

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Šimon Pospíšil

Příprava proteázových fluorogenních substrátů na pevné fázi

Solid phase preparation of protease fluorogenic substrates

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Jiří Míšek, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze, 2. září 2016

Šimon Pospíšil

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá přípravou proteázových fluorogenních substrátů na pevné fázi a jejich vlastnostmi při proteolytickém štěpení. Metodikou peptidové syntézy na pevné fázi byly připraveny série peptidů na pevné fázi a dále byla testována jejich reaktivita vůči proteázám. Bylo zjištěno, že vhodnou pevnou fází je porézní sklo CPG, na kterém dochází k efektivnímu štěpení substrátů spojenému se vzrůstem fluorescenčního signálu. Dále byla vyvinuta metodika pro dekódování sekvencí z jednotlivých zrn pevné fáze. Tato vyvinutá metodika může být dále použita pro přípravu kombinatoriálních knihoven.

Klíčová slova

peptid, pevná fáze, fluorescence, proteáza, peptidová syntéza na pevné fázi, kombinatoriální knihovna

Abstract

The aim of this work was the solid phase preparation of protease fluorogenic substrates and their reactivity by proteolytic cleavage. The peptides were prepared by Solid-phase peptide synthesis and then their reactivity with proteases was tested. It was found that the appropriate solid phase is the controlled pore glass (CPG) which leads to efficient cleavage of substrates associated with the increase of fluorescent signal. The methodology for decoding the sequences of single beads of the solid phase has been developed. The developed methodology may be used for preparation of combinatorial libraries.

Key words

peptide, solid phase, fluorescence, protease, Solid-phase peptide synthesis, combinatorial library

Poděkování

Chtěl bych touto cestou poděkovat především svému školiteli Mgr. Jiřímu Míškovi, PhD., který mne vedl po celou dobu mého bakalářského výzkumu. Děkuji mu nejen za odbornou pomoc, ale i za vstřícný přístup a uvedení do světa organické chemie.

Dále chci poděkovat Mgr. Karlu Harantovi z centra Biocev za ochotu a pomoc při analýze vzorků.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za neustálou podporu nejen při tvorbě bakalářské práce, ale i při celém studiu.

Obsah

Seznam použitých zkratk	- 8 -
1 Úvod	- 9 -
1.1 Syntéza peptidů na pevné fázi	- 9 -
1.2 Proteázy	- 12 -
1.3 Fluorogenní substráty pro proteázy	- 13 -
1.4 One Bead One Compound	- 14 -
2 Cíle práce	- 16 -
3 Výsledky a diskuze	- 17 -
3.1 Obecné aspekty	- 17 -
3.1.1 Proteolýza	- 20 -
3.2 Příprava a proteolýza substrátů na TentaGelu	- 20 -
3.2.1 Syntéza peptidu s využitím linkeru	- 21 -
3.2.2 Proteolytické štěpení připravené sekvence	- 21 -
3.2.3 Syntéza peptidu pro testování koncentrace zhášeče	- 22 -
3.2.4 Proteolytické štěpení pro testování koncentrace zhášeče	- 23 -
3.3 Příprava a proteolýza substrátů na porézním skle	- 24 -
3.3.1 Syntéza peptidu na skle LCAA CPG	- 24 -
3.3.2 Proteolytické štěpení na skle LCAA CPG	- 24 -
3.3.3 Syntéza peptidu na skle CPG beads	- 25 -
3.3.4 Proteolytické štěpení na skle CPG beads	- 26 -
3.3.5 Syntéza peptidu s D-tryptofanem	- 27 -
3.3.6 Proteolytické štěpení peptidu s D-tryptofanem	- 28 -
3.3.7 MS analýza vzorků s D-tryptofanem	- 30 -
4 Experimentální část	- 32 -
4.1 Obecné parametry experimentů	- 32 -
4.2 Syntéza Fmoc-L-Lysin(Boc-Ant)-OH	- 33 -
4.3 Peptidová syntéza na pevné fázi	- 34 -
4.3.1 Kaiser-Test	- 34 -

