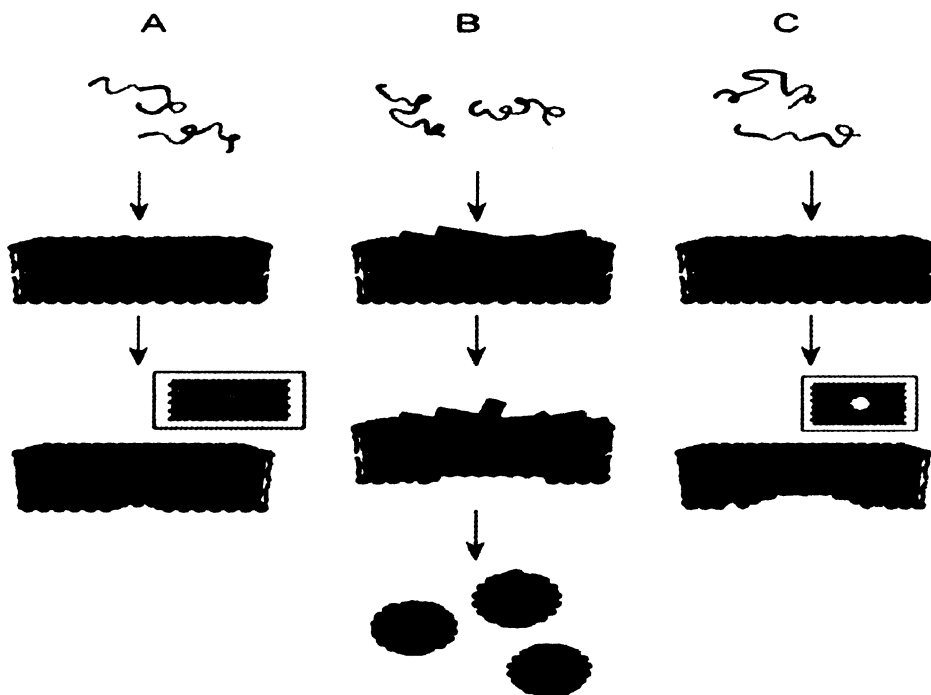
Mechanismus působení AMPs spočívá hlavně v narušení struktury buněčné membrány mikrobů vedoucí k její perforaci či úplnému rozpadu a tím v konečné fázi ke smrti bakterie. Je ale též známo i jejich působení na vnitrobuněčný aparát. Charakteristickým znakem α-helikálních AMPs je zvyšování iontové propustnosti lipidové membrány. Děje se tak přímým kontaktem peptidu s buňkou bez nutnosti zapojení specifických receptorů. Hlavním mechanismem většiny AMPs je tvorba póru a rozptýlení elektrochemického gradientu. Nejdůležitějším faktorem specifity působení

AMPs na prokaryotní buňku místo eukaryotní je odlišnost v lipidovém složení bakteriální a eukaryotní buňky. Vnější vrstva eukaryotní buněčné membrány je složena ze zwiterionních fosfolipidů, zatímco bakteriální membrána obsahuje větší množství záporně nabitých fosfolipidů na obou stranách membrány. Anionický charakter povrchu prokaryotní buňky umožňuje vazbu kationických AMPs přednostně než u eukaryotní buňky. Druhým faktorem selektivity je pravděpodobně nepřítomnost cholesterolu v bakteriálních membránách (narozdíl od buněk eukaryotních), čímž se snižuje odolnost membrány. Dalším faktorem je záporný potenciál membrány bakterie, který usnadňuje vznik iontových kanálů. A v neposlední řadě je to velikost (počet AMK) AMPs, díky níž se snadno vnořují do membrány bakterií [9,10,19].

2.1.4 Modely narušení bakteriální stěny

Jak již bylo zmíněno výše, molekuly AMPs se skládají do amfipatického α -helixu s hydrofobními AMK na jedné straně a hydrofilními na protější straně. Interakce mezi molekulou AMPs a fosfolipidovou vrstvou buněčné membrány probíhá na základě polarity. Polární část AMPs se váže na polární „hlavy“ (zbytky kyseliny fosforečné) buněčné membrány, kdežto hydrofobní část se přidruží k lipidickým „ocasům“. Dle způsobu vnoření peptidu do membrány rozeznáváme 3 modely mechanismu působení AMPs [10].

Všechny tři modely začínají nasednutím peptidu na povrch membrány a jejich seskupením do sekundární struktury amfipatického α -helixu. V případě, že převládají hydrofobní interakce, peptid se vsune kolmo do membrány a vytvoří pór po celé tloušťce membrány. Tento typ se nazývá „soudkový“ (barrel-stave) (Obr. 2.6 A). Pokud v přeskupení peptidového řetězce brání silné elektrostatické síly mezi pozitivně nabitým řetězcem aminokyselinových zbytků a fosfolipidovými hlavami, zůstane řetězec paralelně s membránou a vytvoří na ní „koberec“. Při zvýšené koncentraci peptidu dochází ke vzniku tak velkého napětí na membráně, že může dojít až k rozpadu membrány (Obr. 2.6 B). Takto většinou působí kratší AMPs. V třetím modelu dochází k usnadnění zakřivení povrchu membrány z jedné strany až na druhou. Fosfolipidové hlavice se vážou po celém povrchu peptidu a společně utvářejí prsteneц póru (Obr. 2.6 C) [10,20,21].



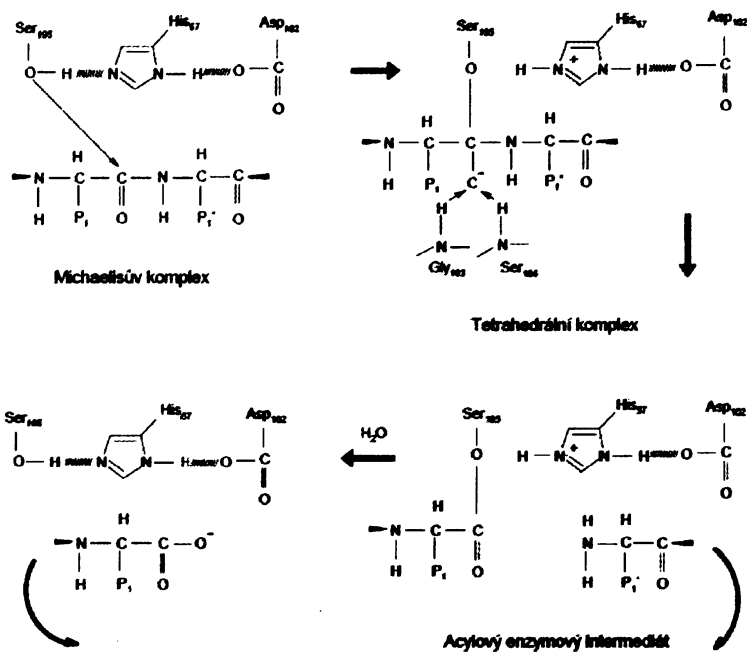
Obr. 2.6 Mechanismus působení α -helikálních AMPs; A) typ soudkový, B) typ koberecový, C) typ prstencový; modře jsou značeny hydrofilní části, šedě hydrofobní [10]

2.2 Enzymatické štěpení

Enzymy jsou biokatalyzátory chemických reakcí. Vazba substrátu na aktivní místo enzymu probíhá na základě prostorového uspořádání. Pokud je přístup k aktivnímu centru blokován, nemůže dojít k reakci [7, 8, 22].

Enzymy štěpící peptidovou vazbu se nazývají proteázy. Podle E.C. klasifikace se řadí k hydrolasam, konkrétně působícím na peptidové vazby (E.C. 3.4) [22]. Podle místa působení je lze dělit na dvě velké skupiny a to exopeptidázy a endopeptidázy. Exopeptidázy atakují peptidovou vazbu na koncích řetězce, endopeptidázy uvnitř řetězce. Podle struktury katalytického místa dělíme endopeptidázy na serinové, cysteinové, aspartátové a jiné. [23].

Největší skupinou proteolytických enzymů jsou serinové proteázy. V jejich aktivním centru figuruje reaktivní serinový zbytek, který zajišťuje mechanismus katalýzy (Obr. 2.7). Dochází k předávání protonu mezi katalytickou triádou Ser, His, Asp. Optimální podmínky jsou při pH 7-11, jejich izoelektrické body se pohybují od pH



Obr. 2.7 Mechanismus působení serinových peptidas, konkrétně trypsinu [24]

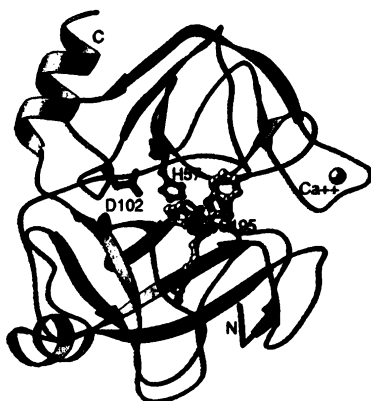
4,4 do 6,2 a molekulové hmotnosti jsou mezi 18,5 – 35 kDa.

Proteázy štěpí peptidy a bílkoviny na specifických místech. Tato specifita nezáleží na délce řetězce, ale na charakteru AMK a blízkosti nabitých skupin [23, 24].

Pojmem stabilita enzymu se rozumí schopnost enzymu zachovat si aktivitu při různých podmínkách okolního prostředí. Hlavní faktory, které mohou ovlivňovat stabilitu enzymu, jsou pH prostředí, teplota, a doba působení. Optimální pH souvisí s prostorovým uspořádáním molekuly enzymu, které se různí v závislosti na koncentraci H^+ iontů. Dalšími faktory jsou např. iontová síla, relativní permitivita, redoxní potenciál (pokud je v aktivním centru -SH nebo -S-S- skupina) a i koncentrace bílkovin v samotném roztoku [22].

2.2.1 Vybraní zástupci

Nejvýznamnější z těchto enzymů je trypsin (E.C. 3.4.21.4). Díky poměrně jednoduché struktuře a snadné dostupnosti je trypsin nejčastěji využívaným a nejstudovanějším enzymem. Je to celkem malý enzym o molekulové hmotnosti 23,3 kDa, vyskytující se ve formě monomeru. Kofaktorem je iont Ca^{2+} (Obr. 2.8), jenž má stabilizující účinek.



Obr. 2.8 Struktura trypsinu; detailně rozepsané aktivní místo se *Ser₁₉₅*, *His₅₆*, *Asp₁₀₂* a znázornění umístění kofaktoru Ca^{2+} [25].

Optimální pH má v mírně alkalickém prostředí (oblast pH 7-9) [23]. Trypsin štěpí proteiny na karboxylové straně bazických AMK, tedy lysinu a argininu (Tabulka 2.1), pokud ovšem nenásleduje prolin (v pozici AMK_y). Obecně platí, že vazba lysinu je štěpena rychleji než vazba s argininem [24, 27].

Tabulka 2.1: Specifita použitých proteolytických enzymů

Enzym	AMK_x	AMK_y
Trypsin	K, R, H, Orn	nespecifické
α -chymotrypsin	Y, W, F, L, M	K, R
Subtilisin	hydrofobní AMK	G, S, T

Obecně platí, je-li $AMK_y = P$, ke štěpení nedochází

AMK_x = aminokyselina poskytující COOH do peptidové vazby

AMK_y = aminokyselina poskytující NH_2 do peptidové vazby

α -chymotrypsin (E.C. 3.4.21.1) je další ze serinových proteáz. Tento enzym hydrolyzuje přednostně peptidové vazby vycházející z karboxylové skupiny aromatických aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu a dále leucinu a methioninu. Jestliže následující AMK je prolin, k štěpení nedochází (Tabulka 2.1). Nachází-li se v pozici AMK_y kyselá aminokyselina (D, E), rychlost hydrolýzy výrazně klesá. Naopak přítomnost bazické aminokyseliny v pozici AMK_y štěpení podstatně urychluje [24,27].

Subtilisin (E.C. 3.4.21.14) je vysoce termostabilní enzym a je produkován bakteriemi rodu *Bacillus*. Kofaktorem jsou ionty Ca^{2+} . Je to nespecifická proteáza, která

katalyzuje štěpení celé řady peptidových vazeb s jistou preferencí velkých nenabitých aminokyselinových zbytků v pozici AMK_x a hydrofilních zbytků v pozici AMK_y [24, 27].

Výsledek štěpení peptidů těmito enzymy však může být oproti očekávání někdy překvapivý, a to díky vlivu dalších aminokyselinových zbytků sousedících s uvažovanou peptidovou vazbou [24,27].

2.3 Metoda HPLC

Chromatografie je separační metoda založená na dělení složek analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). To se děje na základě různých chemicko-fyzikálních interakcí. Klasická kapalinová chromatografie vyhovuje pouze pro separace jednodušších směsí, ale složitější směsi se na ní prakticky rozdělit nedají. Proto byla na počátku 70. let vyvinuta vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) [28].

