

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Adam Čepa

IMOBILIZACE PROTEASY V8 NA MAGNETICKÝCH
KULIČKÁCH PRO POUŽITÍ K PROTEOLYTICKÉMU
ŠTĚPENÍ PEPSINU A

Immobilization of protease V8 on magnetic particles for
application to proteolytic cleavage of pepsin A

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Praha 2011

PROHLÁŠENÍ

Tato bakalářská práce vznikla za finanční podpory projektů MŠMT:
No. 0021620806, No. 0021620857 a No. LC 06044.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky Prof. RNDr. Věry Pacákové, CSc. a konzultantky Ing. Zdeny Kučerové, CSc. Veškerou použitou literaturu a web jsem řádně odcitoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci mimo Karlovu Univerzitu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Použité zkratky

<i>AK</i>	<i>aminokyseliny</i>
<i>Asp</i>	<i>kyselina asparagová</i>
<i>BCA</i>	<i>kyselina bicinchoninová</i>
<i>DTT</i>	<i>dithiotreitol</i>
<i>EC</i>	<i>Enzyme Comission</i>
<i>Glu</i>	<i>kyselina glutamová</i>
<i>GluV8</i>	<i>proteasa V8 skupiny glutamyl endopeptidas kmene Staphylococcus aureus</i>
<i>Hb</i>	<i>hemoglobin</i>
<i>HbS</i>	<i>hemoglobinový substrát</i>
<i>HGMS</i>	<i>gradientový magnetický separátor</i>
<i>IAA</i>	<i>jodacetamid</i>
K_d	<i>disociační konstanta komplexu ligand-protein</i>
<i>mag.</i>	<i>magnetický</i>
<i>MS</i>	<i>hmotnostní spektrometrie</i>
<i>MSM</i>	<i>magnetické separační metody</i>
<i>PŘ</i>	<i>polypeptidový řetězec</i>
<i>rpm</i>	<i>otáčky za minutu</i>
<i>TCA</i>	<i>kyselina trichloroctová</i>

Použité symboly

<i>A</i>	<i>absorbance</i>
c^*	<i>rovnovážná koncentrace biomolekuly v roztoku</i>
Q^*	<i>sorpční rovnováha magnetických adsorpčních částic</i>
Q_{max}	<i>maximální vazebná kapacita adsorbentu</i>
<i>t</i>	<i>teplota</i>
<i>w</i>	<i>hmotnostní zlomek</i>

ABSTRAKT (ČESKÁ VERZE)

Tato bakalářská práce navazuje na dlouholetý výzkum v oblasti diagnostiky onemocnění žaludku, který je založen na mapování žaludečního enzymu pepsinu A.

Bylo zjištěno, že určité fosforylace v primární struktuře tohoto enzymu mohou sloužit jako marker počínající karcinogenity. Tato bakalářská práce je zaměřena na imobilizaci proteasy V8 izolované z mikroorganismu *Stafylococcus aureus* na agarosových magnetických kuličkách. Proteasa V8 je vhodným kandidátem pro tvorbu peptidové mapy pepsinu A. Byl studován vliv pH, teploty a reakční doby na aktivitu enzymu a určeny optimální podmínky pro hydrolytickou katalýzu tvorby peptidických fragmentů pepsinu A.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enzym

Proteasa V8

Katalýza

Magnetické částice

Optimalizace

ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

This thesis is part of a long-standing research in the field of diagnosis of the stomach diseases, which is based on the gastric enzyme pepsin A mapping. It was found that a phosphorylation in the primary structure of this enzyme may serve as a marker of incipient stage of carcinogenesis. This thesis is focused on the immobilization of protease V8 isolated from microorganism *Stafylococcus aureus* to magnetic agarose beads.

Protease V8 is a promising candidate for producing peptide maps of pepsin A. The influence of pH, temperature and reaction time on the enzyme to activity has been studied and the optimal conditions for hydrolytic catalysis of formation of peptide fragments of pepsin A.

KEYWORDS

Enzyme

Protease V8

Catalysis

Magnetic particles

Optimisation

OBSAH

Úvod	8
1. Teoretický úvod	9
1.1 Proteiny	9
1.1.1 Struktura proteinů	9
1.1.1.1 Primární struktura proteinů	9
1.1.1.2 Sekundární struktura proteinů	12
1.1.1.2.1 α -helix	13
1.1.1.2.2 β -struktura	13
1.1.1.3 Terciární struktura proteinů	14
1.1.1.4 Kvarterní struktura proteinů	14
1.1.2 Enzymy	14
1.1.2.1 Klasifikace enzymů	15
1.2 Příprava peptidových směsí proteolytickým štěpením	16
1.2.1 Proteolytické enzymy	17
1.2.1.1 Proteasa V8	18
1.2.2 Stabilizace enzymů	19
1.2.2.1 Magnetické částice	20
1.2.2.2 Vlastnosti magnetických částic	20
1.2.2.3 Základní principy magnetických vsádkových separací	21
1.2.2.4 Výhody magnetických separačních metod	22
1.2.2.5 Magnetické agarosové částice aktivované glyoxalem	22
1.2.2.6 Magnetické separátory	24
2. Experimentální část	25
2.1 Chemikálie	25
2.2 Přístroje	26
2.3 Pracovní postupy	27
2.3.1 Imobilizace proteasy V8 na magnetických částicích	27
2.3.2 Analytické metody	28

2.3.2.1	<u>Stanovení koncentrace navázaného proteinu</u>	<u>28</u>
2.3.2.2	<u>Stanovení enz. aktivity imob. enzymu metodou Anson-Mirsky</u>	<u>28</u>
2.3.2.3	<u>Stanovení aktivity enzymu BCA metodou</u>	<u>29</u>
2.3.2.4	<u>Stanovení volné proteasy V8 spektrofotometricky</u>	<u>29</u>
2.3.2.5	<u>Stanovení aktivity volného enz. V8 pomocí metody Anson-Mirsky</u>	<u>29</u>
2.3.3	<u>Optimalizace podmínek pro štěpení imobilizovanou proteasou V8</u>	<u>30</u>
2.3.3.1	<u>Vliv pH</u>	<u>30</u>
2.3.3.2	<u>Vliv teploty</u>	<u>30</u>
2.3.3.3	<u>Stabilita</u>	<u>30</u>
2.3.3.4	<u>Časová závislost</u>	<u>31</u>
2.3.3.5	<u>Opakovatelnost</u>	<u>31</u>
3.	<u>Výsledky a diskuze</u>	<u>32</u>
3.1	<u>Imobilizace proteasy V8 na magnetické nosiče</u>	<u>32</u>
3.2	<u>Stanovení volné proteasy V8</u>	<u>32</u>
3.2.1	<u>Volná proteasa V8</u>	<u>32</u>
3.2.1.1	<u>Stanovení volné proteasy V8 spektrofot. (množství proteinu)</u>	<u>32</u>
3.2.1.2	<u>Stanovení volného enzymu V8 metodou Anson-Mirsky (aktivita)</u>	<u>34</u>
3.2.1.3	<u>Vliv teploty na aktivitu volné proteasy V8</u>	<u>35</u>
3.2.2	<u>Stanovení vázaného enzymu-optimalizace podmínek štěpení</u>	<u>36</u>
3.2.2.1	<u>Vliv pH</u>	<u>36</u>
3.2.2.2	<u>Vliv teploty</u>	<u>37</u>
3.2.2.3	<u>Stabilita</u>	<u>38</u>
3.2.2.4	<u>Časová závislost</u>	<u>39</u>
3.2.3	<u>Opakovatelnost</u>	<u>40</u>
3.3	<u>Porovnání volné a vázané proteasy V8 v závislosti na teplotě</u>	<u>41</u>
4.	<u>Závěr</u>	<u>42</u>
5.	<u>Použitá literatura</u>	<u>43</u>
	<u>Poděkování</u>	<u>45</u>

ÚVOD

Téma bakalářské práce navazuje na dlouholetý výzkum Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze v oblasti onemocnění žaludku se zaměřením na úlohu aspartátových proteinas v těchto procesech a na změny v jejich v posttranslační modifikaci, které tyto procesy doprovázejí.

Většina buněčných procesů je regulována reverzibilní fosforylací proteinů na aminokyselinách serinu, tyrosinu a threoninu [1]. Jenom jedna třetina ze všech proteinů obsahuje kovalentně vázaný fosfát.

Anomální fosforylace proteinů může být spojena s rozvojem rakoviny nebo metabolickými poruchami [2,3]. Lidské pepsiny patří k proteinům s velkým rozsahem fosforylace, související s nemocemi žaludku a tuto skutečnost lze použít v diagnostice karcinomu žaludku.

Navzdory významu a rozšíření této modifikace, identifikace lokalit fosforylace proteinů není stále ještě vyřešena, i když se provádí na vysoce přečištěných proteinech[4-6]. Vypracování metod separace a analýzy fosfoproteinů je užitečné, nejen pro lepší pochopení role těchto modifikovaných proteinů v živých systémech, ale také pro diagnostické účely[7].

Cílem této práce je navázání proteasy V8 na magnetické nosiče a poté studium jejích vlastností. Byla studována především závislost aktivity enzymu na pH, teplotě, době štěpení, dále teplotní stabilita, která byla srovnána s rozpustnou proteasou V8, a opakované použití imobilizovaného enzymového preparátu.

Imobilizací a vymezením optimálních podmínek byla připravena proteasa V8 pro tvorbu peptidových map pepsinu.

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Proteiny

Proteiny nejsou pouhými stavebními kameny, z nichž je tvořena buňka, ale jsou i funkčními zprostředkovateli většiny reakčních kaskád uvnitř buněk. Variabilita funkcí proteinů pramení z jejich rozsáhlé strukturní četnosti.[8]

1.1.1. Struktura proteinů

Struktura proteinů je popisována z hlediska 4 úrovní. Jednotlivé úrovně popisují složitost skládání proteinů a utvoření jejich aktivních míst.[9]

1.1.1.1. Primární struktura proteinů

Primární struktura proteinů je dána pořadím aminokyselin v polypeptidovém řetězci. V proteinech se vyskytuje 21 proteinogenních aminokyselin (AK), z nich každá má jiné chemické vlastnosti (Tab. 1). Opakující se část atomů v peptidovém řetězci se nazývá polypeptidová kostra. Okolo této kostry jsou připojeny postranní řetězce AK. Podle typu AK mohou mít postranní řetězce charakter nepolární a hydrofóbní, jiné jsou záporně či kladně nabitě, některé jsou reaktivní, některé naopak.