4.4 Proteolytické štěpení enzymy	- 35 -
4.5 MS Analýza	- 35 -
5 Závěr	- 37 -
6 Seznam literatury	- 38 -
7 Přílohy	- 40 -

Seznam použitých zkratek

Fmoc	fluorenylmethyloxykarbonyl
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
tBu	<i>tert</i> -butyl
BOP	(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorofosfát
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
DIEA	diisopropylethylamin
TIS	triisopropylsilan
TFA	kyselina trifluoroctová
DCM	dichlormethan
PBS	phosphate buffered saline

1 Úvod

1.1 Syntéza peptidů na pevné fázi

Peptidy hrají významnou roli v mnoha oblastech výzkumu, kromě chemie jako takové především v medicíně či farmacii. Snahy a první pokusy o syntézu peptidů proto pocházejí již ze začátku dvacátého století. Již v roce 1903 provedl Emil Fischer úspěšný coupling dvou aminokyselin za vzniku amidu, tedy prvního peptidu. Vzhledem k neexistenci chránících skupin však nebylo možné provést syntézu delšího peptidu.^{1,2}

Revolucí v peptidové syntéze bylo publikování metodiky peptidové syntézy na pevné fázi (angl. *Solid-phase peptide synthesis*, SPPS) R. B. Merrifieldem roku 1963. Při této metodě jsou peptidové sekvence syntetizovány na pevné fázi, která slouží jako nosné médium. Pevná fáze obsahuje na svém povrchu volné aminové skupiny, které jsou přístupny pro coupling karboxylové funkce první aminokyseliny v peptidové sekvenci. Typickými pevnými fázemi pro peptidovou syntézu jsou polymerní materiály ve formě zrn o rozměrech desítek mikrometrů s navázanými funkčními skupinami na povrchu polymerního jádra, neboli resiny (angl. *Resins*). Při couplingu na pevné fázi tedy dochází vždy k reakci karboxylové skupiny volné aminokyseliny a terminální aminové skupiny peptidové sekvence (v případě první aminokyseliny samotné pevné fáze). Coupling je poté následován odchráněním chránících skupin a celý cyklus se opakuje (Schéma 1.).³

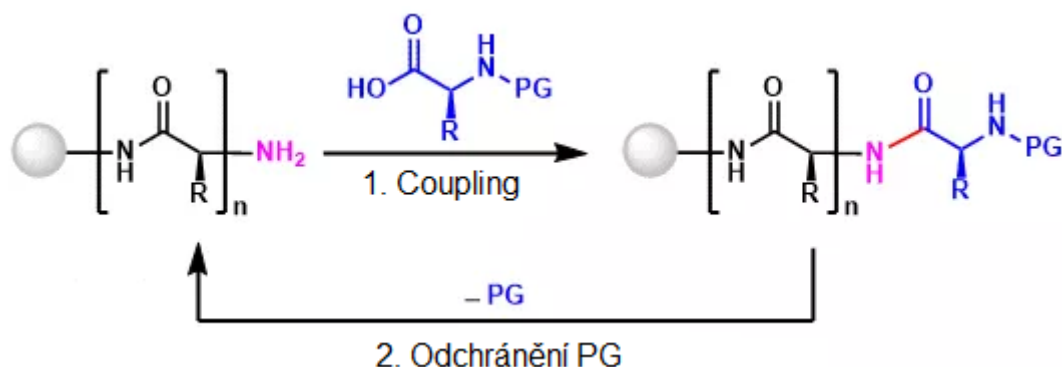


Schéma 1. Schématický průběh cyklu peptidové syntézy na pevné fázi. Prvním reakčním krokem je coupling aminokyseliny s chránicí skupinou (PG, angl. *Protecting group*) navázanou na α -aminové skupině. Druhým krokem je poté odchránění této chránicí skupiny za uvolnění terminální aminové skupiny.⁴

Při syntéze tedy dochází ke střídání dvou reakčních kroků, zaprvé couplingu ochráněné aminokyseliny a následně k odchránění chránicí skupiny.⁵