Podle mechanismu separace se kapalinová chromatografie dělí na několik technik: adsorpční (LSC), gelová permeační (GPC), iontově-výměnná (IEC) a rozdělovací (LLC). Rozdělovací chromatografii můžeme dále charakterizovat podle polaritě kapalných fází na systém s normálními fázemi a na systém s obrácenými fázemi. Systémem s normálními fázemi se rozumí uspořádání s polární stacionární fází (nemodifikovaný silikagel) a nepolární mobilní fází. Nejméně polární analyty jsou v tomto systému eluovány nejdříve, protože jsou nejméně zadržovány stacionární fází. Tento systém je vhodný pro dělení polárních látek. V chromatografii na obrácených fázích je tomu naopak. Stacionární fáze je nepolární (např. modifikovaný silikagel) a mobilní fáze polární (např. směs acetonitril-voda). Retenční časy závisí na chemické struktuře látky a síle interakcí se stacionární fází (hydrofobicitě - H) a jsou za daných podmínek (teplota, pH, složení mobilní fáze) pro danou látku konstantní [28].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fází (RP-HPLC) se v současné době stává nejrozšířenější metodou pro rychlou separaci proteinů a to hlavně díky své univerzálnosti, velké účinnosti a selektivitě. [26-29].

2.3.1 Mobilní fáze reverzního systému

Mezi obecné požadavky kladené na mobilní fázi pro HPLC systém patří co nejnižší viskozita, aby byl zajištěn optimální průtok mobilní fáze. Dále chemická netečnost vůči separovaným látkám, minimální těkavost, hořlavost a samozřejmě i toxicita [30].

Jak již bylo zmíněno výše, pro chromatografii na reverzní fázi se používá polární mobilní fáze. Je tvořena směsí organického rozpouštědla a vody. Nejrozšířenějším organickým rozpouštědlem pro kapalinovou chromatografii na reverzní fázi je acetonitril (ACN). Předností ACN je hlavně to, že neabsorbuje UV světlo v oblasti nízkých vlnových délek, což je třeba využito při detekci peptidů jejichž hlavním chromoforem je peptidová vazba. Experimentálně se zde volí vlnová délka 210 – 225 nm, obsahuje-li peptid další chromofor (aromatické aminokyseliny) pak je jej možno detekovat třeba při 280 nm. Výhodná je i téměř lineární závislost tlaku mobilní fáze na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Mezi další organická rozpouštědla patří např. methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol. Ty ovšem nemají lineární závislost tlaku na množství organické složky.

Při separaci peptidů je vhodné do mobilní fáze přidat iontově-párová činidla v nízké koncentraci (0,05 – 0,1%). Jsou to amfifilní látky, které kombinací hydrofobních a elektrostatických interakcí zajistí zvýšení účinnosti separace. Nejčastěji je používána kyselina trifluoroctová (TFA), dále lze využít kyselinu pentafluoropentanovou nebo kyselinu heptafluorobutanovou (HFBA). Tyto kyseliny absorbují při 190 nm, takže neruší při stanovení peptidů a jsou dostatečně těkavé, aby se před dalším zpracováním izolované látky (například po preparativní chromatografii) z roztoku lehce odstranily odpařením či lyofilizací. Dále lze použít trimethylamoniumfosfát, který usnadní eluci při nízké koncentraci acetonitrilu. Váže se na zbytkové silanové skupiny stacionární fáze a tím potlačuje jejich interakci s peptidy [29, 30].

Rozpustnost peptidů je ovlivněna jejich aminokyselinovým složením. Většina peptidů se rozpouští přímo ve vodě nebo fosfátovém pufru. Nejméně rozpustné jsou peptidy v oblasti svého izoelektrického bodu (pI). Kyselé peptidy se v kyselém pH špatně rozpouští nebo se mohou srážet. K rozpuštění pomůže zvýšení pH. Naopak

bazické peptidy potřebují k rozpuštění snížení pH. Pokud peptid obsahuje více hydrofobních aminokyselin je většinou nutné přidat organické rozpouštědlo [31].

Peptidy můžeme dělit při nízkém pH s využitím negativně nabitého iontově-párovacího činidla (TFA, FA, HFBA) nebo při vysokém pH s kladně nabitým amfifilním činidlem (octan amonný, trietylamonium-acetát). Většinou se ale využívá oblasti pH mobilní fáze 2 – 4. Při tomto pH dochází k potlačení ionizace kyseliny asparágové a glutamové (pKa postranního řetězce Asp je 3,86 a Glu 4,07). Bazické AMK jako lysin, arginin, histidin (pKa postranního řetězce Arg je 12,48; Lys 10,79 a His 6,04) se vyskytují ve formě kationtů a mohou tvořit komplexy s iontově-párovacími činidly [32].

Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (technika LC-MS) mohou provázet problémy způsobené iontově-párovacími látkami a zhoršovat detekci pomocí ESI-MS. Nejčastěji používaná kyselina trifluoroctová je silným elektrolytem a soupeří s analytem v ionizaci a snižuje možnost ionizace biomolekuly. Při off-line uspořádání se TFA spolu s rozpouštědlem jednoduše odstraní odpařením. Pro zlepšení MS detekce lze přidat kyselinu octovou nebo mravenčí [33,34].

2.3.2 Typy sorbentů používané pro kolony HPLC systému

Materiál pro výrobu kolon k použití pro HPLC musí vyhovovat hned několika kritériím. Musí odolat relativně vysokým tlakům a zároveň chemickému působení jak mobilní fáze, tak i separovaných složek.

K separaci biopolymerů se hodí náplně kolon s většími objemy pórů, aby se zlepšila difúze k povrchu stacionární fáze a snížil se odpor proti převodu hmoty a tím se zvýšila účinnost kolony. Používaný průměr částic je obvykle 5 μm , s velikostí pórů 10-30 nm. Nevýhoda kolon plněných částicemi je velký mezičásticový prostor. U biomolekuly s nízkou difuzivitou se to projeví pomalým přenosem hmoty mezi mobilní fází uvnitř pórů částic. Při separaci peptidů je možno využít neporézních částic obsahujících jen úzké póry o průměru 0,2 až 0,4 nm, které jsou pro peptidy velikostně nedostupné. Nevýhodou je příliš malý povrch částic. Výhodou tohoto druhu stacionární fáze je rychlý přenos hmoty, možnost kontroly topografie ligandů navázaných na povrch, kratší pobyt analytů v koloně (tím se zabrání denaturaci peptidů) [29,30,34].

2.3.3 Materiály stacionárních fází pro RP-HPLC

V současné době existuje a stále je nově vyvíjeno velké množství materiálů stacionárních fází používaných v RP-HPLC systémech. Jde o různé polymerní materiály jako např. divinylbenzen zesíťovaný polystyrenem, anorganické oxidy hliníku, zirkonia nebo titanu nebo různě modifikovaný silikagel [26].

Právě modifikovaný silikagel má v současnosti největší uplatnění na poli separace peptidů. Jeho hojné využívání v praxi je důsledkem jeho mnoha pozitivních vlastností. Hlavním kladem je možnost navázání různých ligandů (Tabulka 2.2), odolnost vůči vyšším tlakům (až 40 MPa) a stabilita velikosti pórů.

Tabulka 2.2: Skupiny používané k modifikacím silikagelových stacionárních fází

<p>C₄ – butyl</p> $\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_4\text{H}_9 \\ \end{array}$	<p>Diol</p> $\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CHCH} \\ \qquad \qquad \qquad \quad \\ \qquad \qquad \qquad \quad \text{O} \quad \text{O} \end{array}$
<p>C₁₈ – otadecyl</p> $\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37} \\ \end{array}$	<p>Fenyl</p> $\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Phe} \\ \end{array}$
<p>CN – kyanopropyl</p> $\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN} \\ \end{array}$	<p>NH₂ – aminopropyl</p> $\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \\ \end{array}$

Techniky přípravy velice čistého silikagelu stejně jako postupy zakotvení modifikačních skupin jsou dnes již dokonale zvládnuty a na trhu najdeme velké množství variant těchto kolon. Nevýhodou je použití pouze v úzkém rozmezí pH (2,0–7,5). Při pH nižším než 2,0 dochází k hydrolyze vázaných funkčních skupin. Vyšší pH než 8 způsobí rozpuštění reverzních silikagelových fází.

2.4 Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

Komerční hmotnostní spektrometrie je dostupná již více než 60 let. Mezi prvními, kde byla hmotnostní spektrometrie použita, byl ropný průmysl. Dnes nachází široké uplatnění hlavně v odvětví biologických polymerů. Její nespornou výhodou je použitelný rozsah makromolekulárních analýz a to hlavně díky efektivní ionizaci a odpaření bez degradace.

Uspořádání hmotnostního spektrometru se člení na několik částí: ionizace vzorků, třídění iontů analyzátozem a detekce. V analýze proteinů se nejvíce uplatňuje ionizace pomocí MALDI a ESI, které jsou více popsány níže. Za rozvoj těchto technik byla Koichimu Tanakovi a Johnu Fennovi v roce 2002 udělena Nobelova cena za chemii [35,36].

2.4.1 Ionizace vzorku

Vývoj „měkkých ionizačních technik“ začátkem 80. let přinesl možnost použití hmotnostní spektrometrie i pro látky s vyšší molekulovou hmotností, tedy i pro proteiny. Mezi tyto techniky lze řadit MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization – desorpce/ionizace laserem za účasti matrice), ESI (ionizace elektrosprejem) a metoda bombardování rychlými atomy, která je málo používaná. Výhodou měkké ionizace je zamezení nežádoucí fragmentace a schopnost tvorby molekulárního iontu, což umožňuje přímé určení molekulové hmotnosti analytu [35,40].

2.4.1.1 Technika MALDI

MALDI je metoda, používající k vytvoření plynných iontů fotony laseru. Používá se v off-line uspořádání, kdy je analyzovaný vzorek nanesen spolu s vhodnou maticí (např. deriváty skořicové kyseliny) na podložku - sondu. Vzorek je zpravidla ve velmi malém množství, řádově až pikomoly, a je míchán s 100-500-ti násobným množstvím matrice. Rozpouštědlo se poté nechá odpařit a sonda se vloží do hmotnostního analyzátozem. Pulsy laseru vhodné vlnové délky nejprve ionizují pomocnou sloučeninu, z které se poté náboj (obvykle proton) přeneše na analyzované

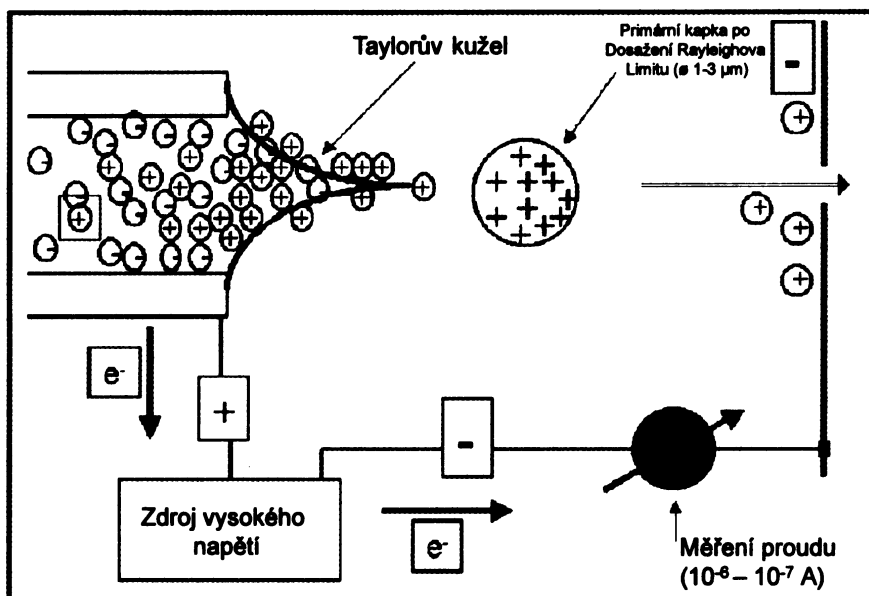
molekuly. Vzniklé ionty jsou nejčastěji jednou nabité, $[m+H]^+$. Takto získané ionty jsou následně analyzovány, většinou metodou TOF (Time of Flight), zmíněnou dále. Spektra získaná touto cestou poskytují obvykle pouze informace o hmotnostech resp. m/z nikoli o přesné sekvenci peptidu. Díky tomu, že relativní hmotnosti jednotlivých atomů (nuklidů) nejsou celočíselné, lze pomocí softwaru z dostatečně přesně změřených hodnot m/z určit elementární složení peptidu [35].

Někdy lze ve spektrech získaných touto technikou sledovat i fragmenty. Ty vznikají buď přímo ve zdroji zvýšením výkonu laseru, kdy se molekuly rozpadají důsledkem nadbytku energie, nebo vznikají z molekulového iontu během cesty letovou trubicí [37].