Každý typ proteinů má různé pořadí a zastoupení AK. Dlouhý řetězec AK má mnoho kovalentních vazeb, kolem kterých má možnost rotace. Stabilizace řetězce je zprostředkována několika chemickými interakcemi (více sekundární struktura proteinů).[8]

Tab. 1 Aminokyseliny a jejich postranní řetězce [8]

Název (zkratka)	Vzorec	Postranní řetězec
Glycin (Gly, G)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Alanin (Ala, A)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Valin (Val, V)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{HC} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Leucin (Leu, L)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{HC} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Isoleucin (Ile, I)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{HC} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Prolin (Pro, P)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \diagdown \text{CH}_2 \\ \text{H}_2\text{N}^+ \quad \diagup \text{CH}_2 \end{array}$	Nepolární
Fenylalanin (Phe, F)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Tyrosin (Tyr, Y)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Polární bez náboje
Tryptofan (Trp, W)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_8\text{H}_6\text{N} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Histidin (His, H)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{NH} \\ \diagdown \text{CH} \\ \text{CH} \\ \text{NH}^+ \end{array} \end{array}$	Pozitivní

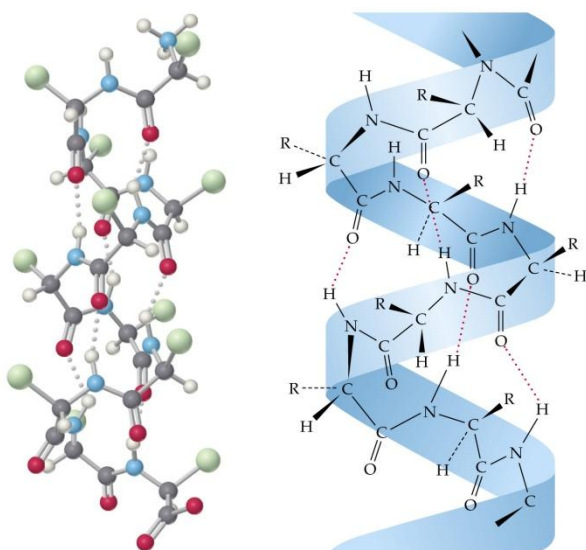
Serin (Ser, S)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Polární bez náboje
Threonin (Thr, T)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{OH} \end{array}$	Polární bez náboje
Cystein (Cys, C)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Methionin (Met, M)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Nepolární
Lysin (Lys, K)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Pozitivní
Arginin (Arg, R)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{HN}-\text{C} \begin{array}{l} \text{=NH}_2^+ \\ \text{NH}_2 \end{array} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Pozitivní
Asparagová kyselina (Asp, D)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Negativní
Glutamová kyselina (Glu, E)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Negativní
Asparagin (Asn, N)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Polární bez náboje
Glutamin (Gln, Q)	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Polární bez náboje

1.1.1.2. Sekundární struktura proteinů

V jednotlivých polypeptidových řetězcích dochází ke spojování skupin N-H a C=O pomocí vodíkových můstků, což vytváří konformační změnu řetězce, která je popsána tzv. sekundární strukturou proteinu. Při srovnání struktur mnoha různých proteinů vychází najevo, že přes specifičnost jednotlivých konformací každého proteinu, v nich lze najít obvykle dva základní modely skládání. První z nich je α -šroubovice (α -helix), která byla poprvé objevena v proteinu α -keratinu (obr. 1), který se ve velkém množství vyskytuje v kůži a jejich derivátech (vlasy, chlupy, nehty atd.).

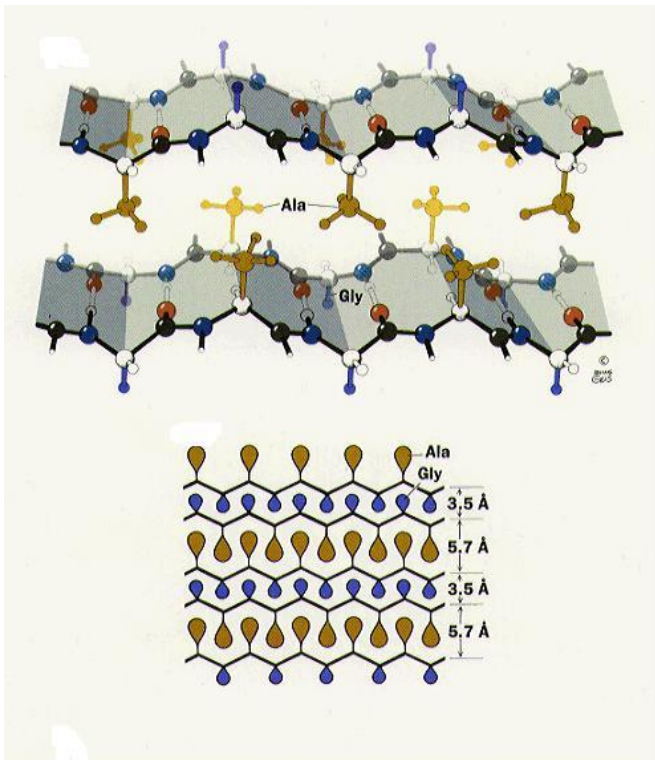
Druhým modelem skládání je β -struktura (struktura skládaného listu), která byla poprvé objevena v proteinu fibroinu (obr. 2).

Zvláštním případem sekundární struktury je tzv. proteinová doména, též nazývaná suprasekundární struktura. Je tvořena libovolným úsekem polypeptidového řetězce, který má schopnost svinutí se do rigidní struktury. Suprasekundární struktura většinou obsahuje kolem 50 až 350 AK a je stavební jednotkou většiny proteinů. [8]



Obr. 1 Vzorec α -keratinu

(převzato z : <http://itech.dickinson.edu/chemistry/wp-content/uploads/2008/05/keratin.JPG>; cit. 5.4.2010)



Obr. 2 Vzorec fibroinu

(převzato z : <http://www.nd.edu/~aseriann/silk.gif> ; cit. 5.4.2010)

1.1.1.2.1. α -Helix

Uspořádání vodíkových vazeb α -helixu je takové, že skupina C=O peptidové vazby směřuje ke skupině N-H peptidové vazby, což způsobuje vznik pevných vodíkových můstků.

Střed α -helixu je těsně stočen, takže jeho atomy se dotýkají svými van der Walsovými povrchy, čímž je jejich sdružující energie maximální. Jednotlivé postranní řetězce AK vyčnívají ven ze šroubovice, a proto nedochází k sterickému konfliktu s kostrou polypeptidu a mezi sebou navzájem. [9]

1.1.1.2.2. β -struktura

Tato struktura, stejně jako α -helix, využívá vazebnou kapacitu vodíkových můstků polypeptidového řetězce. Avšak vodíkové můstky se vyskytují převážně mezi polypeptidovými řetězci než uvnitř řetězce, což je případ α -helix.

Struktura skládaného listu má dvě varianty: paralelní a antiparalelní skládaný list. Rozdíl mezi těmito dvěma variantami je v orientaci sousedních polypeptidových řetězců. [9]

1.1.1.3. Terciární struktura proteinů

Základní jednotkou terciární struktury jsou domény. Doména je definovaná, jako polypeptidový řetězec nebo část polypeptidového řetězce, který může být složen do stabilní terciární struktury. Často se variabilita domén promítá do funkční různorodosti proteinů.

Proteiny mohou zahrnovat jednu nebo až několik desítek domén. Neexistuje žádný zásadní rozdíl mezi doménou a podjednotkou.

Nelze definovat stoprocentní hranici mezi sekundární a terciární strukturou. Terciární struktura vyjadřuje prostorové uspořádání AK zbytků, které se nacházejí v polypeptidovém řetězci vzdáleně od sebe. [10]

1.1.1.4. Kvarterní struktura proteinů

Kvarterní struktura proteinu poskytuje vodítka ke zjištění biologické funkce. Kvarterní struktura se uplatňuje pro proteiny, skládající se z několika polypeptidových řetězců. Tato struktura vyjadřuje proces vzájemné interakce s jinými molekulami v biologickém systému. [11]

1.1.2. Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory, což jsou látky, které jsou schopny urychlit biochemickou reakci v živých organismech. Bez enzymů by biochemické reakce probíhaly velice pomalu a to by způsobilo příliš pomalý chod metabolismu.

Enzymy jsou specifické proteiny, které jsou biologicky aktivní. Schopnost enzymu katalyzovat biochemické reakce je limitována optimálními podmínkami prostředí. Optimální podmínky určují např. pH nebo teplota. V extrémně nevhodných podmínkách dochází k denaturaci, tudíž ke ztrátě biologické aktivity. [12]

1.1.2.1. Klasifikace enzymů

Klasifikace enzymů byla definována enzymovou komisí (E.C.) [13] a je založená především na strukturách substrátů, produktů a příslušných kofaktorech. Existuje i základní rozdělení enzymů dle typu chemické reakce, kterou katalyzují (tab. 2), protože některé enzymy katalyzují několik základních reakcí, jako je oxidace/redukce, hydrolýza, odstranění/doplnění některých skupin a izomerace, které se velmi obtížně vyjadřují pouze jedním číslem podle E.C. [14,15]

Tab. 2 Klasifikace enzymů dle typu chemické reakce, kterou katalyzují

Třída enzymu	Typ katalyzované reakce
Oxidoreduktasy	Přenos elektronu (oxidace a redukce) mezi dvěma substráty
Transferasy	Přenos charakteristické skupiny mezi dvěma substráty
Hydrolasy	Hydrolytické štěpení substrátu
Lyasy	Nehydrolytické štěpení vazeb C-C v molekulách substrátu
Izomerasy	Vnitromolekulární přeměna substrátu, vzájemné přeměny jednotlivých izomerů
Ligasy (Syntetasy)	Slučování dvou molekul substrátu za současné spotřeby ATP

(převzato z: <http://www.gvi.cz/files/chemie/enzymy.pdf>; cit. 5.4.2010)

1.2. Příprava peptidových směsí proteolytickým štěpením

Metody k identifikaci proteinů nejčastěji využívají počáteční štěpení na peptidické fragmenty. Štěpení je prováděno buď chemickou nebo enzymovou cestou. Složitost identifikace peptidů se zvyšuje s pravděpodobností jejich překryvu, který vyplývá z jejich délky.