Úspěšné couplings jsou podmíněny použitím chránících skupin na aminové skupiny, a případně na postranní řetězce aminokyselin. Toto ochránění zabraňuje případným intramolekulárním a intermolekulárním reakcím mezi molekulami aminokyselin, a ochráněná aminokyselina tak může reagovat jen svou karboxylovou skupinou. Pro ochránění α -aminových skupin existují dvě možné chránící skupiny – Fmoc (fluorenylmethoxykarbonyl) a Boc (*tert*-butyloxykarbonyl) (Schéma 2.).^{3,6}

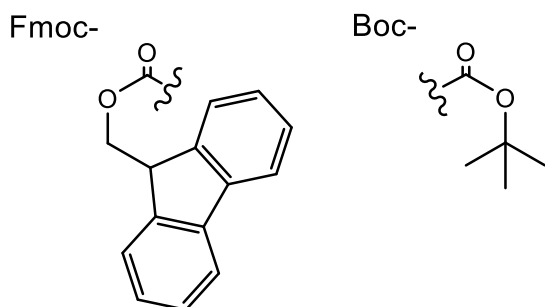


Schéma 2. Chránící skupiny Fmoc a Boc

Dle použité chránící skupiny pro α -aminovou skupinu, tedy Fmoc nebo Boc, existují dvě možnosti peptidové syntézy na pevné fázi, a to Fmoc syntéza (Fmoc SPPS) a Boc syntéza (Boc SPPS). Při konkrétní syntéze jsou tedy couplings prováděny pouze s Fmoc-aminokyselinami, nebo s Boc-aminokyselinami. Obecně je běžnější a preferovanější metodou Fmoc syntéza. Pro ochránění reaktivních skupin na postranních řetězcích některých aminokyselin se při Fmoc syntéze využívají ortogonální chránící skupiny Boc, Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl), tBu (*tert*-butyl), OtBu (*tert*-butyloxy) či Trt (trityl) (Schéma 3.).⁷ Tyto chránící skupiny jsou na závěr peptidové syntézy z peptidů odstraněny.

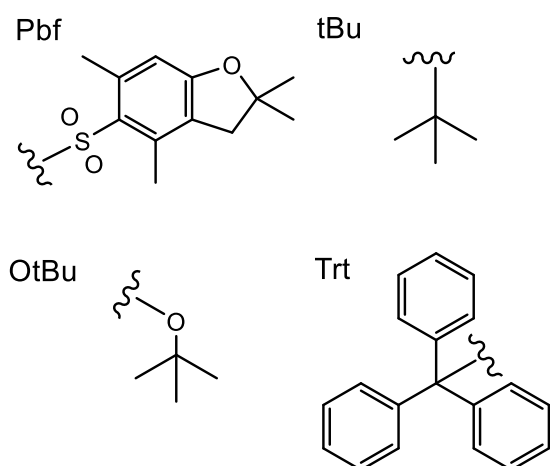


Schéma 3. Chránící skupiny Pbf, tBu, OtBu a Trt

Pro potvrzení účinnosti couplingu nové aminokyseliny na peptidovou sekvenci na pevné fázi se využívá tzv. Kaiser-test, neboli ninhydrinový test. Jedná se o reakci volných aminových skupin ninhydrinem, jež poskytuje s volnými NH_2 -skupinami sytě

modré zabarvení (Schéma 4.). Negativní výsledek Kaiser-testu tedy slouží jako důkaz nepřítomnosti aminových skupin peptidové sekvence.^{8,9}