2.4.1.2 Ionizace pomocí elektrospreje

Další možností, jak ionizovat vzorek peptidů, je použít elektrosprej. Tato metoda je založena na skutečnosti, že peptidy vystupují jako polyelektrolyty. To znamená, že jsou schopny v závislosti na pH roztoku nést větší počet kladných nebo záporných nábojů. Protein s molekulovou hmotností kolem 10 000 g/mol je zpravidla schopen vázat 5 až 15 protonů, čímž vzniká celá série iontů (tzv. multicharge envelope) s různými hodnotami m/z .

Při ionizaci elektrosprejem molekuly vzorku procházejí nerezovou tryskou nebo kapilárou, které mají vysoký pozitivní elektrický potenciál (3 – 5 kV). Intenzivní pole tvoří na konci kapiláry kónický meniskus tzv. Taylorův kužel (Obr. 2.9), z něho se uvolňují vysoce nabitě kapičky. Při dalším odpařování se velikost kapiček zmenšuje a tím se zvyšuje hustota povrchového náboje, až dojde k rozpadu na menší kapičky a nakonec se uvolňuje molekulární iont ($[M+H]^+$ resp. $[M+Na]^+$ při snímání kladných iontů a $[M-H]^-$ při snímání záporných iontů), který putuje do analyzátoru. Ionty fragmentů bývají málo intenzivní nebo zcela chybí [35,36]. Existuje i několik dalších variant klasického elektrospreje, popsaného výše. Např. iontový sprej je označení modifikace elektrospreje s pneumatickým zmlžovačem na konci kapiláry, který se používá pro snadnější odstranění eluátu. Byla popsána i sonda s vyhřívanou kapilárou [38].



Obr. 2.9 Elektrosprej – tvorba iontů; na kapiláře se díky vloženému napětí tvoří kónický meniskus (Taylorův kužel), z kterého se uvolňují kapičky iontů. Ty se dále rozpadají až na molekulární iont [39]

2.4.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor je zařízení, které za využití elektromagnetických polí separuje ionty v plynné fázi podle jejich poměru hmotnost/náboj (m/z). Rozeznáváme tři základní druhy hmotnostních analyzátorů. První z nich je skenující analyzátor, který postupně propouští ionty různých hmotností (např. sektorový analyzátor, kvadrupólový analyzátor). Druhým je analyzátor zadržující ionty, které pak postupně analyzuje (iontová past, orbitrap, iontová cyklotronová rezonance – ICR). A poslední variantou je průletový analyzátor (TOF), který měří čas letu iontů přes definovanou dráhu.

Pro účely stanovení peptidů je většinou použit kvadrupólový analyzátor nebo analyzátor doby letu (TOF- Time of flight). Při nutnosti ještě většího zpřesnění stanovení molekulové hmotnosti lze využít vysokorozlišovací spektrometry např. orbitální past (orbitrap) nebo iontový cyklotron s Fourierovou transformací (FT-ICR), které jsou schopny větší přesnosti, ale jejich pořizovací cena je značně vyšší [35,40].

2.4.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Tento přístroj je tvořen 4 paralelními tyčemi kruhového nebo parabolického průřezu, na něž je vkládáno napětí. Ionty vstupují mezi tyče a díky vloženému napětí se začnou ionty pohybovat po spirálové dráze mezi tyčemi. Pouze ionty s určitou hodnotou m/z (pro niž je spirála souosá s kvadrupólem) projdou, ostatní jsou zachyceny na tyčích. Měnění se napětí umožňuje „skenování“, při kterém jsou postupně propouštěny všechny ionty z požadovaného rozsahu spektra. Měření hmotnostních spekter je velmi rychlé [40]. Identifikace proteinu se provádí porovnáním naměřených hodnot m/z (hmotnost/náboj) s teoreticky vypočítanými hodnotami z databázových programů [41].

Lze rovněž získat informace o sekvenci molekul a to pomocí vícenásobné hmotnostní spektrometrie (MS/MS, MS^n , Tandem Mass Spectrometry). To se provádí za použití dalších kvadrupólů [42].

2.4.2.2 TOF- Analyzátor doby letu

Nejjednodušším a nejrychlejším hmotnostním analyzátozem je TOF (Time of Flight). Dochází k akceleraci celého vzorku iontů najednou. Všem iontům se při vstupu do evakuované letové trubice dodá vysokonapěťovým pulsem stejná energie. Z rovnice pro kinetickou energii

$$E_k = \frac{1}{2} m v^2$$

kde m = hmotnost, v = rychlost

[40]

vyplývá, že aby měl iont s menší hmotností stejnou energii jako iont s větší hmotností, musí mít větší rychlost, a proto určenou dráhu letové trubice překoná za kratší čas. Na konci trubice se postupně detekují ionty od nejmenší hmotnosti po největší.

Přitom se dosahuje také vysokého rozlišení, které je umožněno „zdvojením“ analyzátoru pomocí tzv. reflektoru – iontového zrcadla. To je tvořeno soustavou elektrod s postupně se zvyšujícím potenciálem.

3. Experimentální část

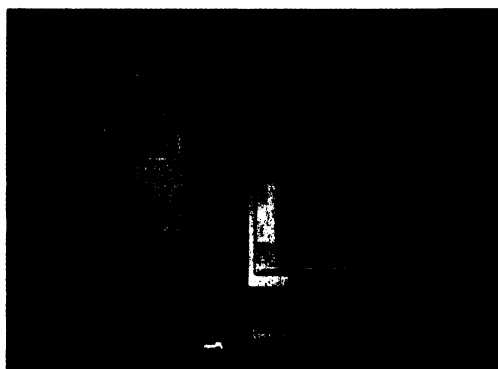
3.1 Reagencie a materiál

- Acetonitril - ACN (Chromasolv[®] pro HPLC, Sigma Aldrich)
- Kyselina trifluoroctová – TFA p.a. (Lachema, Brno, ČR)
- Deionizovaná voda – H₂O pro HPLC (připravena na Milli Q 18,2 MΩ/cm ÚOCHB AV, ČR)
- Kyselina mravenčí – FA p.a. (Lachema, Brno, ČR)
- Použité antimikrobiální peptidy (čistota 95-98 %, ÚOCHB AV, ČR)
- Krevní sérum z potkana (ÚOCHB AV, ČR)
- TLCK treated α-chymotrypsin (Sigma Aldrich)
- TPCK treated trypsin (Sigma Aldrich)
- Subtilisin (Sigma Aldrich)
- Syntetický peptid o relativní molekulové hmotnosti M_r=1234,6916 g/mol (ÚOCHB AV, ČR)
- Zkumavky typu Ependorf 1,7 ml maximum recovery[™] (Genuine Axygen Quality, USA)

3.2 Instrumentace

Enzymatické štěpení probíhalo v mikrozkušavkách Ependorf (1,7 ml) umístěných do termostátované vodní lázně nastavené na 37 °C po určenou dobu.

K chromatografii byl použit HPLC systém série 1200 (Agilent Technologies, USA) vybavený spektrometrickým detektorem s diodovým polem (DAD) (Obr. 3.1). Vzorky byly dávkovány stříkačkou Hamilton (Reno, Nevada, USA) do nástříkového ventilu (Rheodyne, USA). Separace byla provedena na koloně Vydac C-18, 250 x 4,6 mm, 5μm (Grace Vydac, USA) s průtokem 1 ml/min a lineární gradientovou elucí



Obr. 3.1; Vysokoučinný kapalinový chromatograf (Agilent Technologies, USA)

(acetonitril/voda s přísávkem 0,1% TFA) od 5% ACN do 70% ACN za 60 minut. Chromatografické záznamy byly zpracovány počítačovým programem Agilent Chemstation a k další úpravě byl použit program Excel.

Vzorky byly odchyťávány do ultra čistých mikrozkuřavek Ependorf a sušeny vakuovým koncentrátorem SpeedVac (Labcono, USA).

K určení molekulové hmotnosti byl použit analyzátor Q-TOF micro (Waters, USA) s geometrií sprejování Z-sprej a napětím kapiláry 30 V. Mobilní fázi byla směs 50 % ACN ve vodě s přísávkem 0,1 % FA dávkována stříkačkovou pumpou s průtokem 20 μ l/min. Kalibrace přístroje byla prováděna pomocí syntetického peptidového standardu o molekulové váze 1234,6916 g/mol. Vyhodnocení MS spekter bylo provedeno počítačovým programem MassLynxTM Software.

Ke stanovení aminokyselinové sekvence štěpných fragmentů byl použit počítačový program Peptide Companion.

3.3 Postup

Jako reakční médium pro enzymatické štěpení peptidů byl použit 50 mM hydrogenuhličitan amonný o pH 8 (pufr běžně používaný k sekvenování peptidů). Zásobní roztok peptidu byl připraven o koncentraci 2 mg/ml pufru. 100 μ l tohoto roztoku v mikrozkuřavce Ependorf bylo umístěno do vodní lázně a inkubováno s 5 μ l zásobního roztoku enzymu (koncentrace 1 mg/ml vody) při teplotě 37 °C. Váňový poměr enzym substrát byl 1 : 40. V určených časových intervalech (1 min., 5 min., 20

min., 1 hod., 2 hod., 3 hod, případně 24 hod.) bylo z roztoku odebráno 5 μ l a smícháno s 5 μ l stopovacího roztoku (50 % vodný ACN/ obsahující 1 % TFA). Silně kyselá hodnota pH v kombinaci s vysokou koncentrací organického rozpouštědla působení enzymu ihned zastaví jeho denuraci.

Tyto vzorky s „umrtveným enzymem“ byly následně centrifugovány a supernatant byl analyzován RP-HPLC. Pomocí DAD detektoru byly snímány tři vlnové délky - 220,4; 254,4 a 280,4 nm. K detekci peptidových vazeb byla zvolena vlnová délka 220,4 nm. Vlnová délka 254,4 nm byla standartně nastavena pro zjištění přítomnosti některých nízkomolekulárních organických látek a detekcí vlnové délky 280,4 nm lze určit přítomnost aromatických aminokyselin (Tyr a Trp) v peptidu. Peptidové frakce jako chromatografické píky s výraznou odezvou byly manuálně odchyceny do ultra čistých Ependorf mikrozkuvek. Roztok byl dále odpařen v koncentrátoru typu SpeedVac. Odparek byl opětovně rozpuštěn v 50 % vodném ACN obsahujícím 0,1 % FA a analyzován pomocí Q-TOF za účelem stanovení molekulární hmotnosti peptidového fragmentu.

U reakcí s krevním sérem bylo nutno použít dvojnásobné množství stopovacího roztoku, aby bylo docíleno denaturace enzymu.

Před HPLC analýzou reakcí s krevním sérem a kulturou *B. subtilis* bylo nutno heterogenní reakční médium centrifugovat. Odebraný supernatant byl naředěn stejným množstvím stopovacího roztoku a znovu centrifugován. Následný supernatant byl použit pro HPLC analýzu.

4. Výsledky a diskuse

Vybrané peptidy byly podrobeny inkubaci s různými enzymy, bakteriální kulturou *Bacillus subtilis* a krevním sérem dle schématu (Tabulka 4.1).

Tabulka 4.1: Schéma testovaných reakcí

	trypsin	chymotrypsin	subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>	sérum
MEP	X	X	X	X	X
LL-III	X	X			X
LL-III/12	X				
LL-III/13	X	X			
LL-III/19	X				
LL-III/21			X		
LL-III/24	X	X			
PDD-B		X			
PDD-B-1		X			

Při volbě peptidu a enzymu byl brán zřetel na aminokyselinové zastoupení v peptidech a možnost případného hydrolytického štěpení.

Identifikované fragmenty spolu s jejich retenčními časy, molekulovou vahou a hydrofobicitou (*H*) jsou pro přehlednost u každé reakce řazeny v tabulkách. Hydrofobicita je průměrem hydrofobicit jednotlivých AMK [44]. Pro popis proteinogenních aminokyselin bylo zvoleno jednopísmenové označení, třípísmenným označením jsou zapsány aminokyseliny nepřírozené (ornithin a kyselina aminoisomáselná), které jsou ještě zvýrazněny tučně. Sekvence zakončená skupinou -OH značí volný karboxylový konec, -NH₂ skupina znamená amidovaný konec.

4.1. Enzymatické štěpení melectinu (MEP)

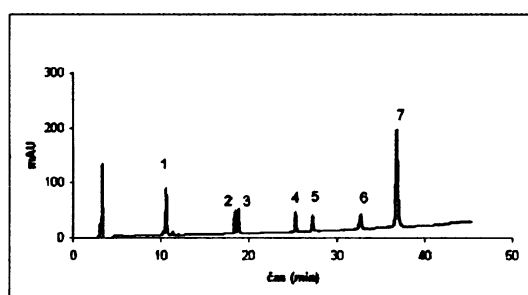
Syntetický duplikát peptidu MEP nalezeného v jedovém rezervoáru včely

Melecta albifrons byl podroben enzymatické degradaci se všemi výše jmenovanými enzymy, se suspenzí bakteriální kultury *Bacillus subtilis* a s krevním sérem z potkana.