Proteolytické štěpení je velmi často využíváno z důvodů mnoha komerčně dostupných enzymů, které si lze vybrat přesně podle požadavků na získávané peptidické fragmenty. Proteolýza poskytuje řadu výhod. Jako nejdůležitější z nich je vysoká specifická, dále jsou skoro nepatrné vedlejší reakce a dochází k vysoké účinnosti při štěpení. Velice důležitým aspektem při proteolytických štěpeních je přesné nastavení reakčních podmínek, čemuž odpovídá optimalizace složení a pH reakčního pufru, poměru mezi substrátem a enzymem, teploty a časovému rozmezí inkubace.

Již zmíněné chemické metody užívané ke štěpení proteinů se používají jako doplňkové. Štěpení chemickými metodami se používá převážně tam, kde není možné provádět proteolýzu.

Velice šetrným procesem hydrolýzy proteinů je reakce se zředěnou kyselinou mravenčí, která působí v místě zbytků kyseliny aspartové a pro některé skupiny proteinů slouží i jako rozpouštědlo. Vůbec nejčastěji užívaným činidlem při chemických aplikacích, sloužících pro štěpení proteinů je kyanobromid, který štěpí na povrchu molekuly methionylové vazby, tato reakce však musí probíhat v kyselém prostředí.

Aby bylo proteolytické štěpení dostatečně reprodukovatelné je nutné, aby štěpící bílkovina byla zbavena biologické aktivity, čehož se nejlépe dosahuje rozpuštěním proteinu v denaturujícím roztoku (např. 8-molární močovina, 6-molární HCl nebo merkaptoethanol). U vysoce stabilních proteinů je důležité před denaturací provést modifikaci, jako např. redukci disulfidických vazeb pomocí dithiotreitolu (DTT) a následnou alkylaci reaktivních cysteinů jodacetamidem (IAA). [16,17]

Při použití enzymatického štěpení musí být vhodně zvolen poměr mezi enzymem a substrátem. Při nadměrném množství štěpícího enzymu může docházet k nespecifickému štěpení a k autokatalýze proteasy. Autokatalýza může způsobit přítomnost fragmentů štěpící proteasy ve výsledné peptidové mapě. To způsobuje vznik rušivého pozadí v MS detekci peptidové směsi, což způsobuje nepřesnou interpretaci

výsledků.[17]

Tento problém lze vyřešit navázáním volných enzymů za imobilizované proteasy. Imobilizované enzymy musí mít přístupné aktivní místo a musí prokazovat vysokou specifickou aktivitu, aby došlo k úplnému hydrolytickému štěpení analyzovaného proteinu.[18]

1.2.1. Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy katalyzují hydrolytické štěpení peptidů a proteinů uprostřed řetězce. Vlastnosti aktivního místa enzymu, které tvoří vazebná místa, určují jeho specifitu. Na základě získaných informací o aktivních místech enzymů se utvořily čtyři základní skupiny proteas: aspartátové, cysteinové (thiolové), serinové a proteasy obsahující iont kovu, jako kofaktor. Později k nim přibyla ještě skupina threoninových proteas. Toto rozdělení se používá i podle tzv. EC systému, na kterém je založeno celé názvosloví enzymů. Všechny proteolytické enzymy jsou řazeny do 3. enzymové třídy (hydrolázy) a konkrétně proteasy patří do podtřídy 3.4 - hydrolázy. Tato podtřída je ovšem tvořena celou řadou dalších podtříd. Při metodě peptidového mapování se nejčastěji využívají enzymy trypsin, chymotrypsin, dále rostlinné endopeptidázy papain, bromelain a také mnoho enzymů získaných z mikroorganismů, jako jsou thermolysin nebo subtilisin (tab. 3). [17]

Tab. 3: Přehled používaných proteináz [17]

Enzym	EC	Místo štěpení	pH optimum
Trypsin	EC 3.4.21.4	Lys, Arg (C-konec)	8,0 – 8,5
Chymotrypsin	EC 3.4.21.1	Phe, Tyr, Trp (C-konec)	7,0 – 9,0
Staphylococcal proteináza-V8	EC 3.4.21.19	Glu, Asp (C-konec)	4,0 a 8,0
Pepsin	EC 3.4.23.1	široká specifita (C-konec)	2,0 – 3,0
Papain	EC 3.4.22.2	široká specifita (C-konec)	6,0 – 7,0
Subtilisin	EC 3.4.21.62	široká specifita (C-konec)	7,0 – 11,0
Thermolysin	EC 3.4.24.4	široká specifita (N-konec)	7,0 – 8,5

1.2.1.1. Proteasa V8

V8 proteasa je člen skupiny glutamyl endopeptidas kmene *Staphylococcus aureus* (GluV8). Je široce používaným enzymem pro analýzu proteomu díky své jedinečné substrátové specifitě a odolnosti proti detergentům.

Tato proteasa specificky štěpí peptidovou vazbu za záporně nabitými rezidui, konkrétně za kyselinou glutamovou (Glu) a kyselinou asparagovou (Asp). V8 proteasa patří mezi endopeptidasy EC 3.4.21.19 (tab. 3). [23]

Pokud se nachází zbytek od kyseliny glutamové v C-koncovém nebo N-koncovém tripeptidu, je rychlost štěpení velice malá. Dále vazba mezi prolinem a Glu není štěpena vůbec. Proteasa V8 se používá v hojném zastoupení z důvodů komplementarity k trypsinu. [17]

1.2.2. Stabilizace enzymů

V medicíně, biochemii, průmyslu a dalších oborech se běžně využívá katalytických vlastností enzymů. Při výběru vhodné proteasy k hydrolytickému štěpení proteinů je určitým mezníkem nejenom specifita štěpení daného enzymu, ale také jeho stabilita za daných podmínek a v neposlední řadě schopnost autokatalýzy, která zhoršuje interpretaci výsledků analýzy peptidů.

Aby byly výsledky analýzy peptidů přesnější, tudíž aby byla stabilita štěpící proteasy vyšší a nedocházelo k autokatalýze, byly vytvořeny dva přístupy: 1. různé postupy imobilizace enzymů [19] na několik různých typů sorbentů (chromatografické sorbenty [20], magnetické [21,22]) a 2. modifikace molekul proteas.[19]

K vytvoření dostatečně stabilní a zároveň účinné formy imobilizovaného enzymu je důležitý výběr podmínek pro imobilizaci. Pro pozitivní imobilizaci je vhodný výběr nosiče pro enzym. Jeden z nejdůležitějších faktorů při imobilizaci je reakční čas, pH reakčního prostředí, teplota, pufrací schopnost prostředí a přítomnost inkubujících substancí.[19]

Celá proteomika se opírá o peptidové mapování, v nichž všechny proteiny ve vzorku jsou jako první rozštěpeny, dále jsou peptidy separovány a identifikovány. Obě techniky se spoléhají na identifikaci pomocí MS. Nezáleží na tom, který proteomický přístup je využíván, ale separace produktů enzymatického štěpení a identifikace peptidu jsou povinné. Konvenčně je štěpení dosaženo inkubací proteinů a proteasy ve vhodném pufru. Chceme-li minimalizovat proteolytickou autolýzu, je vhodné použít méně proteasy v poměru k substrátu. Vhodné poměry jsou 1:20-1:100 w / w, což vyžaduje prodloužení inkubační doby (3-24hod) a snížení štěpící účinnosti.

Dalším nevhodným aspektem při katalytickém štěpení je častá a rozsáhlá ruční manipulace se vzorky. Nový koncept štěpení pomocí imobilizované proteasy v mikroreaktorech získal pozornost vědců v posledních deseti letech výzkumu. Tato metoda má mnoho výhod oproti běžnému katalytickému štěpení, jako je minimalizace nebo úplná absence proteolytické autokatalýzy, zvýšení poměru mezi enzymem a substrátem, zkrácení reakčního času a vysoká účinnost štěpení.[23]

1.2.2.1. Magnetické částice

V posledních letech je kladen důraz na vývoj a aplikaci magnetických separačních technik, využívajících magnetické částice.[24] Metoda separací na magnetických částicích se v současné době využívá v různých oborech. Např. při izolaci virů, buněk a organel, izolaci proteinů, lékařství atd.

1.2.2.2. Vlastnosti magnetických částic

Částice by měly být z fyzikálního hlediska neporézní, měly by mít specifický povrch (20–100 m²/g), měly by se dát separovat magnetickým polem a důležitou vlastností částic je jejich jednotná velikost.

Průměr částic pohybujících se v rozmezí od 10 do 50 μm je vhodný pro separaci jednoduchými magnetickými separátory. Magnetické částice se skládají z:

Anorganické materiály:	Fe ₃ O ₄ -magnetit
	Fe ₃ S ₄ -greigit
	γ-Fe ₂ O ₃ -maghemit
Syntetické polymery:	poly(vinylbutyral)
	polystyren
Biopolymery:	agarosa
	chitosan

Pórovitá skla

Sorpční rovnováha je popsána Langmuirovým vztahem:

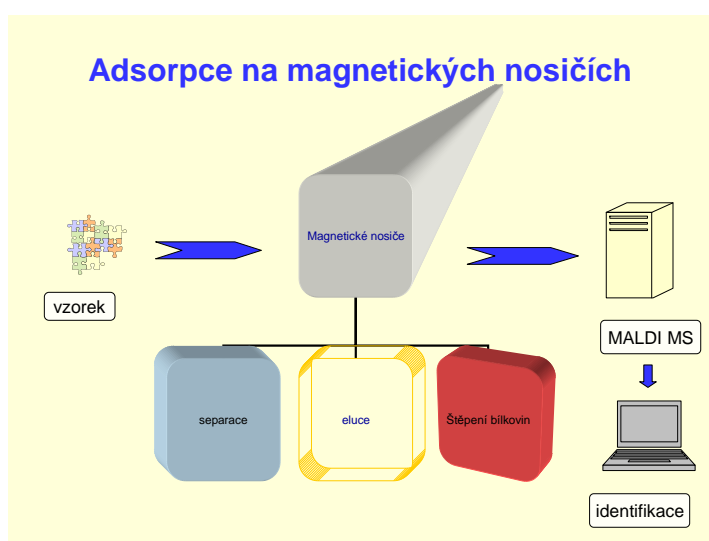
$$Q^* = (Q_{\max} \cdot c^*) / (K_d + c^*)$$

kde:

Q^*	sorpční rovnováha magnetických adsorpčních částic
Q_{\max}	maximální vazebná kapacita adsorbentu
c^*	rovnovážná koncentrace biomolekuly v roztoku
K_d	disociační konstanta komplexu ligand-protein (je měřena přímo ze stability komplexu => čím nižší K_d , tím menší je stabilita komplexu) [25]

1.2.2.3. Základní principy vsádkových magnetických separací

Magnetické nosiče, vázající na svém povrchu imobilizované afinitní ligandy, které mají schopnost vaznosti k izolovanému proteinu, jsou promíchány se vzorkem obsahujícím protein. Vzorky, které mohou být variabilní, např. moč, plazma, kultivační media, kompletní krev atd., se adsorbují na povrch magnetické částice (obr. 3). Dále je celý magnetický komplex vyjmut ze vzorku pomocí jednoduchého magnetického separátoru. Po několika promytích vhodným pufrem je možné izolovaný protein eluovat a použít pro další zpracování. [24]



Obr. 3 Adsorpce proteinu na povrch magnetické částice
(převzato z: Přednášky o proteinázách Ing. Zdena Kučerová PhD.)