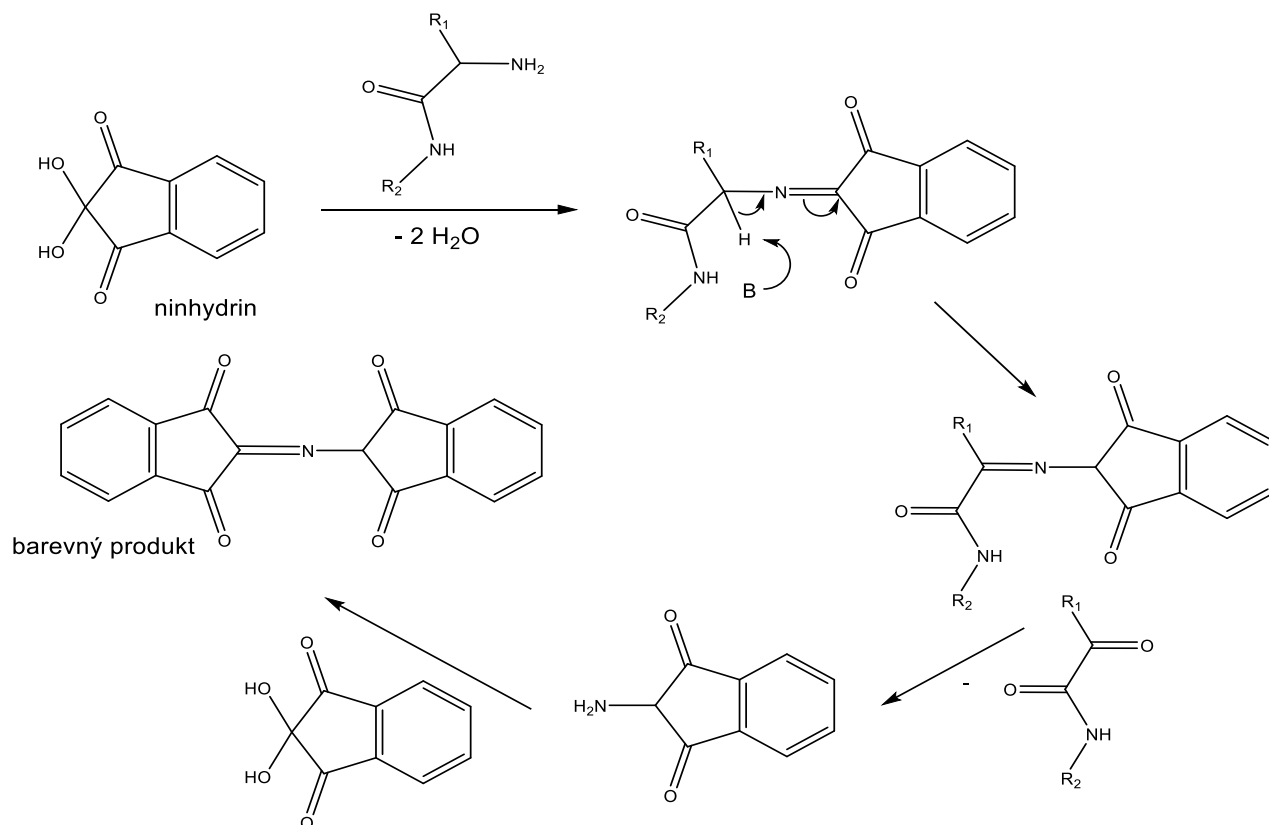


Schéma 4. Mechanismus ninhydrinového testu

Po dokončení peptidové syntézy může být peptidová sekvence odštěpena z pevné fáze, a uvolněna tak do roztoku. Metodika uvolnění peptidu závisí na struktuře použité pevné fáze, respektive na struktuře linkeru s navázanou funkční skupinou. Původními pevnými fázemi zavedenými Merrifieldem byly kopolymery styrenu a divinylbenzenu s navázanými chlormethylovými linkery. Později byly vytvořeny resiny na bázi polystyrenu s navázanými aromatickými spojkami obsahujícími hydroxylové funkční skupiny (*Wang resin*, *Ring Acid resin*). Pro tyto klasické hydrofobní resiny je metodikou pro uvolnění peptidu z pevné fáze použití trifluoroctové kyseliny (TFA). Při působení TFA dochází ke kyselé hydrolyze vazby mezi první aminokyselinou peptidové sekvence a funkční skupinou linkeru pevné fáze.^{2,10}

1.2 Proteázy

Mezi základní stavební kameny všech živých systémů patří proteiny. Jedná se o polypeptidové řetězce, tedy makromolekuly složené z proteinogenních aminokyselin spojených vzájemně peptidovou vazbou. Enzymy, které provádějí v organismech proteolýzu, tedy odbourávání těchto makromolekul, se nazývají proteázy. Při proteolýze dochází k hydrolýze peptidových vazeb mezi aminokyselinami, což vede ke štěpení polypeptidového řetězce. Vzhledem k hydrolytické povaze enzymatické reakce patří proteázy mezi tzv. hydrolázy.⁸