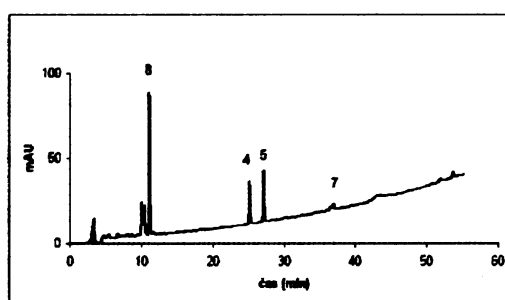
Sekvence peptidu je GFLSILKKVLPKVMAMHK-NH₂, molekulová váha odpovídá 2038,23 Da a HPLC retenční čas je 36,90 minut.

4.1.1 Štěpení MEP trypsinem

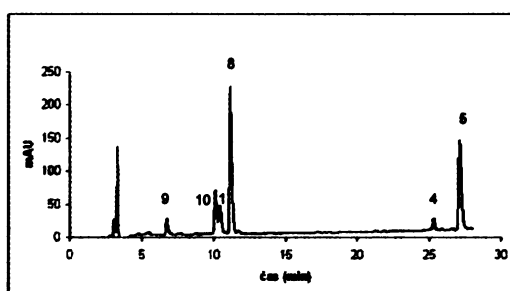
Pro analýzu reakční směsi byly vybrány vzorky v určitých časových úsecích – 1. minuta (Obr. 4.1), 20. minuta (Obr. 4.2) a 3. hodina (Obr. 4.3).



Obr. 4.1; RP-HPLC profil reakční směsi MEP s trypsinem, 1. min., pomocí MS identifikováno 7 piků



Obr. 4.2; RP-HPLC profil reakční směsi MEP s trypsinem, 20. min., pomocí MS identifikovány 4 píky



Obr. 4.3; RP-HPLC profil reakční směsi MEP s trypsinem, 3. hod., pomocí MS identifikováno 6 piků

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie bylo zjištěno, že peptid MEP byl enzymem trypsin (váhový poměr trypsin/peptid 1:40) zcela degradován do tří hodin (Obr. 4.3). Výrazné píky byly manuálně odchyceny a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie Q-TOF (Tabulka 4.2).

Tabulka 4.2: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi MEP s trypsinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	<i>H</i>	<i>t_R</i> (min)	Monoizotopická molekulová váha (Da)	
				vypočítaná	nalezená
1	VMAHMK-NH ₂	8,40	10,52	714,37	714,31
2	KVLPK V MAHMK-NH ₂	9,25	18,33	1279,76	1279,62
3	VLPK V MAHMK-NH ₂	9,89	18,74	1151,67	1151,62
4	GFLSILKK-OH	12,84	25,29	904,57	904,50
5	GFLSILK-OH	14,27	27,22	776,48	776,40
6	GFLSILKKVLPK-OH	12,60	32,74	1341,87	1341,94
7*	GFLSILKKVLPK V MAHMK-NH ₂	11,20	36,90	2038,23	2038,20
8	VMAHMK-OH	8,40	11,15	714,35	715,40
9	VMAH-OH	7,98	6,74	456,22	456,40
10	KVLPK-OH	10,26	10,12	583,41	583,50

Pozn. * - původní peptid

Identifikované HPLC píky potvrzují předpokládaná místa štěpení peptidu MEP trypsinem. Ke štěpení došlo v místech vyznačených červeně na následujícím schématu:

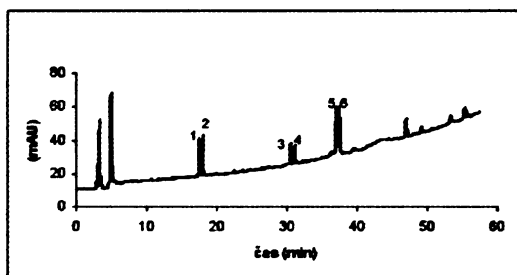


Štěpení probíhalo na karboxylové straně bazických aminokyselin lysin a histidin, přičemž peptidová vazba mezi histidinem a methioninem byla degradována až po delší době působení, což odpovídá předpokladu preference působení trypsinu Lys > His v místě AMK_x. Hlavními produkty štěpení nalezené v reakční směsi z třetí hodiny inkubace (Obr. 4.3) jsou proteiny odpovídající chromatografickým píkům 5 a 8 se sekvencemi GFLSILK-OH (pík 5) a VMAHMK-OH (pík 8). Je předpoklad, že v průběhu ještě delšího působení enzymu by došlo k další hydrolyze píku 8 a konečným produktem by byl peptid se čtyřmi aminokyselinami VMAH-OH, který byl identifikován jako pík 9, objevující se až ve vzorku ze třetí hodiny reakce (Obr.4.3). Peptidy určené jako KVLPK~~V~~MAHMK-NH₂ (pík2), VLPK~~V~~MAHMK-NH₂ (pík 3) a GFLSILKKVLPK-OH (pík 6) jsou dočasné meziproducty štěpení. Byly nalezeny pouze

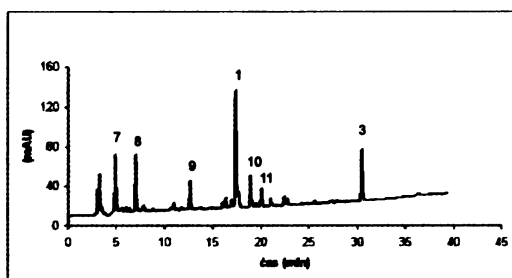
v reakční směsi 1. minuty (Obr. 4.1). Retenční časy peptidů odpovídají jejich eluci z kolony v závislosti na hydrofobicitě a velikosti peptidu.

4.1.2 Štěpení MEP α -chymotrypsinem

Byla provedena enzymatická hydrolýza peptidu MEP α -chymotrypsinem a následná HPLC analýza reakční směsi. K zhodnocení průběhu proteolytické reakce byly vybrány HPLC profily reakce v časech 1. minuta (Obr. 4.4) a 1. hodina (Obr. 4.5).



Obr. 4.4; RP-HPLC profil reakční směsi MEP s α -chymotrypsinem, 3. hod., pro MS analýzu izolováno 6 piků



Obr. 4.5; RP-HPLC profil reakční směsi MEP s α -chymotrypsinem, 1. hod., pro MS analýzu izolováno 7 piků

Proteolytická degradace peptidu MEP proběhla velmi rychle. Již v HPLC záznamu reakční směsi z 1. hodiny není patrný pík výchozího peptidu MEP ($t_R=37,44$ min.).

Pro hmotnostní spektrometrii bylo odebráno celkem 11 vzorků, u kterých byla určena molekulová váha, sekvence AMK a hodnota hydrofobicity (H) (Tabulka 4.3).

Tabulka 4.3: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi MEP s α -chymotrypsinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	<i>H</i>	<i>t_R</i> (min)	Monoizotopická	
				molekulová váha (Da) vypočítaná	nalezená
1	KKVLPKVM-OH	10,40	17,47	941,61	941,60
2	KKVLPKVMAMHK-NH ₂	8,71	17,93	1407,86	1407,80
3	GFLSIL-OH	16,18	30,48	648,38	648,40
4	GFLSILKKVL-OH	13,94	31,05	1116,73	1115,80
5	GFLSILKKVLPKVM-OH	12,88	37,01	1571,98	1572,00
6*	GFLSILKKVLPKVMAMHK-NH ₂	11,20	37,44	2038,23	2038,00
7	AMHK-NH ₂	5,33	4,90	484,26	484,20
8	AMH-OH	6,17	7,03	357,15	357,10
9	VAMHK-OH	8,40	12,64	715,35	715,40
10	VLPKVM-OH	12,93	18,92	685,42	685,30
11	GFL-OH	17,47	20,06	335,18	335,10

Pozn. * - původní peptid

Pomocí hmotnostního analyzátoru byla stanovena aminokyselinová sekvence izolovaných chromatografických píků, z nichž byla určena místa štěpení peptidu. Místa, kde došlo k hydrolyze jsou vyznačeny na následujícím schématu červeně:

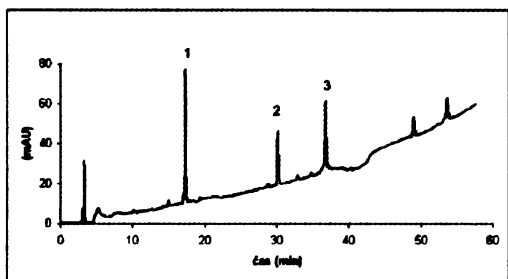


Jak bylo předpokládáno, místa štěpení byla za aminokyselinami leucin a methionin (píky 1,2,3,4,5,7,8,10 a 11). Dalším štěpným místem byla pozice na karboxylové straně lysinu, která je typická pro hydrolyzu trypsinem (pík 9). Domnívám se, že k tomuto štěpení opravdu dochází po delším působení trypsinu, kterým může být komerčně vyráběný α -chymotrypsin v nepatrném množství kontaminován. A i takto malá koncentrace při dlouhodobém působení může způsobit poměrně značné štěpení. Desátou AMK v sekvenci je leucin následovaný prolinem. V tomto místě by k hydrolyze docházet nemělo, protože molekula prolinu je na rozdíl od všech ostatních aminokyselin do peptidové vazby zapojena jako sekundární amin, jenž nezapadá do mechanismu štěpení použitých proteáz.

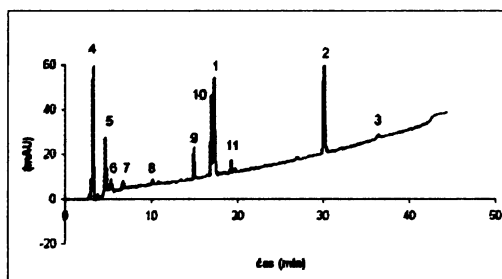
Retenční časy odpovídají snadnosti eluce HPLC kolonou. Malé hydrofilní složky se vymývají nejrychleji, velké hydrofobní molekuly postupují kolonou nejpomaleji a jsou detekovány jako poslední. To odpovídá i hodnotám hydrofobicit fragmentů.

4.1.3 Štěpení MEP subtilisinem

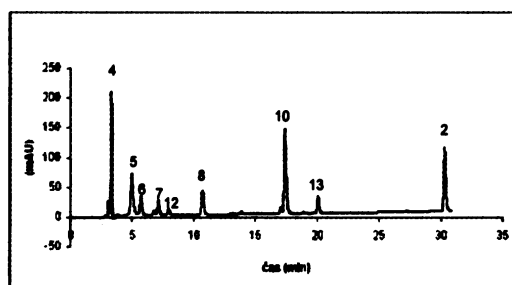
Peptid MEP byl hydrolyzován enzymem subtilisin podle postupu popsaného výše. V časových intervalech 1 minuta (Obr. 4.6), 20 minut (Obr. 4.7) a 3 hodiny (Obr. 4.8) byla reakce zastavena a reakční směs analyzována.



Obr. 4.6 , RP-HPLC profil reakční směsi MEP se subtilisinem, 1. min., pro MS analýzu odebrány 3 píky



Obr. 4.7 , RP-HPLC profil reakční směsi MEP se subtilisinem, 20. min., pro MS analýzu odebráno 11 piků



Obr. 4.8 ; RP-HPLC profil reakční směsi MEP se subtilisinem, 3.hod., pro MS analýzu odebráno 9 piků

Z RP-HPLC systému bylo odebráno a pomocí hmotnostního analyzátoru identifikováno celkem 13 piků (Tabulka 4.4).