1.2.2.4. Výhody magnetických separačních metod

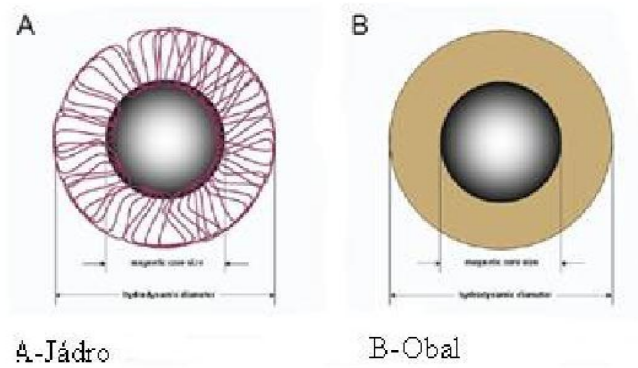
Magnetické separační metody (MSM) mají mnoho výhod oproti ostatním separačním technikám. Postup práce s magnetickými částicemi a mag. separátorem je velice jednoduchý. Nedochází k mnoha manipulačním krokům. Všechny postupy čištění a promývání mohou být prováděny v jediné nádobě. Při této separační technice nejsou potřebné drahé přístroje (např. HPLC, centrifuga). Separační procesy mohou být prováděny přímo ve vzorcích. V některých procesech, jako například při intracelulární izolaci proteinů lze spojit procesy rozkladu a separace a tím zkrátit celkový separační čas. Jednou z hlavních výhod mag. separačních metod je šetrnost k izolovaným proteinům. Tyto metody lze také použít k zakoncentrování zředěných roztoků bílkovin.

MSM se staly základem různých automatizovaných technik, zvláště imunoanalytických systémů pro stanovení různých druhů analytů (mezi nimi proteinů a peptidů), založených na magnetických částicích.[24,26]

1.2.2.5. Magnetické agarosové částice aktivované glyoxalem

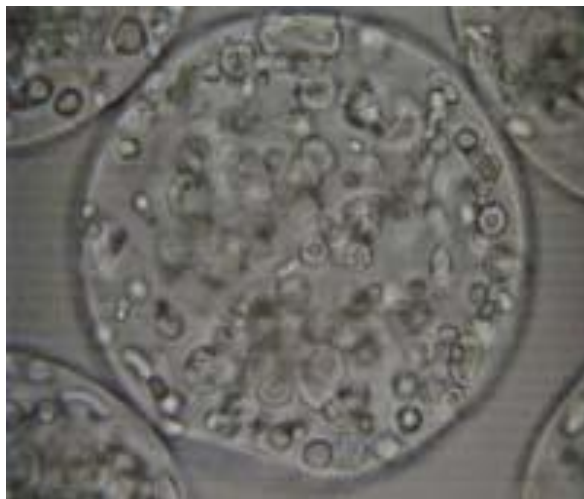
Jádro každé mag. agarosové částice je tvořeno mikrokuličkou (obr. 4) o rozměrech 1-15 μm , tvořené oxidem železnato-železitým (Fe_3O_4 -magnetit), které jsou uchyceny uvnitř mag. agarosové částice (obr. 5). V každé částici je obsaženo asi 5 % magnetitu. Právě z důvodů stavby jádra částice se stává částice magnetickou, což umožňuje snadnou manipulaci pomocí mag. separátoru. Každá mikrokulička, tvořící jádro je obalena 4 % agarosou. Z důvodů větší odolnosti vůči experimentálním podmínkám je agarosa zesíťována epichlorhydrinem.

Agarosa je aktivována glyoxalem, jehož aldehydová skupina tvoří Schiffovu bázi s amino skupinou ligandu. Aby se vytvořila stabilní kovalentní vazba ligandu k částici musí být Schiffova báze redukována kyanoborhydridem sodným, protože samotná Schiffova báze je značně nestabilní (obr. 6).[26]



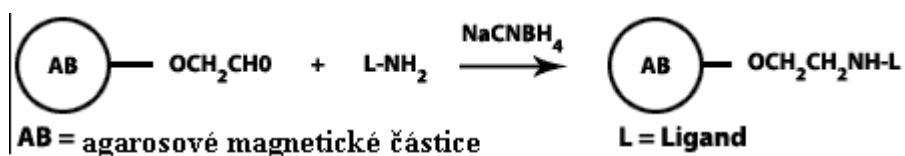
Obr. 4 Magnetické částice

(převzato z : <http://www.bioscience-beads.com/stdspec.htm>; cit. 5.4.2010)



Obr. 5 Magnetitové mikrokuličky v 4 % agarosové částici (zvětšení 400-krát)

(převzato z : <http://www.bioscience-beads.com/stdspec.htm>; cit. 5.4.2010)



Obr. 6 Imobilizace ligandu na mag. částici a redukce Schiffovy báze kyanoborhydridem sodným
(převzato z : <http://www.bioscience-beads.com/stdspec.htm>; cit. 5.4.2010)

1.2.2.6. Magnetické separátory

Magnetické separátory jsou jednoduché přístroje sloužící k oddělení magnetických částic ze systému. Nejjednodušším separátorem je obyčejný magnet. Laboratorní separátory, které jsou komerčně dostupné, obsahují magnet pevně uchycený k nemagnetickému materiálu.

Jsou to tzv. magnetická pera (obr. 7), která se používají pro mikrozkušavky typu eppendorf, zkumavky nebo kyvety. Finančně nákladnější skupinou jsou průtokové magnetické separátory, které jsou vhodné pro separaci ve viskóznějších vzorcích. Příkladem průtokového magnetického separátoru je gradientový magnetický separátor (HGMS). [27]



Obr. 7 Magnetické pero [24]

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Chemikálie

Hemoglobin z hovězí krve (Sigma, USA)

Dihydrát chloridu vápenatého čistota 99,5 % (Sigma-Aldrich, ČR)

Glycin p.a. čistota 99,0 % (Ing. Petr Lukeš, ČR)

Močovina čistota 99,5 % (Lachema, ČR)

Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného p.a. čistota 99,0 % (Ing. Petr Lukeš, ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (Lachema, ČR)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného p.a. čistota 97,5 %
(Ing. Petr Lukeš, ČR)

Thiomerosal (Sigma, USA)

Hydroxid sodný p.a. čistota 98,0 % (Ing. Petr Lukeš, ČR)

Octan sodný p.a. čistota 99,0 % (Ing. Petr Lukeš, ČR)

Kyselina octová čistota 99,0 % (Lachner, ČR)

BCA protein assay reagent A (Pierce, USA)

Pentahydrát síranu měďnatého p.a. (Lachema, ČR)

Endoproteinase Glu-C ze Staphylococcus Aureus V8 (Roche, Německo)

Hydrogenuhlíčan sodný p.a. čistota 99,5 % (Lachema, ČR)

Kyanoborhydrid sodný (Aldrich, USA)

Magnetické agarosové kuličky ve 4 % glyoxalu (BioScience Bead Division of CSS.
Inc., USA)

Kyselina trichloroctová (Ing. Petr Lukeš, ČR)

Kyselina chlorovodíková p.a. 37 % (Ing. Petr Lukeš, ČR)

Tris-(hydroxymethyl)-amoninometan p.a. (Ing. Petr Lukeš, ČR)

2.2. Přístroje

Analytické váhy AB104 (Meter Toledo, Švýcarsko)

pH metr 3305 (Jenway, Velká Británie)

termostat TB06 (Labio, ČR)

BioPhotometer (Eppendorf, Německo)

Magnetické pero PickPen 1-M (Bio-Nobile, Finsko)

Magnetická míchačka HI 190M (Hanna instruments, USA)

Třepačka Bio RS-24 (Biosan Laboratories, USA)

Eppendorf Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Německo)

třepačka MS1 Minishaker (IKA, Německo)

mikrodestičkový fotometr Multiskan MS MCC/340 (Labsystems, Finsko)

2.3. Pracovní postupy

2.3.1. Imobilizace proteasy V8 na magnetických částicích

Postup imobilizace enzymu na magnetických agarosových kuličkách doporučený výrobcem (BioScience Bead Division of CSS. Inc., USA) byl modifikován Katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

500 μl magnetických částic bylo promyto 3-krát 2 ml 0,1 M NaHCO_3 . Tyto částice byly spolu s 2 ml 0,1 M NaHCO_3 napipetovány do lékovky a byly usazeny u dna pomocí magnetu. Přebytečný roztok byl odpipetován. Do lékovky bylo přidáno 6 mg proteasy V8 rozpuštěné ve 2 ml 0,1 M NaHCO_3 . Ihned bylo odebráno 50 μl roztoku, u kterého byla změřena po naředění (50 μl roztoku + 200 μl 0,1 M NaHCO_3) absorbance při 280 nm. Směs roztoku proteasy V8 a magnetických částic byla třepána 24 hod.

Po třepání bylo odpipetováno 50 μl roztoku, u kterého byla změřena po naředění (50 μl roztoku + 200 μl 0,1 M NaHCO_3) absorbance při 280 nm. Pomocí magnetu byly částice usazeny u dna a byl odebrán přebytečný roztok. Nezreagované aldehydové skupiny byly blokovány přidáním 20 mg glycinu rozpuštěném v 2 ml 0,1 M NaHCO_3 . Tato směs byla třepána 60 minut při laboratorní teplotě. Částice byly 2-krát promyty 2 ml 0,1 M NaHCO_3 .

Ke kuličkám bylo přidáno 20 mg kyanoborhydridu sodného rozpuštěného v 2 ml 0,1 M NaHCO_3 a směs byla 30 min třepána, aby byla zredukována nestabilní Schiffova báze.