Zásadním rysem všech proteáz je jejich specifita – schopnost proteolyticky štěpit pouze substrát, tedy protein, o určité aminokyselinové sekvenci. Pro daný enzym jsou tedy substrátem jen proteiny o specifické struktuře, zatímco ostatní proteiny jsou tímto enzymem neštěpitelné. Vzhledem k této vlastnosti existuje známých proteáz napříč organismy obrovské množství. Každý živý systém totiž obsahuje celou sadu různých proteáz, kterou je schopen pokrýt celou škálu možných struktur proteinů. Specifita proteáz vykazuje značnou variabilitu. Existují proteázy specifické jen na jednu aminokyselinu, což znamená, že peptidová sekvence je peptidem štěpena na jakékoliv pozici obsahující tuto aminokyselinu. Mezi takové proteázy patří např. proteázy trávicí. Jiné proteázy naopak vykazují specifitu výhradně na konkrétní peptidovou sekvenci, což znamená, že substrátem může být například jen jeden konkrétní protein. Tato specifita je typická například pro proteázy kaskády krevní srážlivosti.

Proteázy můžeme rozlišovat dle místa polypeptidového řetězce, na kterém probíhá proteolýza, na endoproteázy a exoproteázy. Endoproteázy štěpí peptidové vazby uvnitř řetězců, a dělí je tak na menší sekvence. Exoproteázy odštěpují jednotlivé aminokyseliny od terminálních konců peptidových řetězců. Proteázy lze dále klasifikovat dle katalytického mechanismu do šesti tříd.^{11,12}

- Serinové proteázy;
- Cysteinové proteázy;
- Treoninové proteázy;
- Aspartátové proteázy;
- Glutamátové proteázy;
- Metaloproteázy;
- Asparaginové peptidové lyázy.

1.3 Fluorogenní substráty pro proteázy

Pro určování specifity proteáz jsou obecně využívány peptidové, či proteinové substráty připravené tak, aby se změna v jejich struktuře způsobená proteolytickým štěpením projevila vnějším detekovatelným signálem. Tímto projevem může být také fluorescence, substráty takto navržené jsou pak substráty fluorogenní. Jedná se tedy o látky, či platformy vykazující skrytou, potenciální fluorescenci, projevující se až po změně jejich struktury způsobené enzymatickým štěpením. Dle mechanismu, kterým se skrytá fluorescence projeví, existují dva nejvýznamnější typy fluorogenních substrátů.

Prvním typem jsou substráty vykazující FRET. *Fluorescence resonance energy transfer* (neboli FRET) je mechanismus přenosu energie mezi dvěma fluorofory, z nichž jeden vystupuje jako donor, druhý jako akceptor přenášené energie. Vnější energie spadá do absorpčního spektra donoru, který ji absorbuje, nicméně nefluoreskuje, protože jí emitovaná energie je absorbována akceptorem. Ten energii emituje do okolí, a tedy fluoreskuje. Podmínkou mechanismu FRET je těsná blízkost, řádově nanometrů, obou fluoroforů. Substrát tohoto typu tedy obsahuje v peptidové sekvenci v těsné blízkosti dva FRET fluorofory, díky kterým fluoreskuje emisním spektrem akceptoru. Po proteolýze a rozštěpení peptidového řetězce se oba fluorofory oddálí a mechanismus FRET přestane působit. Tato změna se projeví emisním spektrem donoru, tedy změnou fluorescence substrátu.¹³

Druhým typem jsou substráty založené na tzv. Fluorescence-Quenching systému. Jedná se o tzv. podmíněnou fluorescenci – systém fluoroforu, látky vykazující fluorescenci, a quencheru, neboli zhášče, schopného tuto fluorescenci blokovat. Zhášení fluorescence fluoroforu (quenching fluoroforu) vhodným zháščem nastává při vzniku nekovalentní interakce mezi zháščem a samotným fluoroforem, nebo strukturou obsahující fluorofor. Tato interakce je často způsobená těsnou fyzickou blízkostí obou struktur. Substrát na bázi tohoto systému obsahuje tedy v peptidové sekvenci vázaný fluorofor a zhášče. Ten zháší fluorescenci fluoroforu a substrát tak fluorescenci nevykazuje. Po rozštěpení peptidového řetězce je fluorofor od zhášče uvolněn, a začne tak vykazovat fluorescenci. Specifickým Fluorescence-Quenching systémem je i případ, kdy jsou dva fluorofory svými vzájemnými zhášči (Schéma 5).^{13,14}