Tabulka 4.4: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi MEP se subtilisinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	<i>H</i>	<i>t_R</i> (min)	Monoizotopická	
				molekulová váha (Da) vypočítaná	nalezená
1	KKVLPKVMAMHK-NH ₂	8,71	17,26	1407,86	1407,72
2	GFLSIL-OH	16,18	30,01	648,38	648,22
3*	GFLSILKKVLPKVMAMHK-NH ₂	11,20	36,71	2038,23	2038,42
4	HMK-OH	6,17	3,28	414,20	414,16
5	AHMK-NH ₂	5,33	4,66	484,26	484,19
6	AHMK-OH	5,33	5,32	485,24	485,17
7	AHM-OH	9,25	6,70	357,15	357,09
8	KKVLPK-OH	9,02	10,12	711,50	711,36
9	KKVLPKVMAMH-OH	8,60	14,96	1149,71	1149,54
10	KKVLPKVM-OH	10,40	16,97	941,61	941,36
11	KKVLPKVMAMH-OH	9,25	19,25	1280,75	1280,62
12	VM-OH	14,55	7,60	248,12	248,07
13	GFL-OH	17,47	19,69	335,18	335,13

Pozn. * - původní, neštěpený peptid

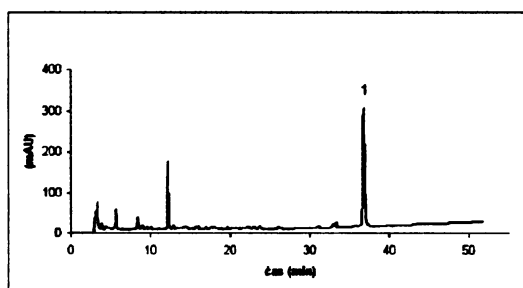
Místa hydrolýzy peptidu MEP enzymem subtilisin jsou vyznačena červeně na následujícím schématu:



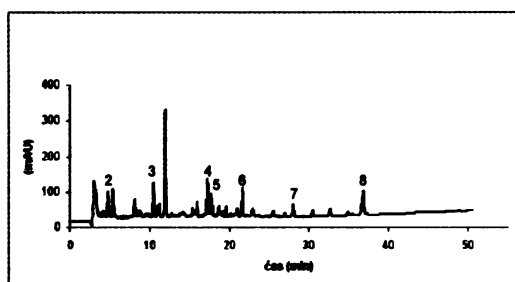
Subtilisin je nespecifická peptidáza a tomu odpovídají i četná místa štěpení, která byla při měření nalezena. Degradace původního peptidu MEP probíhala velmi rychle. Již ve 20. minutě reakce (Obr. 4.7) je patrný pouze malý pík, s retenčním časem odpovídajícím původnímu peptidu. Pík 1, identifikovaný jako peptid se sekvencí KKVLPKVMAMHK-NH₂, byl nalezen pouze ve vzorku reakce z 1. minuty (Obr. 4.6). Tento peptid je meziproduktem a dále je degradován na řadu menších fragmentů. Ve 3. hodině hydrolýzy reakční směs obsahovala velké množství různých fragmentů původního peptidu MEP (Obr. 4.8).

4.1.4 Štěpení MEP s bakteriální kulturou *Bacillus subtilis*

Pro lepší obraz skutečné situace při nasazení enzymatického aparátu bakterií proti antimikrobiálním peptidům byla provedena inkubace peptidu MEP s bakteriální kulturou *B. subtilis* (Obr. 4.10). Aby se odlišily složky živného média, v kterém bakteriální kultura rostla, od fragmentů peptidu MEP, byl původní peptid zároveň inkubován i se samotným živným médiem (Obr. 4.9). Štěpení probíhalo překvapivě pomalu, takže vzorky byly odebrány až ve 24. hodině.



Obr. 4.9 ; RP-HPLC profil reakční směsi MEP s tekutou živnou půdou neobsahující bakterie, pík 1 je peptid MEP, ostatní píky jsou komponenty živného média pro bakterie



Obr. 4.10; RP-HPLC profil reakční směsi MEP s bakteriální kulturou *Bacillus subtilis* v živném médiu, 24. hod., identifikováno 7 píků

Z HPLC systému bylo pro MS analýzu odebráno 7 píků (Obr. 4.10). Jejich aminokyselinová sekvence, hodnota hydrofobicity, retenční čas a molekulová váha jsou uvedeny v tabulce 4.5.

Tabulka 4.5: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi MEP s kulturou *Bacillus subtilis*

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	<i>H</i>	<i>t_R</i> (min)	Monoizotopická	
				molekulová váha (Da) vypočítaná	nalezená
1*	GFLSILKKVLPK V MAHMK-NH ₂	11,20	36,72	2038,23	2038,46
2	AHMK-NH ₂	5,33	4,78	484,26	484,32
3	VMAHMK-NH ₂	8,40	10,50	714,37	714,77
4	KKVLPK V MAHM-OH	9,25	17,26	941,61	942,20
5	KKVLPK V MAHMK-OH	8,71	17,72	1408,84	1409,82
6	ILKKVLPK V MAHMK-OH	10,66	21,70	1635,01	1635,18
7	LSILKKVLPK V MAHMK-OH	10,78	28,05	1835,13	1836,54
8	GFLSILKKVLPK V MAHMK-OH	11,20	36,86	2039,21	2039,67

Pozn. * - původní, neštěpený peptid

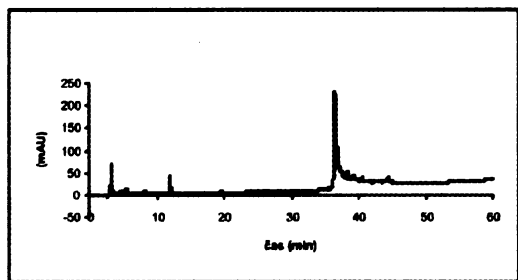
Bylo zjištěno, že při inkubaci peptidu MEP s bakteriální kulturou *B. subtilis* došlo k štěpení na různých místech sekvence peptidu. Místa štěpení jsou na následujícím schématu vyznačena červenou čarou:



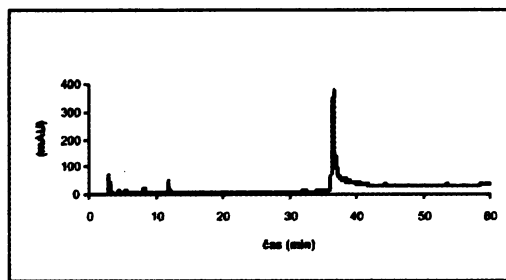
Na obr. 4.10 je vidět, že celkově vzniklo mnoho různých fragmentů, které nebylo možno všechny odchytil a určit pro malou intenzitu. Je pravděpodobné, že ke štěpení dochází i v místech, která nejsou uvedena na tomto schématu.

4.1.5 Štěpení MEP krevním sérem

Pro jednoduché nastínění chování antimikrobiálních peptidů v živém organismu bylo jako model použito krevní sérum z potkana. Peptid MEP byl se sérem inkubován při 37 °C po dobu 24. hodin (Obr. 4.12). Pro odlišení složek séra byl změřen HPLC profil samotného krevního séra (Obr. 4.11).



Obr. 4.11, RP-HPLC profil potkaního séra



Obr. 4.12, RP-HPLC profil inkubace MEP s krevním sérem ve 24. hodině

Retenční čas peptidu MEP je 36,7 minut. Do této oblasti retenčních časů zasahují i retenční časy složek krevního séra, proto vidíme pouze jeden netypický pík. V tomto experimentu překvapivě nebyly nalezeny žádné štěpné fragmenty peptidu MEP.

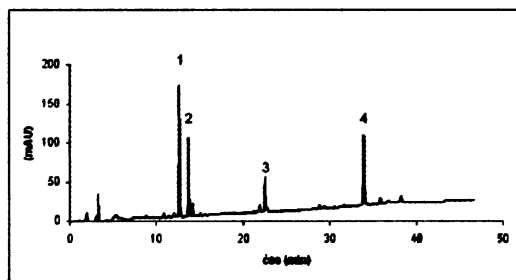
4.2. Enzymatické štěpení lasioglossinu III (LL-III) a jeho analogů

Peptid LL-III byl původně nalezen v jedových rezervoárech divoké včely *Lasioglossum laticeps*. Jeho syntetické analogy byly připraveny metodou syntézy peptidů na pevné fázi. Tyto peptidy byly podrobeny enzymatické degradaci podle postupu popsaného dříve. Šlo o reakce s enzymy trypsin, α -chymotrypsin, subtilisin a s krevním sérem.

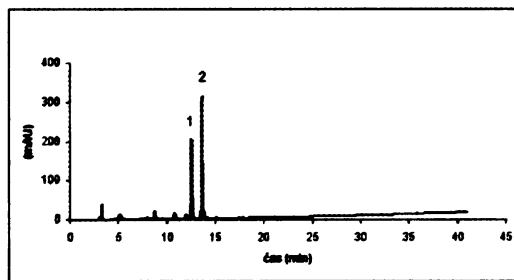
4.2.1 Štěpení LL-III s trypsinem

Studovaná molekula peptidu LL-III má aminokyselinovou sekvenci VNWKKILGKIIKVVK-HN₂, její molekulová váha je 1764,19 Da. Retenční čas odpovídá 33,94 minutě.

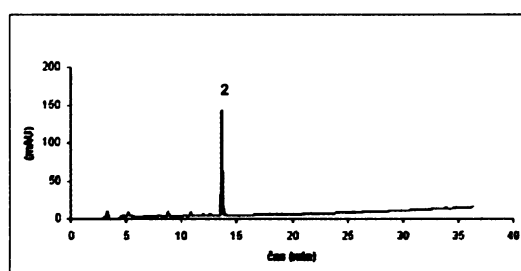
Pro zhodnocení enzymatické stability peptidu LL-III v přítomnosti trypsinu byly vybrány HPLC záznamy vzorků z 1. minuty (Obr. 4.13), 20. minuty (Obr. 4.14) a 2. hodiny (Obr. 4.15) reakce.



Obr. 4.13; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III s trypsinem, 1. min., identifikovány 4 píky



Obr. 4.14; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III s trypsinem, 20. min., identifikovány 2 píky



Obr. 4.15; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III s trypsinem 2. hod., identifikován 1 pik

Z Obr. 4.14 je patrné, že původní peptid LL-III s retenčním časem 33,94 min. byl velmi rychle degradován a již po 20. minutě působení enzymu nebyl v roztoku přítomný. Celkem byly v reakční směsi identifikovány 4 peptidové fragmenty (Tabulka 4.6).

Tabulka 4.6: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi LL-III s trypsinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	H	t_R (min)	Monoizotopická molekulová váha (Da)	
				vypočítaná	nalezená
1	VNWKK-OH	10,16	12,62	673,39	673,59
2	VNWK-OH	12,00	13,72	545,30	545,47
3	VNWKKILGK-OH	10,92	22,55	1084,68	1085,40
4*	VNWKKILGKIIKVVK-HN ₂	15,00	33,94	1764,19	1765,40

Pozn. * - původní peptid

První a třetí pík jsou meziprodukty, z kterých vzniká konečný fragment štěpení označený jako pík 2 s aminokyselinovou sekvencí VNWK-OH.

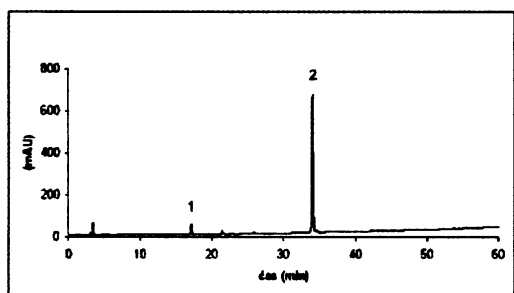
Místa štěpení peptidu ukázaná na následujícím schématu odpovídají trypsinové specifitě. Všechna nalezená místa štěpení jsou na karboxylové straně lysinů:



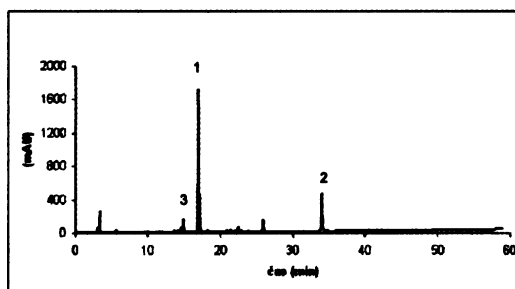
V RP-HPLC profilech se objevují ještě další píky s malou intenzitou, které nebyly identifikovány. Je vysoce pravděpodobné, že tyto málo intenzivní píky jsou štěpné fragmenty které ve své molekule neobsahují Trp (přítomnost Trp v peptidu silně zvyšuje jeho absorpci při 220 nm), a jsou to tedy všechny C-koncové fragmenty odpovídající štěpení v pozicích vyznačených ve schématu.

4.2.2 Štěpení LL-III α -chymotrypsinem

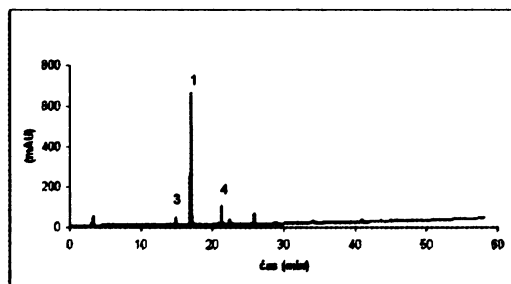
Dalším provedeným měřením byla reakce peptidu LL-III s α -chymotrypsinem. Pro zhodnocení průběhu enzymatické hydrolyzy peptidu LL-III byly vybrány záznamy HPLC analýzy reakce zastavené v 1. minutě (Obr. 4.16), 1. hodině (Obr. 4.17) a 4. hodině (Obr. 4.18).