Částice byly 2-krát promyty 2 ml 0,1 M NaHCO_3 a jednou 2 ml 0,1 M acetátového pufru pH=4 a byly uloženy v lednici v pufru Tris-HCl o pH=7,2 s přísávkem Ca^{2+} . [17]

2.3.2. Analytické metody

2.3.2.1. Stanovení koncentrace navázaného proteinu

Vzhledem k malým absorpčním změnám roztoku před imobilizací a po imobilizaci vznikající malým množstvím imobilizovaného enzymu, bylo vyjadřováno množství navázané proteasy V8 v podobě katalytické aktivity, jako absorbance peptidů substrátu, vznikajících štěpením proteasou V8.

2.3.2.2. Stanovení enzymové aktivity imobilizovaného enzymu metodou Anson –Mirsky [28]

Do mikrozkušavek typu Eppendorf bylo pipetováno v dubletu 250 μ l hemoglobinového substrátu (HbS) * a eppendorfy byly vloženy do inkubační lázně na 10 min při 37 °C.

Do jednotlivých mikrozkušavek bylo přidáno 100 μ l magnetických částic s navázanou proteasou V8 (které byly předem promyty 3-krát 0,1 M acetátovým puftrem, pH=4.

Po 10 minutách byly pomocí mag. separátoru odebrány magnetické částice a roztok byl sražen 500 μ l 0,3 M TCA. Eppendorfy byly centrifugovány při 12 rpm 12 min. Poté bylo do mikrotitrační destičky pipetováno 20 μ l supernatantu a byla stanovena aktivita imobilizovaného enzymu BCA metodou.

*Příprava HbS:

Do 100 ml kádinky bylo naváženo 2,2 g hemoglobinu, který byl dokonale rozpuštěn v 50 ml destilované vody. Do roztoku bylo přidáno 36 g močoviny a 8 ml 1 M NaOH. Po rozpuštění byl roztok přelit do 100 ml odměrné baňky a byl doplněn dest. vodou po rysku. Tento roztok byl ponechán při 25 °C 50 minut, aby zdenaturoval všechny Hb. K roztoku bylo přidáno 10 ml 1M roztoku kyselého fosforečnanu draselného a 4 g močoviny. U roztoku bylo proměřeno pH, které by mělo odpovídat hodnotě 7,5. Na 100 ml substrátu bylo přidáno 2 mg mertiolátu (thiomerosal), jako konzervačního činidla a roztok byl uložen v lednici.

2.3.2.3. Stanovení aktivity enzymu BCA metodou

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 20 μ l vzorku a bylo přidáno 200 μ l směsi A + B v poměru 49:1.

A...BCA protein assay reagent A (Pierce, USA)

B...4 % CuSO_4

Mikrotitrační destička byla třepána 5 min a poté při laboratorní teplotě byla inkubována 75 min. Po inkubaci byla změřena absorbance při 540 nm na přístroji ElisaReader.

2.3.2.4. Stanovení volné proteasy V8 spektrofotometricky

Na analytických vahách byl odvážen 1 mg proteasy V8 a byl rozpuštěn v 1 ml pufru 0,1 M acetátového pufru, pH=4. Do 7 mikrozkušavek bylo pipetováno 0,5 ml 0,1 M acetátového pufru, pH=4. 0,5 ml rozpuštěné proteasy V8 bylo pipetováno do první mikrozkušavky a roztok byl promíchán. Z této zkumavky bylo odebráno opět 0,5 ml a přidáno do další mikrozkušavky s 0,5 ml pufru. Takto byla připravena koncentrační řada (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031; 0,016 a 0,008 mg/ml).

Na přístroji BioPhotometer byly proměřeny absorbance při 280 nm a jako slepý vzorek byl použit 0,1 M acetátový pufr o pH=4.

2.3.2.5. Stanovení aktivity volného enzymu V8 pomocí metody

Anson-Mirsky[28]

Do mikrozkušavek bylo napipetováno 250 μ l HbS a mikrozkušavky byly inkubovány 10 min. Do mikrozkušavek bylo přidáno 50 μ l vzorku enzymu proteasy V8 o koncentracích (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031; 0,016 a 0,008 mg/ml).

Po 10 min. byla reakce zastavena přidáním 500 μ l 0,3 M TCA. Po dalších 5 minutách byly mikrozkušavky vytaženy z lázně a byly centrifugovány při 12 rpm 12 min. Poté bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 20 μ l supernatantu a bylo přidáno 200 μ l směsi BCA (A+B v poměru 49:1).

Mikrotitrační destička byla třepána 5 min a poté při laboratorní teplotě byla inkubována 75 min. Po inkubaci byla změřena absorbance při 540 nm v mikrodestičkovém fotometru Multiskan.

2.3.3. Optimalizace podmínek pro štěpení imobilizovanou proteasou V8

2.3.3.1. Vliv pH

Pomocí pufrů:

0,1 M acetátový pufr o pH= 3,5; 3,8; 4,0; 4,1; 4,4; 4,6; 4,7; 5,0

0,1 M fosforečnanový pufr o pH= 5,6; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 7,8; 8,0

0,1 M Tris-HCl pufr o pH= 8,1; 8,4

byly připraveny reakční pH : 5,48; 5,51; 5,60; 5,67; 5,72; 5,99; 6,12; 6,49; 6,72; 6,85; 7,00; 7,26; 7,49; 7,58; 7,63; 7,87; 8,1 a byly proměřeny aktivity imobilizované proteasy V8 metodou Anson-Mirsky. Bylo použito 100 μ l magnetických částic s 250 μ l pufru na 250 μ l HbS a částice byly vždy promyty třikrát pufrům o příslušném pH.

2.3.3.2. Vliv teploty

Byly proměřeny aktivity proteasy V8 vazané na mag. částicích pro teploty 5°C, 25°C, 37°C a 50°C. Bylo použito 100 μ l mag. částic s 250 μ l 0,1 M acetátového pufru o pH=4 (pH-optimum viz výsledky) na 250 μ l HbS. Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky.

2.3.3.3. Stabilita

Stabilita imobilizované proteasy V8 byla určena ze změřené aktivity proteasy V8 ihned po imobilizaci a po 23 měřeních, které byly proměřovány v rozsahu tří měsíců.

2.3.3.4. Časová závislost

Byla proměřena aktivita proteasy V8 vázané na mag. částicích v závislosti na reakční době. Reakční doba byla nastavena v rozmezí : 5; 10; 30; 60; 120 min. Bylo použito 100 μ l mag. částic s 250 μ l 0,1 M acetátového pufru o pH=4 (pH-optimium viz výsledky) na 250 μ l HbS. Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky

2.3.3.5. Opakovatelnost

Pro určení experimentální opakovatelnosti byla provedena nezávislá měření aktivit za stejných optimálních podmínek 6-krát za sebou v časovém intervalu 6 hodin.

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. Imobilizace proteasy V8 na magnetické nosiče

Imobilizace proteasy V8 byla prováděna na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Proteasa V8 byla imobilizována na magnetické nosiče (Magnetic Glyoxal 4% Agarose beads). Volné aminoskupiny enzymu byly vázány k aktivnímu ligandu –CHO, obsaženému na magnetických nosičích vazbou.

K získání stabilní vazby dochází po redukci cyanoborohydridem. Množství navázaného enzymu na magnetické nosiče bylo 6 mg, specifická aktivita byla měřena metodou Ansona-Mirského pomocí hemoglobinového substrátu.

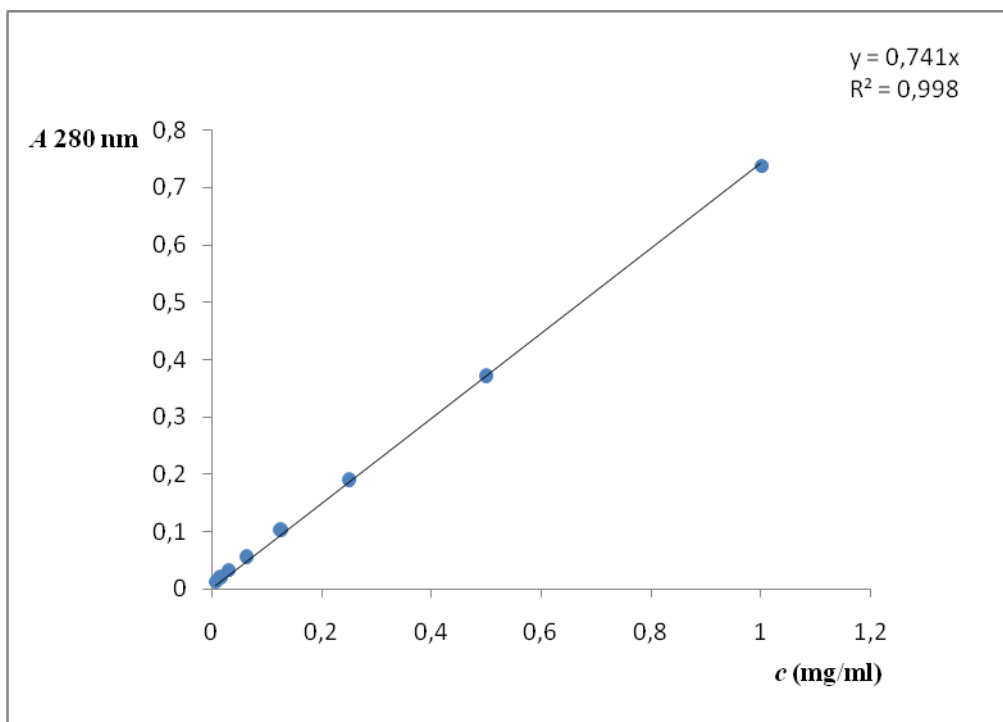
3.2. Stanovení proteasy V8

Množství enzymu můžeme vyjadřovat jako koncentraci samotného proteinu nebo jako hodnotu enzymové aktivity.

3.2.1. Volná proteasa V8

3.2.1.1. Stanovení volné proteasy V8 spektrofotometricky (množství proteinu)

Pro roztoky o koncentracích (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031; 0,016 a 0,008 mg/ml) proteasy V8 byly na spektrofotometru proměřeny absorbance při vlnové délce 280 nm. Z výsledných hodnot byla sestavena kalibrační křivka (obr. 8). Z obr. 8 vyplývá, že závislost absorbance na koncentraci proteasy V8 je lineární v rozsahu 0,008 až 1 mg/ml.