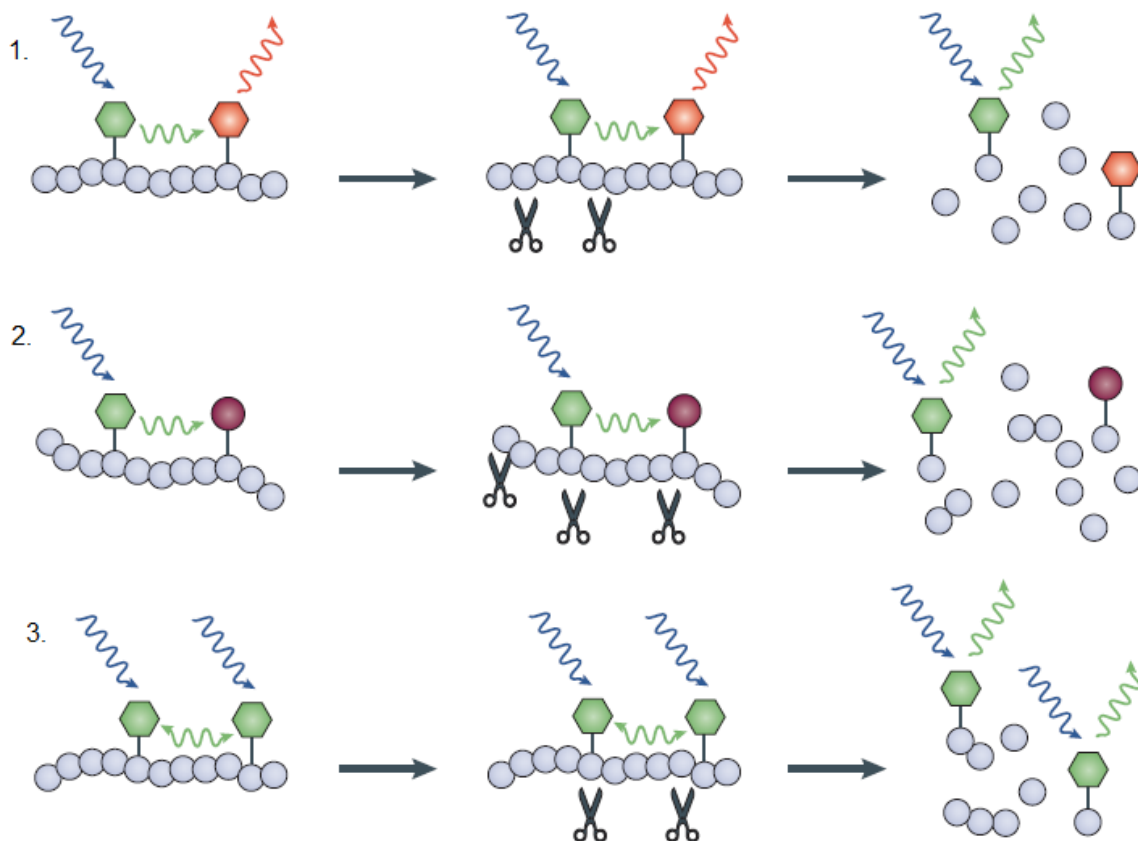


Schéma 5. Mechanismy jednotlivých fluorogenních substrátů. Peptidové sekvence obsahující FRET fluorofory (1.), systém fluoroforu a zhášeče (2.) a systém dvou fluoroforů zhášejících sama sebe (3.) jsou proteolyticky štěpeny proteázami. Projevem je změna fluorescence u všech substrátů.¹³