Obr. 4.16; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III s α -chymotrypsinem, 1. min., pro MS analýzu odebrány 2 píky



Obr. 4.17; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III s α -chymotrypsinem, 1. hod., pro MS analýzu odebrány 3 píky



Obr. 4.18; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III s α -chymotrypsinem, 4.hod., pro MS analýzu odebrány 3 piky

Hydrolýza peptidu LL-III α -chymotrypsinem byla pomalejší než u předchozích měření. Na HPLC profilu reakce z 1. minuty (Obr. 4.16) je stále dobře patrný pík odpovídající výchozímu peptidu LL-III (pík 2). Celkem byly izolovány a identifikovány čtyři HPLC frakce (Tabulka 4.7)

Tabulka 4.7: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi LL-III s chymotrypsinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	H	t_R (min)	Monoizotopická	
				molekulová váha (Da) vypočítaná	nalezená
1	VNW-OH	15,07	16,92	417,20	417,90
2*	VNWKILGKIIKVVK-HN ₂	11,57	33,97	1764,19	1765,8
3	GKIIKVVK-HN ₂	9,75	14,80	882,64	883,00
4	KKILGKIIKVVK-OH	10,69	21,30	1365,98	1366,20

Pozn. * - původní peptid

Na následujícím schématu jsou červeně znázorněna nalezená místa hydrolytického štěpení peptidu LL-III, určená ze sekvencí identifikovaných fragmentů:



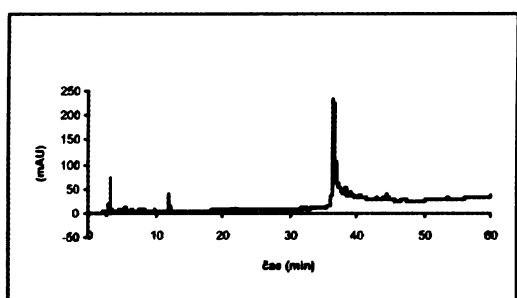
Jak bylo předpokládáno k hydrolýze došlo na karboxylové straně tryptofanu a leucinu. Třetí místo štěpení bylo nalezeno na karboxylové straně C-koncového lysinu. Stejně jako u reakcí s peptidem MEP se domnívám, že k tomuto štěpení došlo působením trypsinu, který je vždy v malém množství přítomen v komerčně dodávaném

chymotrypsinu, protože jejich dělení je velmi obtížné, téměř nemožné.

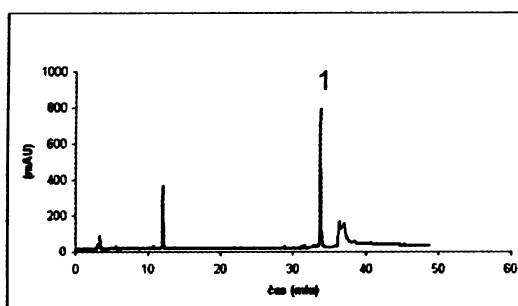
Hlavním produktem degradace LL-III chymotrypsinem je peptid VNW-OH označený jako pík 1. Objevuje se již v záznamu z 1. minuty reakce (Obr.4.16).

4.2.3 Štěpení LL-III krevním sérem

Stejně jako u peptidu MEP i toto testování stability bylo prováděno inkubací při 37 °C po dobu 24 hodin (Obr. 4.20). Pro odlišení složek séra bylo provedeno slepé měření se samotným sérem (Obr. 4.19).



Obr. 4.19; RP-HPLC profil krevního séra



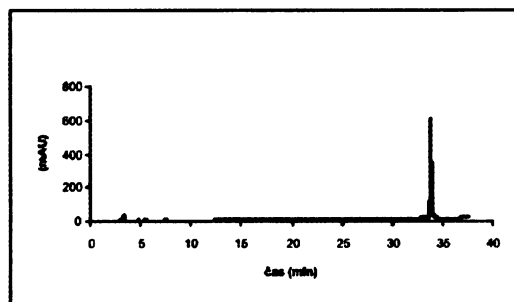
Obr. 4.20; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III se sérem, 24. hod., *pík 1 je peptid LL-III*

Ani v RP-HPLC záznamu z 24. hodiny působení krevního séra na peptid LL-III nebyly nalezeny žádné štěpné fragmenty. Je povzbudivé, že v tomto přírodním materiálu je peptid stabilní a nerozkládá se.

4.2.4 Štěpení LL-III/12 trypsinem

Peptid LL-III/12 je analogem LL-III syntetizovaným z aminokyselin D-řady. Retenční čas tohoto peptidu je 33,84 minut. Jako u všech ostatních zde zmíněných peptidů i tento vykazuje antimikrobiální aktivitu odpovídající LL-III.

K reakci byla použita dvojnásobná koncentrace trypsinu (10 μ l trypsinu/100 μ l zásobního roztoku LL-III/12). K zhodnocení byl vybrán pouze záznam reakce ze 24. hodiny (Obr. 4.21), z kterého je patrné, že ani po této době působení dvojnásobné koncentrace trypsinu na peptid LL-III/12 k degradaci peptidu nedošlo.



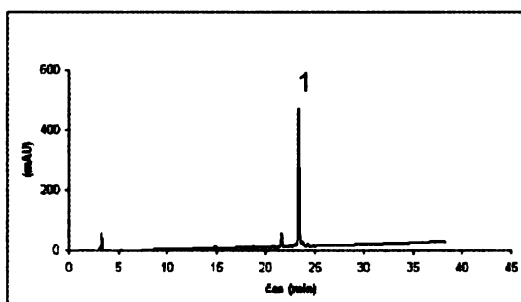
Obr. 4.21; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/12 s dvojnásobným množstvím trypsinu, 24. hod.

Obecně lze tedy říci, že použitím nepřírodných D-AMK se zajistila stabilita molekuly proti enzymatickému štěpení, aniž by byl narušen antimikrobiální účinek. AMPs s D-konformací jsou tedy z hlediska případného terapeutického využití dosti zajímavé.

4.2.5 Štěpení LL-III/13 trypsinem

LL-III/13 má ve své sekvenci na rozdíl od LL-III zabudovány D-lysiny místo přírodních L-lysinů. Retenční čas tohoto analogu je 23,32 minut. Bylo předpokládáno, že zabudováním těchto neproteinogenních aminokyselin do sekvence peptidu se zamezí hydrolyze peptidu trypsinem, který má specifické místo štěpení na karboxylové straně lysinů.

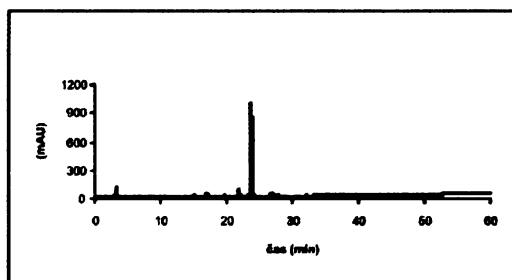
K zhodnocení této reakce byl vybrán HPLC záznam reakční směsi ve 24. hodiny reakce (Obr. 4.22). Na něm je patrné, že původní peptid LL-III/13 zůstává zachován. Jak bylo zjištěno i u předchozího pokusu s peptidem LL-III/12, D-aminokyseliny zůstávají stabilní v prostředí s trypsinem.



Obr. 4.22; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/13 s trypsinem, 24. hod., pík 1 je nehydrolyzovaný LL-III/13

4.2.6 Štěpení LL-III/13 α -chymotrypsinem

Peptid LL-III/13 se zabudovanými D-lysiny byl dále testován v přítomnosti α -chymotrypsinu. Pro vyhodnocení byl použit HPLC záznam reakce ve 24. hodině (Obr. 4.23).

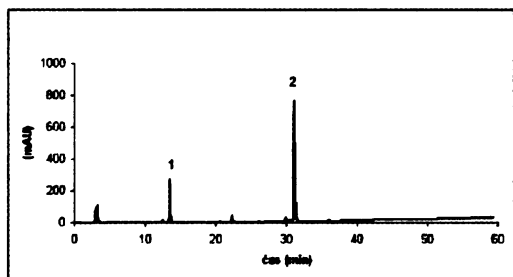


Obr. 4.23 ; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/13 s α -chymotrypsinem, 24.hod.

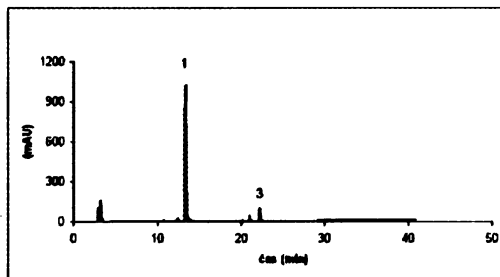
V záznamu reakce z 24. hodiny (Obr. 4.23) odpovídá nejintenzivnější pik původnímu, nehydrolyzovanému peptidu LL-III/13. Lze jej tedy považovat za stabilní v prostředí α -chymotrypsinu. I když ostatní málo intenzivní píky nebyly identifikovány, nicméně by mohly být nalezeny dva produkty odpovídající štěpení petidové vazby Leu-Gly.

4.2.7 Štěpení LL-III/19 trypsinem

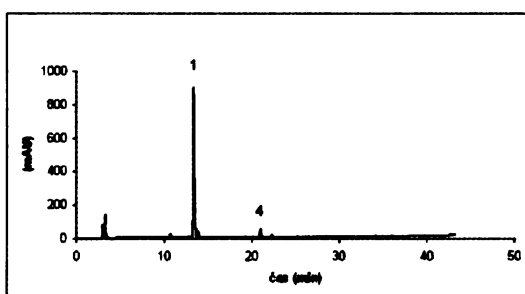
Tento analog původního peptidu LL-III má na karboxylové straně lysinů zabudovává nepřirozenou AMK - kyselinu aminoisomáselnou (Aib). Počet AMK je nezměněn, sekvence je VNWKKAibLGKAibIKAibVK-NH₂, molekulová váha činí 1694,11 Da a retenční čas odpovídá 31,11 minutě. Pro nastínění průběhu štěpení byly vybrány HPLC záznamy z 1. minuty (Obr. 4.24), 20. minuty (Obr. 4.25) a 3. hodiny (Obr. 4.26) štěpné reakce.



Obr. 4.24; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/19 s trypsinem, 1. min., identifikovány 2 píky



Obr. 4.25; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/19 s trypsinem, 20. min., identifikovány 2 píky



Obr. 4.26; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/19 s trypsinem, 3.hod., identifikovány 2 píky

Separací na HPLC systému byly z reakční směsi odebrány a hmotnostní spektrometrií identifikovány celkem 4 píky (Tabulka 4.8).

Tabulka 4.8: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi LL-8/19 s trypsinem

Číslo píky	Aminokyselinová sekvence	t_R (min)	Monoizotopická molekulová váha (Da)	
			vypočítaná	nalezená
1	VNWK-OH	13,36	545,30	545,20
2*	VNWKKAibLGKAibIKAibVK-NH ₂	31,11	1694,11	1694,60
3	KAibLGKAibIKAibVK-NH ₂	22,29	1166,82	1166,80
4	KAibLGKAibIKAibVK-OH	21,00	1167,81	1167,80

Pozn. * - původní peptid

Identifikované fragmenty ukazují, že k hydrolyze došlo na místech vyznačených

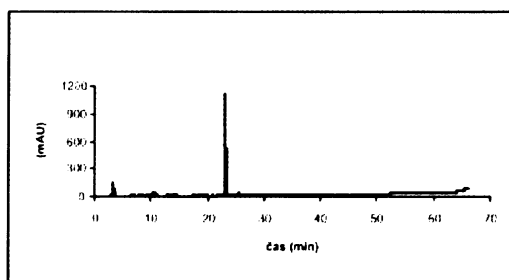
červeně na následujícím schématu:



Jak bylo předpovězeno, zabudováním kyseliny aminoisomáselné do peptidu na karboxylové straně lysinů se zabránilo štěpení na tomto pro trypsin specifickém místě. Jediné trypsinu přístupné peptidové vazby byly mezi čtvrtou a pátou AMK (lysin-lysin) a koncová amidová skupina. Zde bylo prokázáno, že k štěpení došlo. Stejně jako peptidy LL-III/12 a LL-III/13 obsahující aminokyseliny D-řady, i tento analog je z hlediska dalšího výzkumu enzymatické stability AMPs velmi zajímavý.

4.2.8 Štěpení LL-III/21 subtilisinem

Peptid LL-III/21 je dalším syntetickým analogem peptidu LL-III. V jeho řetězci jsou zaměněny všechny alifatické AMK (L, I, V) za kyselinu aminoisomáselnou. Jeho sekvence je $\text{AibNWKKAibAibGKAibAibKAibAibK-NH}_2$, molekulová váha činí 1610,01 Da a z HPLC systému tento peptid eluoval v čase 23,04 minut. Předpoklad byl, že záměna za kyselinu aminoisomáselnou opět zabrání působení enzymu. Pro zhodnocení stability v prostředí subtilisinu byl vybrán HPLC záznam reakce z 24. hodiny (Obr. 4.27), kde je patrné, že opravdu k žádné fragmentaci nedošlo.