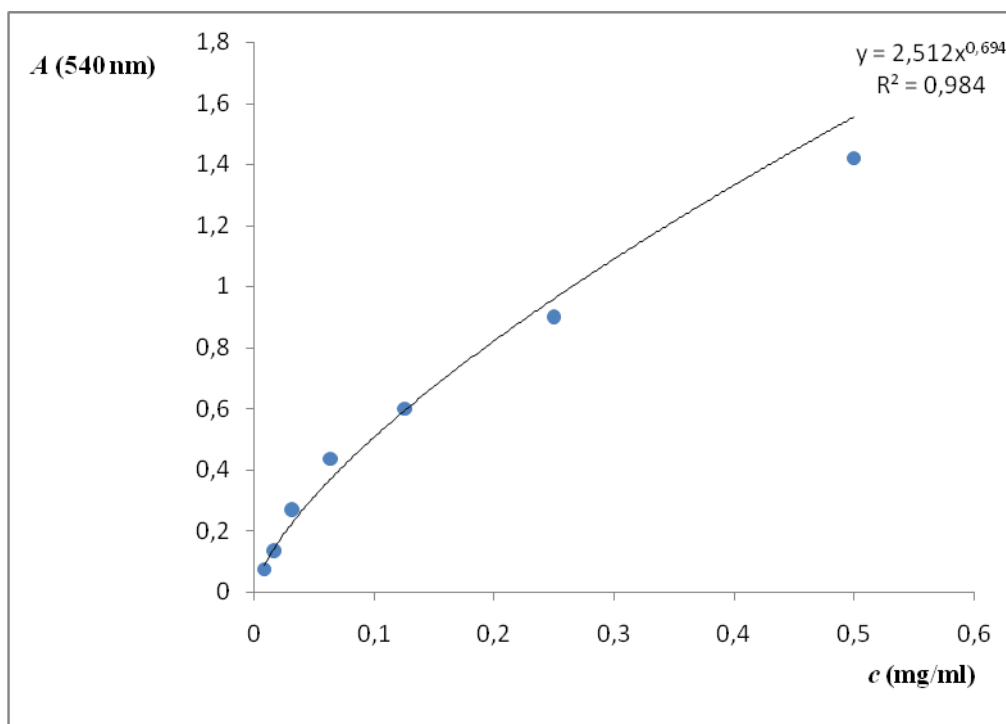
Obr.8 Graf závislosti absorbance na koncentraci proteasy V8 (volné)

Reakční podmínky: teplota 37 °C

0,1 M acetátový pufr, pH=4

3.2.1.2. Stanovení volného enzymu metodou Anson-Mirsky (aktivita)

Pomocí metody Anson-Mirsky byla stanovena aktivita volného enzymu V8 při optimálních reakčních podmínkách (teplota 37 °C, 0,1 M acetátový pufr o pH=4, čas 10 min, substrát HbS). Z výsledných hodnot byla sestavena kalibrační křivka (obr. 9).

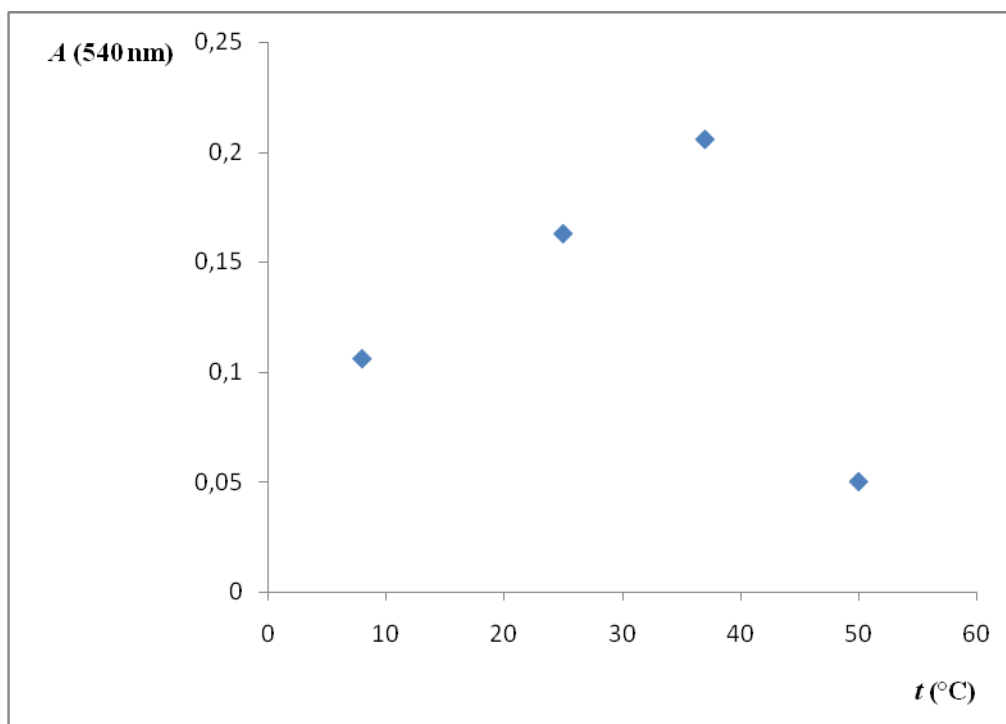


Obr. 9 Graf závislosti absorpce peptidů substrátu vzniklých štěpením proteasou V8 (volné) na koncentraci proteasy V8

Reakční podmínky: teplota 37 °C
 0,1 M acetátový pufr, pH=4 (výsledné pH=5,6)
 čas 10 min
 substrát HbS

3.2.1.3. Vliv teploty na aktivitu volné proteasy V8

Bylo nutné určit optimální teplotu pro štěpení. Po přidání volného enzymu byla směs inkubována 10 minut při teplotě 8 °C, laboratorní teplotě 25 °C, standardní teplotě 37 °C a při teplotě 50 °C. Bylo zjištěno, že optimální aktivita proteasy V8 je při teplotě 37 °C (obr. 10). Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky.



Obr. 10 Graf závislosti absorbance peptidů substrátu vzniklých štěpením proteasou V8 (volné) na teplotě

Reakční podmínky: 0,1 M acetátový pufr, pH=4 (výsledné pH=5,6)

čas 10 min

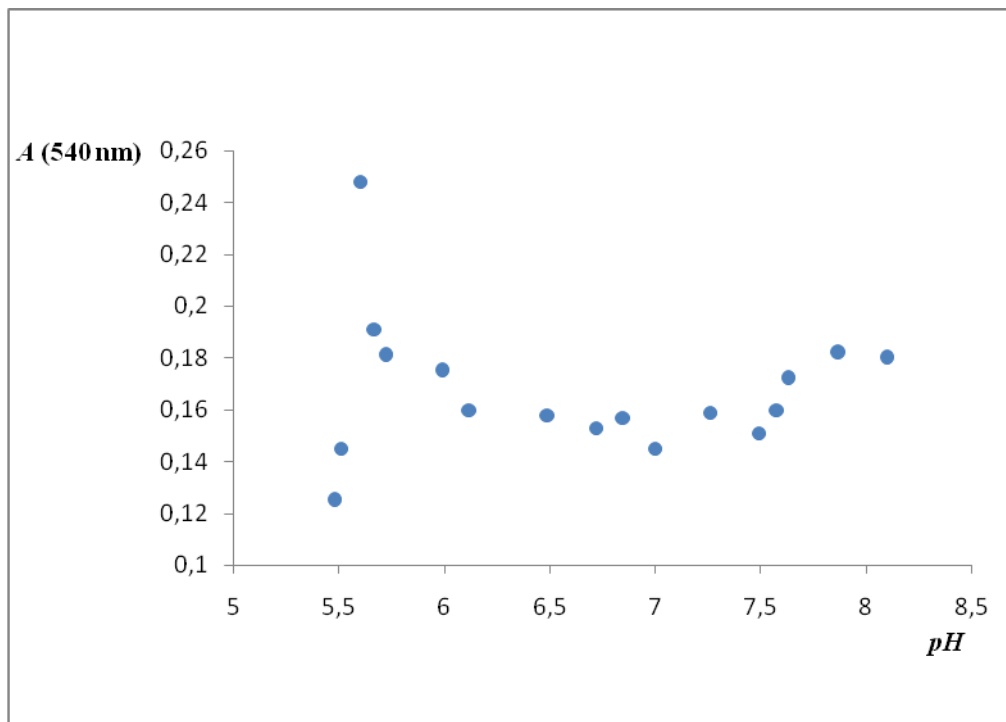
substrát HbS

3.2.2. Stanovení vázaného enzymu-optimalizace podmínek štěpení

Pro stanovení enzymové aktivity vázané proteasy V8 byla použita metoda podle Ansona-Mirského[28] s hemoglobinovým substrátem. Byla změřena závislost enzymové aktivity na pH, teplotě, reakční době a byly zvoleny nejvhodnější podmínky štěpení.

3.2.2.1. Vliv pH

Bylo zjišťováno, jaký vliv má pH na aktivitu imobilizované proteasy V8 v rozmezí hodnot 5,5-8,1, dále bylo zjišťováno optimální pH pro katalýzu imobilizovanou proteasu V8. Bylo nalezeno pH optimum pohybující se kolem hodnoty 5,6 (obr. 11). Tyto hodnoty odpovídají pH optimu volné proteasy V8 [1]. Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky.