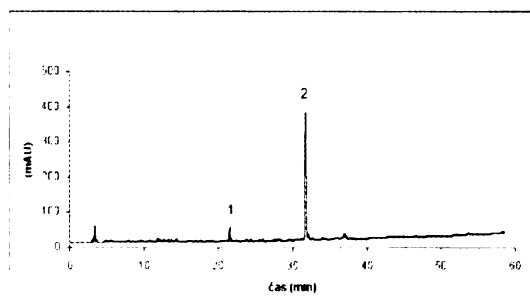


Obr. 4.27; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/21 se subtilisinem, 24. hod.

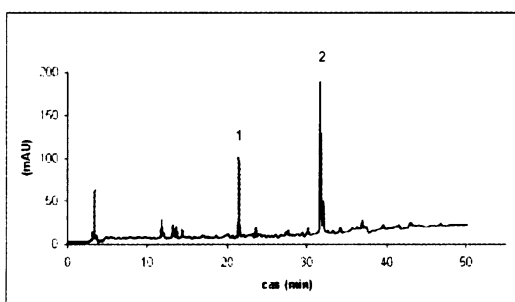
4.2.9 Štěpení LL-III/24 trypsinem

V sekvenci tohoto peptidu byly všechny lysiny nahrazeny neproteinogenní aminokyselinou ornithinem (Orn). Sekvence je VNWOrnOrnILGOrnIIOrnVVOrn-NH₂, molekulová váha činí 1694,11 Da a retenční čas odpovídá 31,89 minutě. Bylo očekáváno, že tato náhrada opět ovlivní kinetiku štěpení enzymem.

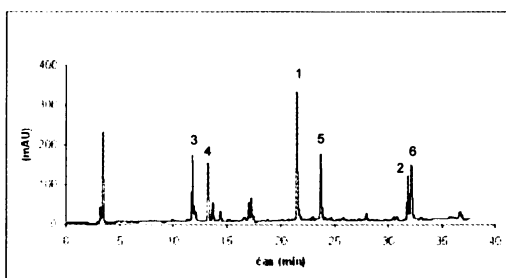
Pro zhodnocení byly vybrány záznamy z 20. minuty (Obr. 4.28), 3. hodiny (Obr. 4.29) a 24. hodiny reakce (Obr. 4.30)



Obr. 4.28; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/24 s trypsinem, 20. min., identifikovány 2 píky



Obr. 4.29; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/24 s trypsinem, 3.hod., identifikovány 2 píky



Obr. 4.30; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/24 s trypsinem, 24.hod., identifikováno 6 piků

Jak je z HPLC profilů patrné, enzymaticky katalyzovaná reakce byla v porovnání s reakcí přírodního peptidu LL-III mnohem pomalejší. Po dvaceti minutách působení trypsinu se v záznamu objevuje pouze malý pík náležející štěpnému fragmentu VNWOrnOrnILGOrn-OH (pík 1). Ve třetí hodině, kdy už byl peptid LL-III zcela hydrolyzován, nehydrolyzovaný analog s ornithinem LL-III/24 je stále dominantní

složkou reakční směsi (Obr. 4.29). K úplnému odbourání nedošlo ani po 24. hodinovém působení trypsinu.

Identifikované fragmenty jsou uvedeny v tabulce 4.9.

Tabulka 4.9: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi LL-III/24 s trypsinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	<i>H</i>	<i>t_R</i> (min)	Monoizotopická molekulová váha (Da)	
				vypočítaná	nalezená
1	VNWOrnOrnILGOrn-OH	9,78	21,50	1042,63	1042,50
2*	VNWOrnOrnILGOrnIIOrnVVOOrn-NH ₂	10,43	31,89	1694,11	1694,00
3	VNWOrnOrn-OH	8,80	11,67	645,36	645,30
4	VNWOrn-OH	11,15	13,08	531,28	531,20
5	VNWOrnOrnIL-OH	12,67	23,69	871,53	871,90
6	neurčeno		32,20		1680,00

Pozn. * - původní peptid

Celkem bylo izolováno 6 chromatografických píků, z nichž se 1 nepodařilo identifikovat (pík 6). Molekulová váha tohoto peptidu byla 1680,00 Da. Rozdíl od molekulové váhy neštěpeného peptidu LL-III/24 je 14 Da. To odpovídá např. odtržení CH₃- skupiny a nahrazení atomem vodíku. Pravděpodobně tedy jde o nějaký fragment nezpůsobený trypsinem, ale jiným mechanismem.

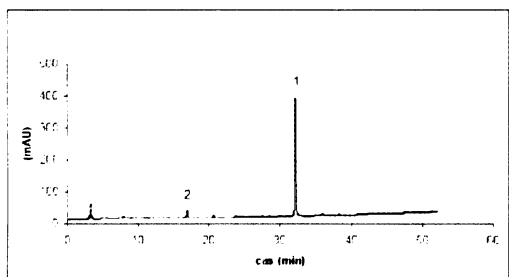
Ze sekvence ostatních identifikovaných píků bylo stanoveno pět míst hydrolýzy. Ty jsou vyznačeny na následujícím schématu:



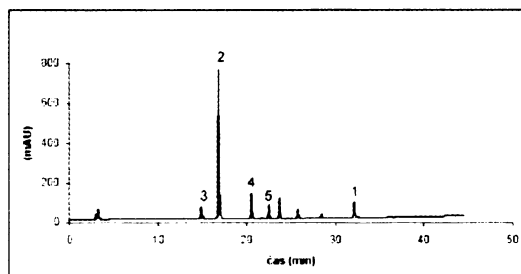
K hydrolýze došlo na karboxylové straně ornithinu stejně jako u lysinu, ale kinetika hydrolýzy byla mnohem pomalejší. Štěpení mezi sedmou a osmou aminokyselinou („za“ leucinem) bylo pravděpodobně jako v předchozích případech způsobeno kontaminací α -chymotrypsinem, pro který je tato pozice štěpení charakteristická.

4.2.10 Štěpení LL-III/24 α -chymotrypsinem

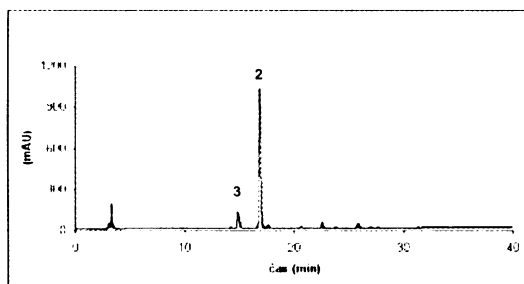
K popisu reakce byly vybrány HPLC záznamy reakce z 1. minuty (Obr. 4.31), 20. minuty (Obr. 4.32) a 2. hodiny (Obr. 4.33).



Obr. 4.31; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/24 s α -chymotrypsinem, 1. min., pro MS analýzu odebrány 2 píky



Obr. 4.32; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/24 s α -chymotrypsinem, 20. min., pro MS analýzu odebráno 5 píků



Obr. 4.33; RP-HPLC profil reakční směsi LL-III/24 s α -chymotrypsinem, 2.hod., pro MS analýzu odebrány 2 píky

Bylo zjištěno, že proti působení α -chymotrypsinu tento peptid stabilní není. Již po dvaceti minutách působení enzymu byl téměř všechen peptid LL-III/24 hydrolyzován. Z reakční směsi bylo separováno a identifikováno 5 píků (Tabulka 4.10).

Tabulka 4.10: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi LL-III/24 s α -chymotrypsinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	<i>H</i>	<i>t_R</i> (min)	Monoizotopická molekulová váha (Da)	
				vypočítaná	nalezená
1*	VNW OrnOrn ILG Orn l Orn V Orn -NH ₂	10,43	32,15	1694,11	1694,20
2	VNW-OH	15,07	16,82	417,20	417,20
3	OrnOrn IL-OH	10,88	14,82	472,34	472,30
	G Orn l Orn V Orn -NH ₂	8,48		840,59	840,50
4	OrnOrn ILG Orn l Orn V Orn -NH ₂	5,71	20,59	1294,92	1294,80
5	VNW OrnOrn IL-OH	12,67	22,51	871,53	871,40

Pozn. * - původní peptid

Ze sekvence fragmentů byla určena místa enzymatického štěpení, která jsou naznačena na následujícím schématu červenou čarou:



Opět byla nalezena místa štěpení specifická pro α -chymotrypsin – na karboxylové straně tryptofanu a leucinu. Rychlá tvorba a vysoká koncentrace peptidu VNW-OH (pík 2) dokazuje, že nahrazení lysinu ornithinem nemělo vliv na zvýšení enzymatické stability peptidové vazby mezi tryptofanem a ornithinem proti působení α -chymotrypsinu.

V záznamu ze třetí hodiny reakce (Obr. 4.33) bylo nalezeno i štěpení za ornithinem. Předpokládám, že k tomuto štěpení došlo opět působením trypsinu, kterým byl α -chymotrypsin kontaminován.

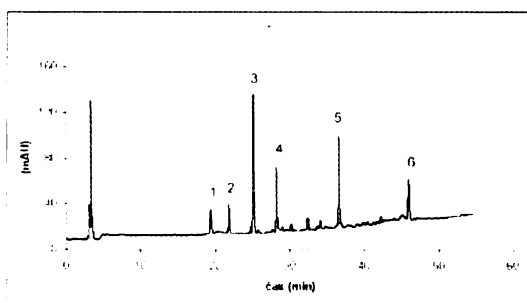
Ve frakci odebrané v čase 14,82 minut (pík 3) byly identifikovány dva fragmenty proteolytického štěpení. Jsou to peptidy OrnOrnIL-OH a GOrnOrnVOrn-NH₂. Rozdílná velikost jejich molekul a hodnot hydrofobicit (*H*) by na první pohled dávala předpoklad i rozdílných retenčních časů. Avšak v celkovém součtu byly kolonou eluovány stejnou silou a tedy se stejným retenčním časem.

4.3. Enzymatické štěpení peptidu PDD-B a jeho analogu

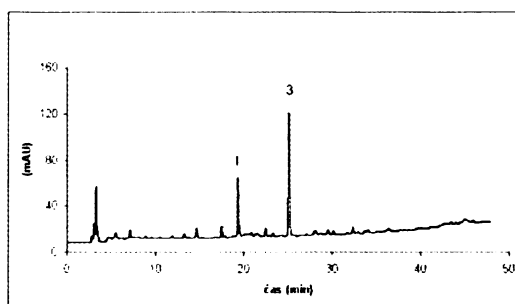
Peptid PDD-B, původně izolován z jedového rezervoáru sociální vosy *Polistes dorsalis dorsalis* obývajících Dominikánskou Republiku, a jeho analog peptid PDD-B-1 byly podrobeny inkubaci s chymotrypsinem. Jedná se o jeden z nově identifikovaných mastoparanů [6].

4.3.1. Štěpení PDD-B α -chymotrypsinem

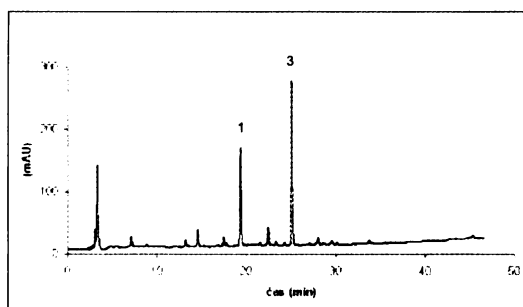
Aminokyselinová sekvence peptidu PDD-B je INWLKLGKKILGAL-NH₂, molekulová váha činí 1565,02 Da a retenční čas odpovídá 36,10 minutě. K zhodnocení proteolytické reakce byly vybrány HPLC profily reakční směsi 1. minuty (Obr. 4.34), 20. minuty (Obr. 4.35) a 3. hodiny (Obr. 4.36).



Obr. 4.34; RP-HPLC profil reakční směsi PDD-B s α -chymotrypsinem, 1. min., pro MS analýzu odebráno 6 piků



Obr. 4.35; RP-HPLC profil reakční směsi PDD-B s α -chymotrypsinem, 20. min., pro MS analýzu odebrány 2 piky



Obr. 4.36; RP-HPLC profil reakční směsi PDD-B s α -chymotrypsinem, 3. hod., pro MS analýzu odebrány 2 piky

Hydrolyza peptidu PDD-B α -chymotrypsinem proběhla velmi rychle. Již v chromato-

grafickém záznamu reakce z 20. minuty (Obr. 4.35) není patrný pík odpovídající jeho retenčnímu času. Celkem bylo z HPLC systému odebráno 6 frakcí. MS analýzou byly určeny jejich molekulové váhy (Tabulka 4.11).