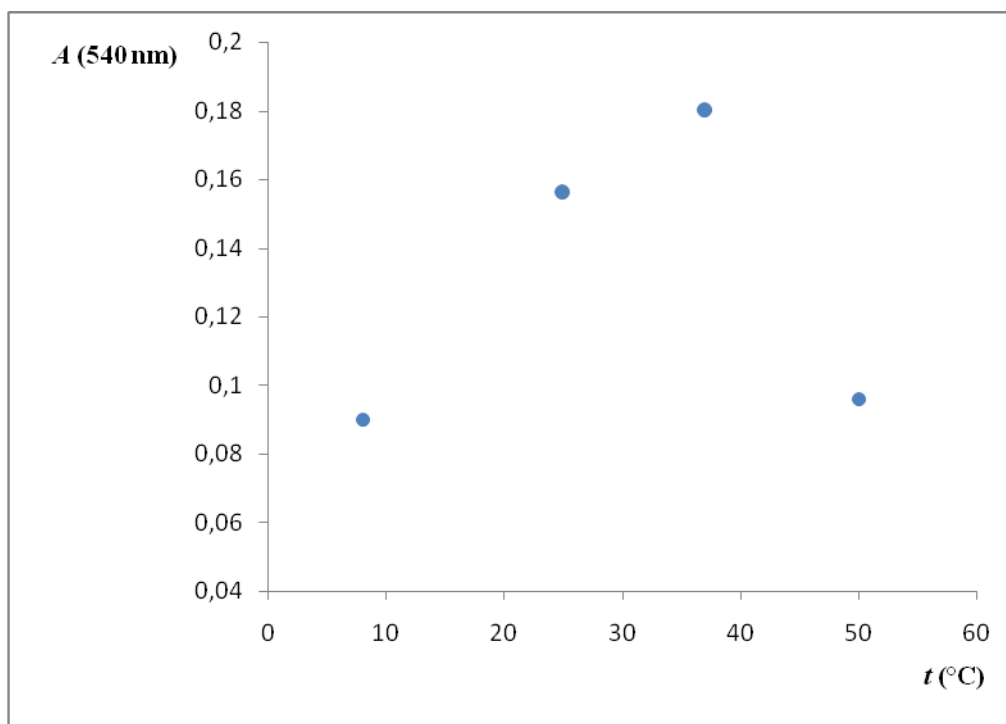


Obr. 11 Graf závislosti absorbance peptidů substrátu vzniklých štěpením proteasou V8 (vázané na mag. částicích) na pH

Reakční podmínky: teplota 37 °C
čas 10 min
substrát HbS

3.2.2.2. Vliv teploty

Bylo zjišťováno, jaký vliv má změna teploty na aktivitu imobilizované proteasy V8. Po přidání imobilizovaného enzymu byla reakční směs inkubována 10 minut při teplotě 8 °C, laboratorní teplotě 25 °C, standardní teplotě 37 °C a teplotě 50 °C. Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky. Maximální aktivita byla zjištěna při teplotě 37 °C (obr. 12).



Obr. 12 Graf závislosti absorbance peptidů substrátu vzniklých štěpením proteasou V8 (vázané na mag. částicích) na teplotě

Reakční podmínky: 0,1 M acetátový pufr, pH=4 (výsledné pH=5,6)

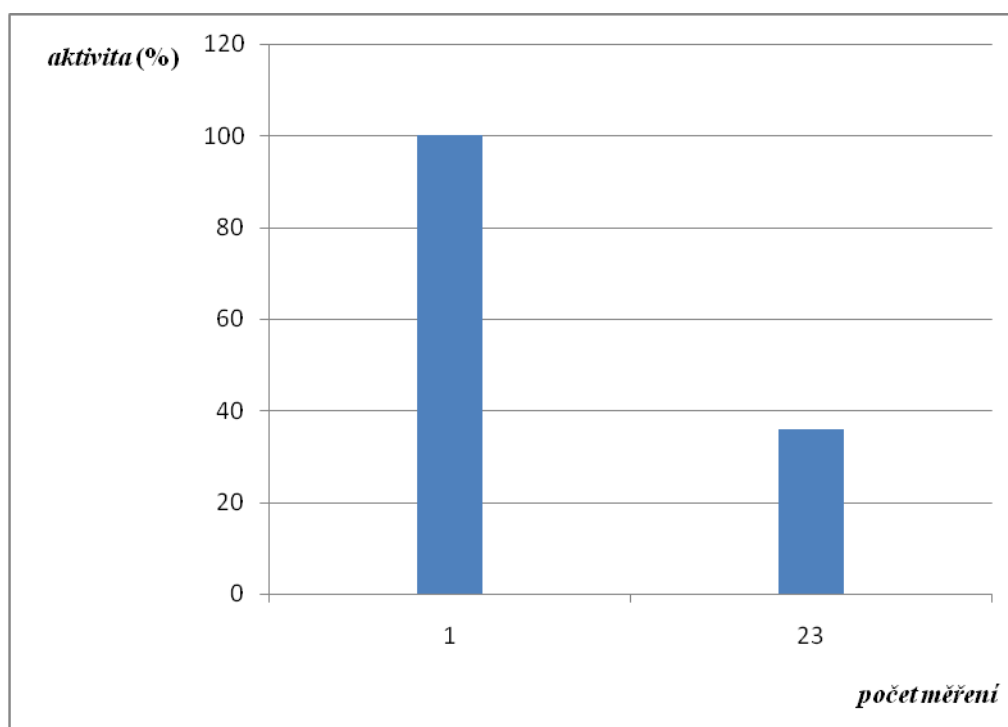
čas 10 min

substrát HbS

3.2.2.3. Stabilita

Možnost opakovaného použití proteasy vázané na magnetických nosičích je důležitým faktorem pro aplikaci těchto imobilizovaných enzymů v proteomice při štěpení proteinů. Stanovení enzymové aktivity bylo dále použito ke sledování změn aktivity při dlouhodobém, opakovaném použití imobilizovaného enzymu při štěpení.

Stabilita proteasy V8 vázané na magnetických nosičích byla sledována v časovém rozmezí 3 měsíců a celkovém počtu měření 23. Bylo zjištěno, že asi po 23 měřeních dochází k výraznému snížení aktivity imobilizovaného enzymu o 35,9 % (obr. 13). Aktivita proteasy V8 imobilizované na magnetických nosičích výrazně neklesla po 15 opakováních (o 13 %). Vázaná proteasa V8 si udržuje svoji aktivitu po dobu tří měsíců skladována při 4 °C. Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky.



Obr. 13 Graf závislosti aktivity proteasy V8 (vázané na mag. částicích) na počtu provedených měření

Reakční podmínky: 0,1 M acetátový pufr, pH=4 (výsledné pH=5,6)

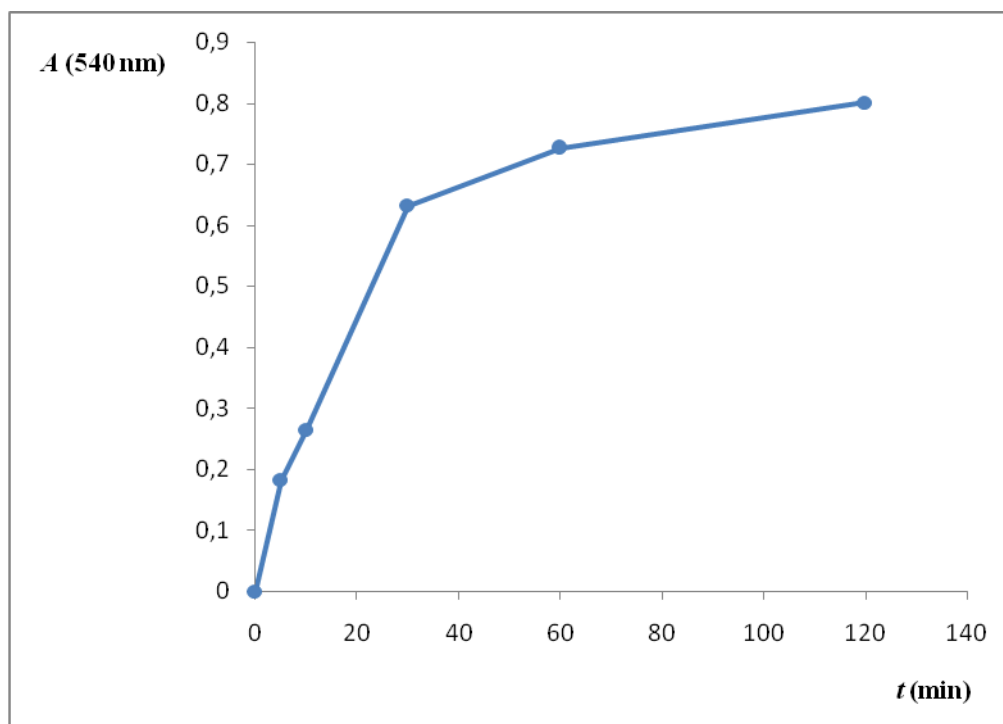
čas 10 min

substrát HbS

teplota 37 °C

3.2.2.4. Časová zavislost

Bylo zjišťováno, jak se mění aktivita imobilizované proteasy V8 vázané na mag. částicích při různých reakčních časech. Bylo zjištěno, že se zvyšující se dobou reakce se zvyšuje aktivita enzymu do určité hodnoty strmě. Poté dochází k ustálení aktivity z důvodů nasycení enzymu substrátem (obr. 14). Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky.



Obr. 14 Graf závislosti absorbance peptidů substrátu vzniklých štěpením proteasou V8 (vázané na mag. částicích) na čase

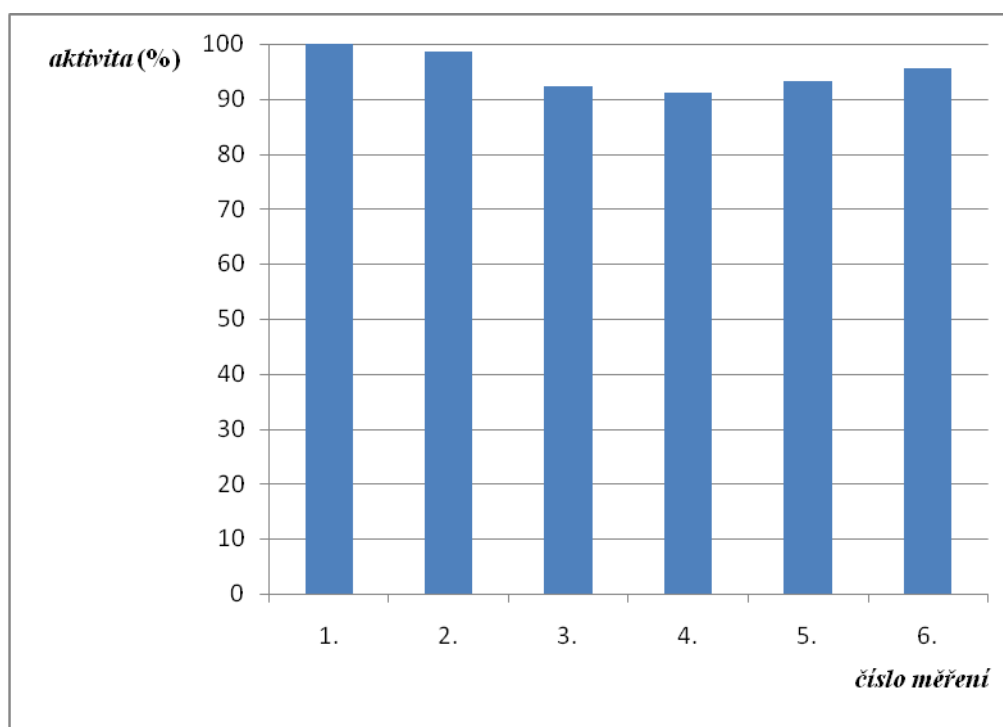
Reakční podmínky: 0,1 M acetátový pufr, pH=4 (výsledné pH=5,6)

substrát HbS

teplota 37 °C

3.2.3. Opakovatelnost

Byla zjišťována míra opakovatelnosti měření s imobilizovanou proteasou V8 na magnetických nosičích. Za optimálních podmínek byla měřena aktivita vázaného enzymu 6-krát ihned po sobě v časovém intervalu 6 hod. K vyhodnocení opakovatelnosti bylo použito 6 nezávislých měření. Výsledky statistického vyhodnocení jsou uvedeny na obr. 16. Z vypočtených relativních směrodatných odchylek je zřejmé, že metoda je poměrně přesná. Intervaly spolehlivosti byly vyjádřeny s pravděpodobností $95\% \pm 3,56\%$. Použití imobilizované formy vedlo ke zvýšení reprodukovatelnosti výsledků. Relativní směrodatná odchylka nepřesahuje $3,7\%$. Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky.



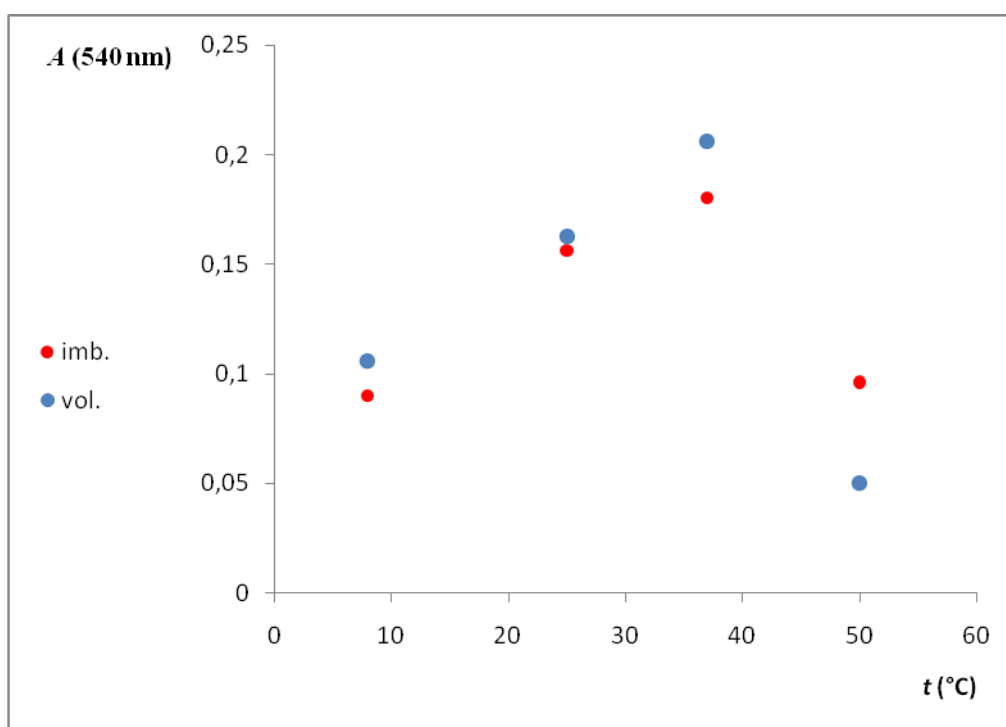
Obr. 16 Graf závislosti aktivity proteasy V8 (vázané na mag. částicích) na pořadí provedení měření v časovém úseku 6 hod

Reakční podmínky: 0,1 M acetátového pufru, pH=4 (výsledné pH=5,6)
čas 10 min
substrát HbS
teplota 37 °C

3.3. Porovnání volné a vázané proteasy V8 v závislosti na teplotě

Byly porovnány hodnoty aktivit volné proteasy V8 a vázané na mag. částicích v závislosti na teplotě (obr. 17). Pro obě měření byly nastaveny stejné reakční podmínky. Aktivita byla stanovena metodou Anson-Mirsky.

Z obr. 17 vyplývá, že u imobilizované proteasy V8 je aktivita při teplotách 5, 25 a 37 °C nižší než u volné. Při teplotě 50 °C je aktivita imobilizované proteasy V8 vyšší, enzym vázaný na magnetických nosičích má vyšší termostabilitu. Pro volný i vázaný enzym je optimální teplota 37 °C.



Obr. 17 Graf závislosti absorbance peptidů substrátu vzniklých štěpením proteasou V8 (vázané na mag. částicích) na teplotě pro imobilizovanou a volnou proteasu V8

Reakční podmínky: 0,1 M acetátový pufr, pH=4 (výsledné pH=5,6)
čas 10 min
substrát HbS

4. ZÁVĚR

Byla imobilizována proteasa V8 na magnetických agarosových částicích. Tím byl připraven vhodný proteolytický enzym pro tvorbu peptidových map pepsinu A.

Pro proteasu V8 imobilizovanou na agarosových magnetických částicích byly studovány optimální reakční podmínky. Optimální podmínky pro katalytické reakce s imobilizovanou proteasou jsou pH=5,6, 0,1 M acetátový pufr, reakční teplota 37 °C a reakční doba 10 minut.

Bylo zjištěno, že imobilizovaný enzym je stabilní po dobu tří měsíců (bylo provedeno 23 měření). Bylo experimentálně dokázáno, že katalytické reakce s imobilizovanou proteasou V8 na magnetických částicích lze provádět do dvaceti měření, potom aktivita enzymu strmě klesá.

Dále bylo dokázáno, že se aktivita imobilizovaného enzymu skoro nemění při šesti po sobě následujících stanoveních v časovém intervalu šesti hodin. Průměrná aktivita při šesti po sobě následujících měřeních byla stanovena na hodnotu $95 \% \pm 3,6 \%$.

Experimentálně byl porovnán vliv teploty na katalytické reakce volné a imobilizované proteasy V8. Bylo zjištěno, že aktivita imobilizované proteasy je při 50 °C vyšší než volné. Při teplotách 8; 25; 37 °C mají aktivity volného a imobilizovaného enzymu podobné hodnoty.

Veškeré získané experimentální hodnoty budou sloužit jako podklad pro další práci zaměřenou na tvorbu peptidových map a analýzu lidského pepsinu A, který lze využít k diagnostice onemocnění žaludku.

5. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Hunter, T.: *Cell* **83**, 1-4 (1995).
- [2] Krebs, E.: *Trends Biochem. Sci.* **19**, 439 (1994).
- [3] Sun, H.; Tonks, N.: *Trends Biochem. Sci.* **19**, 480-485 (2004)
- [4] Hubbard, M.; Cohen, P.: *Trends Biochem. Sci.* **18**, 172-177 (2003).
- [5] Annan, R.; Huddeleston, M.; Verma, R.; Deshaies, R.; Carr, S.: *Anal. Chem.* **73**, 393-404 (2001).
- [6] Ficarro, S.; McClelland, M.; Stukenberg, P.; Burke, D.; Ross, M.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.; White, E.: *Nat. Biotechnol.* **20**, 301-305 (2002).
- [7] Šustrová, B.; Novotná, L.; Kučerová, Z.; Tichá, M.: *J. Mol. Catal. B:Enzymatic* **60**, 22-28 (2009)
- [8] Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Základy buněčné biologie*, Espero Publishing, Ústí nad Labem (1998)
- [9] Voet, D.; Voetová, J.G.: *Biochemie*, Victoria publishing a.s., Praha (1995)
- [10] Branden, C.; Tooze, J.: *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing (1999)
- [11] Tong Wang; Hongbin Shen; Lixiu Yao; Jie Yang and Kuochen Chou: *PCA for predicting quaternary structure of protein* (Frontiers of Electrical and Electronic Engineering in China), 376-380 (2008)
- [12] Bohager, T.: *Enzymes*, One World Press (2006)
- [13] Webb, E.C.: *Enzyme Nomenclature*, (Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology), Academic Press, New York (1992)
- [14] Todd, A.E.; Orengo, C.A. and Thornton, J.M.: *J. Mol. Biol.* **307**, 1113–1143 (2001).
- [15] Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E.: *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242, (2000).

- [16] Vaňková, H.: *Dizertační práce*, Univerzita Karlova, Praha (2000).
- [17] Štosová, T.; Havliš, J.; Lenobel, R.; Šebela, M.: *Chem. Listy* **99**, 896 (2005).
- [18] Vaňková, H.: *Chem. Listy* **93**, 121 (1999).
- [19] Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorete, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.: *Enzyme Microb. Tech.* **40**, 1451 (2007).
- [20] Turková, J.; Vohník, S.; Helusová, S.; Benes, M.; Tichá, M.: *J. Chromatogr.* **597**, 19 (1992)
- [21] Hong, J.; Xu, D.; Gong, P.; Sun, H.; Li, D.; Yao, S.: *J. Mol. Catal. B:Enzymatic* **45**, 84 (2007).
- [22] Hong, J.; Xu, D.; Gong, P.; Yu, J.; Ma, H.; Yao, S.: *Microporous and Mesoporous Materials* **109**, 470 (2008).
- [23] Rice, K.; Peralta, R.; Bast, D.; Azavedo, J.; McGavin J. M.: *Infect Immun.* **69**, 159–169 (2001).
- [24] Šafařík, I.; Šafaříková, M.: *Biomagn Res Technol.* **2**, 7 (2004)
- [25] Franzreb, M.; Siemann-Herzberg, M.; Hobbey, T. J.; Thomas, O. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 505 (2006)
- [26] Bioscience Bead Division of CSS Inc.: *Magnetic agarose beads*.
Dostupné z URL: <<http://www.bioscience-beads.com/magnetic.htm>>
(cit. 5.4.2010)
- [27] Šafařík, I.; Ptačková, L.; Šafaříková, M.: *Biotechnol Lett* **23**, 1953-1956 (2001).
- [28] Anson, M. L.; Mirsky, A. E.: *J. Gen. Physiol.* **16**, 59 (1932).

PODĚKOVÁNÍ

Poděkovat bych chtěl především paní Ing. Zdence Kučerové, CSc. a prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za poskytnuté informace k experimentální části a odborné rady při psaní bakalářské práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat paní Haně Muselové za pomoc v laboratořích. Hlavně bych chtěl poděkovat celému Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze za poskytnutí odborného pracoviště pro vypracování mé bakalářské práce.