Tabulka 4.11: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi PDD-B s α -chymotrypsinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	<i>H</i>	<i>t_R</i> (min)	Monoizotopická molekulová váha (Da)	
				vypočítaná	nalezená
1	INW-OH	17,73	19,29	431,22	431,19
2	KLGGKILGAL-OH	10,25	21,75	1038,73	1038,90
3	INWL-OH	19,13	25,03	544,30	544,39
4	INWLKL-OH	17,10	28,12	785,48	785,60
5*	INWLKLGKKILGAL-NH ₂	12,79	36,53	1565,02	1565,20
6	neurčeno		45,86		2093,80

Pozn. * - původní peptid

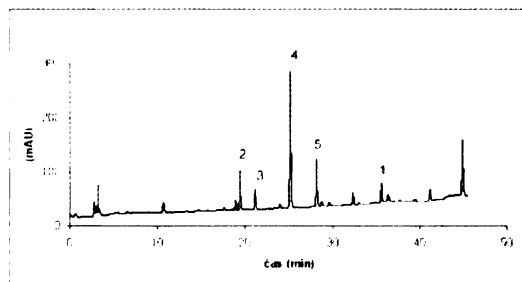
K štěpení došlo na místech vyznačených červeně na následujícím schématu:



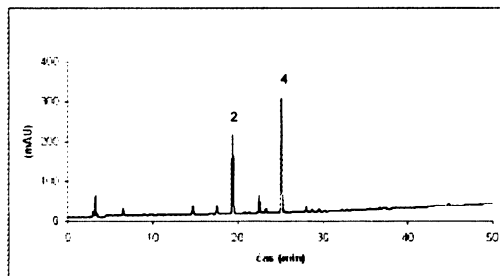
Potvrdila se předpokládaná místa štěpení charakteristická pro α -chymotrypsin. Velmi výrazné jsou chromatografické píky obsahující tryptofan, fragmenty INW-OH (pík1) a INWL (pík 3). Peptid INWLKL-OH (pík 4), který se objevuje v chromatografickém záznamu reakce 1. minuty, se dále rozpadá na již zmíněné fragmenty označené jako pík 1 a 3.

4.3.2 Štěpení PDD-B-1 α -chymotrypsinem

Syntetický analog PDD-B-1 se od přírodního PDD-B liší pouze poslední aminokyselinou v sekvenci, kterou není leucin ale isoleucin. Jeho sekvence tedy je INWLKLGKKILGAI-NH₂, molekulová váha zůstala stejná a retenční čas je 35,17 minut. K zhodnocení průběhu reakce byly vybrány HPLC profily reakční směsi z 1. minuty (Obr. 4.37) a 1. hodiny (Obr.4.38).



Obr. 4.37; RP-HPLC profil reakční směsi PDD-B-1 s α -chymotrypsinem, 1. min., identifikováno 5 píků



Obr. 4.38 ; RP-HPLC profil reakční směsi PDD-B-1 s α -chymotrypsinem, 1.hod., identifikovány 2 píků

Reakce byla opět velmi rychlá. Peptid PDD-B-1 byl již po jedné minutě působení enzymu silně degradován. Hlavními produkty hydrolyzy byly stejně jako u peptidu PDD-B dva fragmenty s aminokyselinovou sekvencí INW-OH (pík 2) a INWL-OH (pík 4). Fyzikální vlastnosti všech identifikovaných fragmentů jsou uvedeny v tabulce 4.12.

Tabulka 4.12: Fyzikální vlastnosti peptidů reakční směsi PDD-B-1 s α -chymotrypsinem

Číslo píku	Aminokyselinová sekvence	H	t_R (min)	Momoizotopická	
				molekulová váha (Da) vypočítaná	nalezená
1*	INWLKLGKKILGAI-NH ₂	12,79	35,49	1565,02	1565,98
2	INW-OH	17,73	19,44	431,22	431,19
3	KLKGGKILGAI-NH ₂	10,25	21,20	1038,73	1038,84
4	INWL-OH	19,13	25,22	544,30	544,24
5	INWLKL-OH	17,10	28,22	785,48	785,49

Pozn. * - původní peptid

K hydrolyze peptidové vazby došlo v pozicích vyznačených červeně na následujícím schématu:



Stejně jako u peptidu PDD-B došlo ke štěpení vazby na karboxylové straně tryptofanu a leucinu. Záměna leucinu za isoleucin vedla k zabránění hydrolyzy amidové skupiny na konci řetězce.

5. Závěr

Bylo provedeno testování enzymatické stability vybraných antimikrobiálních peptidů s enzymy trypsin, α -chymotrypsin a subtilisin, dále s bakteriální kulturou *Bacillus subtilis* a s krevním sérem z potkana v závislosti na době působení enzymu (resp. bakteriální kultury, séra).

Separace produktů enzymatického štěpení peptidů byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi a jejich následná identifikace pak byla uskutečněna pomocí hmotnostní spektrometrie. K výpočtu molekulárních hmotností bylo využito softwarového programu Peptide Companion.

Výsledky ukazují na poměrně malou enzymatickou stabilitu výchozích peptidů MEP, LL-III a PDD-B. Jejich úplná degradace proběhla do tří hodin od smíchání roztoků enzymu a peptidu (váhový poměr 1 : 40). Použitím peptidu LL-III/12 s D-konfigurací všech aminokyselin bylo dosaženo úplné stability proti působení trypsinu. V případě, kdy byly do sekvence zabudovány jen D-lysiny (peptid LL-III/13), došlo taktéž k podstatnému zvýšení stability. Bylo zjištěno, že při náhradě pro hydrolýzu klíčových AMK v původní sekvenci peptidů neproteinogenními aminokyselinami, došlo ke zpomalení nebo úplnému zamezení štěpení. Konkrétně se jedná o nahrazení lysinů ornithinem nebo kyselinou aminoisomáselnou v sekvenci lasioglossinu III. Náhrada lysinů ornithinem způsobila výrazné zpomalení degradace. V HPLC profilu této reakce ve 24. hodině (Obr. 4.30 – str. 46) je stále patrný pík odpovídající nedegradovanému peptidu LL-III/24. Při použití kyseliny aminoisomáselné jako náhradu za aminokyselinu nacházející se na karboxylové straně lysinů (peptid LL-III/19) nedošlo ke štěpení na těchto specifických místech trypsinem. Hydrolýza proběhla pouze v místech, kde v pozici „za“ lysinem nenásledovala kyselina aminoisomáselná. U peptidu LL-III/21, kde jsou kyselinou aminoisomáselnou nahrazeny všechny alifatické aminokyseliny (L, I, V) než jen následující za lysinem, nebylo pozorováno žádné štěpení ani po 24. hodinovém působení subtilisinu. Též bylo ve všech uvedených příkladech pozorováno, že ke štěpení peptidových vazeb α -chymotrypsinem nedochází na karboxylové straně isoleucinu (I), avšak vždy na karboxylové straně isobarického (stejná molekulová hmotnost) leucinu (L). Tohoto poznatku je možno využít například při sekvenování peptidů hmotnostní spektrometrií s využitím metody MS/MS

v kombinaci se štěpením katalyzovaným α -chymotrypsinem.

Retenční časy štěpných fragmentů odpovídaly velikosti peptidu a hodnotě hydrofobicity, která byla průměrem hydrofobicit jednotlivých AMK.

Místa v sekvenci AMK, kde došlo k degradaci peptidové vazby, odpovídaly předpokládaným pozicím. Výjimkou bylo pouze štěpení melectinu α -chymotrypsinem, kdy byly nalezeny fragmenty odpovídající štěpení peptidové vazby Leu-Pro. V tomto místě by k hydrolyze docházet nemělo, protože molekula prolinu je na rozdíl od všech ostatních aminokyselin do peptidové vazby zapojena jako sekundární amin, jenž nezapadá do mechanismu štěpení použitých proteáz.

6. Literatura

- [1] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotika> [cit. 9.2.2009]
- [2] Neu C. H.: *Science* **257** 1064-1073 (1992)
- [3] Anadón A.: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **29** 41-44 (2006)
- [4] Čeřovský V., Hovorka O., Cvačka J., Votruba Z., Bednářová L., Borovičková L., Slaninová J., Fučík V.: *ChemBioChem* **9** 2815-2821 (2008)
- [5] Čeřovský V., Buděšínský M., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Slaninová J., Borovičková L., Fučík V., Bednářová L., Votruba I., Straka J.: *ChemBioChem*, *zasláno do tisku*
- [6] Čeřovský V., Slaninová J., Fučík V., Hulačová H., Borovičková L., Ježek R., Bednářová L.: *Peptides* **29** 992-1003 (2008)
- [7] Kolektiv pracovníků katedry biochemie: *Biochemie*, Karolinum Praha (1995)
- [8] Štern P. a kolektiv autorů: *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*, Karolinum Praha (2005)
- [9] Brogden K.A.: *Nature Reviews Microbiology* **3** 238-250 (March 2005)
- [10] Toke O.: *Biopolymers* **80** 717-735 (2005)
- [11] Papo N., Oren Z., Pag U., Sahl H.S., Shai Y.: *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 33913-33921 (2002)
- [12] Yamamoto T., Arimoto H., Kinumi T., Oba Y., Uemura D.: *Insect Biochemistry and Molekular Biology* **37** 278-286 (2006)
- [13] Turillazzi S., Mastrobuoni G., Dani R., Moneti G., Pieraccini G., la Marca G.: *Ameruican Society for Mass Spectrometry* **17** 376-383 (2006)
- [14] Broekaert W. F., Cammue B. P. A., de Bolle M. F. C., Thevissen K., de Samblanx G. W., Osborn R. W.: *Critical rewies in plant science* **16** 297-323 (1997)
- [15] <http://www.insektenbox.de/hautfl/getrau.htm> [cit. 20.2.2009]
- [16] <http://www.paul-westrich.de/forschung/beobachtung20070403.php> [cit. 20.2.2009]
- [17] <http://www.insectimages.org/search/action.cfm?q=Vespidae> [cit. 20.2.2009]

- [18] L. Kuhn-Nentwig: *Cellular and Molecular Life Sciences* **10** 2651-2668 (2004)
- [19] Ganz T.: *Integr.Comp.Biol.* **43** 300-304 (2003)
- [20] Matsuzaki K., Fukui M., Fujii N., Miyajima K.: *Biochim. Biophys. Acta* **1070** 259-264 (1991)
- [21] Sitaram N., Nagaraj R.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1462** 29-54 (1999)
- [22] Macholán L., Barthová J., Kučera I., Zelinka J.: *Enzymologie*, Státní pedagogické nakladatelství Praha (1983)
- [23] Hřčková M., Šturdík E., Maliar T, Zemanovič J.: *Chem.Listy* **98** 842-850 (2004)
- [24] Štrosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebela M.: *Chem.Listy* **99** 896-905 (2005)
- [25] http://www.cbse.uab.edu/ribbons/examples/trypsin_fig2.jpg
- [26] Štrosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebelová M.: *Chem. Listy* **99** 896-905 (2005)
- [27] Vaňková H.: *Chem. Listy* **93** 120-127 (1999)
- [28] Pacáková V., Štulík K.: *High performance liquid chromatography*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha (1990)
- [29] Štulík K., Pacáková V., Suchánková J., Claessens H. A.: *Anal. Chim. Acta* **352** 1-12 (1997)
- [30] Rissler K.: *J. Chromatogr. B* **665** 233-270 (1995)
- [31] <http://www.globalpeptide.com/faq.html>
- [32] Toll H., Oberacher H., Swart R., Huber C.G.: *J. Chromatogr. A* **1079** 274-286 (2005)
- [33] Huber C. G., Premstaller A.: *J. Chromatogr.A* **849** 161-173 (1999)
- [34] <http://www.hplc.cz/> [cit. 10.3.2009]
- [35] Štulík K. et al.: *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek*, VŠCHT Praha (2006)
- [36] Campana E. J., Sheng L.-S., Shew S. L., Winger B., E.: *Trends in Analytical Chemistry* **13** 239-247 (1994)
- [37] Šedo O., Havel J.: *Chem. Listy* **97** 109-113 (2003)
- [38] Holčapek M., Jandera P.: *Chem.Listy* **92** 278-286 (1998)
- [39] <http://www.oc.uni-koeln.de/ms-oc/esi.htm> [cit. 15.3.2009]
- [40] Klouda P.: *Moderní analytické metody*, nakladatelství Pavla Kloudy, Ostrava (2003)

- [41] Lenčo J., Stulík J.: *Chem. Listy* **98** 264-267 (2004)
- [42] Liu T., Belov M.E., Jaitly N., Qian W., Smith R.D.: *Chem. Rev.* **107** 3621-3653 (2007)
- [43] Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M.: *Chem. Listy* **101** 190-199 (2007)
- [44] Kovacs J. M., Mant C. T., Hodges R. S.: *Biopolymers* **84** 283-297 (2006)