1.4 One Bead One Compound

Jednou z výhod syntézy na pevné fázi je možnost aplikace v kombinatoriální chemii. Cílem této disciplíny je příprava celých souborů, neboli kombinatoriálních knihoven sloučenin v jednoduchých reakčních krocích a při rozumné časové náročnosti. Požadavkem pro syntetizované sloučeniny je jejich „polymerní“ charakter, tedy struktura složená z variabilních základních jednotek. Těmto požadavkům dokonale vyhovují peptidy, neboť se jedná o zcela variabilní řetězce libovolně složené z jednotlivých aminokyselin. Pevná fáze je v tomto ohledu naopak ideálním médiem, neboť každé zrno (angl. *bead*) může obsahovat vlastní peptid a je zároveň dokonale oddělitelné od ostatních zrn. Jako kombinatoriální peptidovou knihovnu lze tedy označit soubor pevné fáze obsahující různé peptidové sekvence na různých zrnech pevné fáze. V krajním případě se může jednat o soubor pevné fáze, ve kterém každé zrno obsahuje jiný peptid, tedy odlišnou sloučeninu. Takováto kombinatoriální knihovna se v angličtině označuje jako *One Bead One Compound* (zkráceně *OBOC combinatorial library*).

Syntéza OBOC knihovny se provádí dle metodiky *Split and Mix* („rozdělit a smíchat“). Metoda je založená na opakovaném přerozdělování pevné fáze během peptidové syntézy. Pevná fáze je před couplingem první aminokyseliny rozdělena na n částí, přičemž n odpovídá počtu používaných aminokyselin pro tvorbu peptidů. Dále je s každou částí proveden coupling jedné příslušné aminokyseliny. Tímto jedním krokem je tedy připraveno n různých peptidů. Poté jsou všechny části smíchány a rozděleny znovu na n částí. Vzhledem k mikro-rozměrům jednotlivých zrn, a tedy jejich obrovskému počtu, je z hlediska pravděpodobnosti jisté, že v každé rozdělené části je zastoupeno všech n peptidů. Po provedení dalšího couplingu (každé části s jednou příslušnou aminokyselinou) obsahuje již soubor n^2 připravených peptidů. Uvedený postup lze opakovat a počet připravených peptidů tak exponenciálně roste dle vzorce n^k , kde k je počet provedených couplingů, tedy počet aminokyselin v peptidové sekvenci (Schéma 6).¹⁵

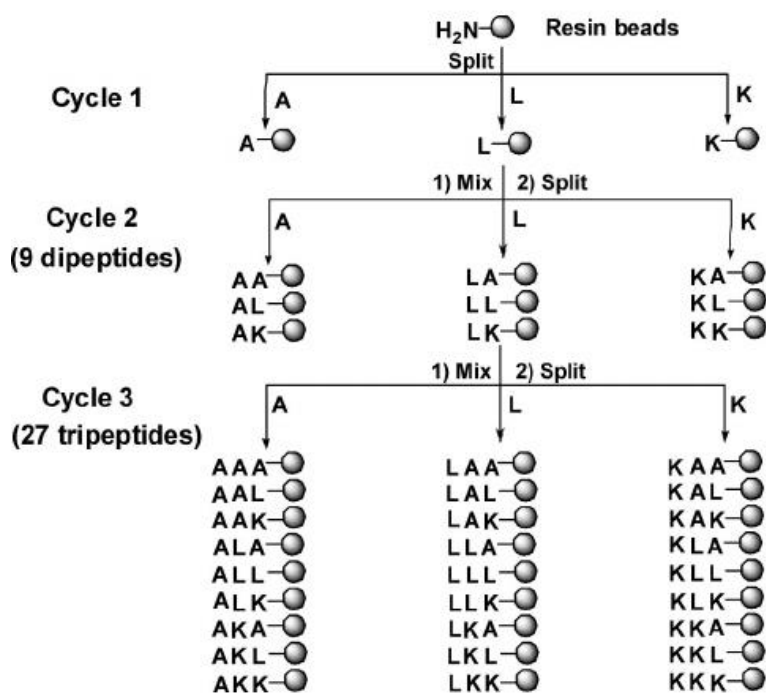


Schéma 6. Schématický průběh *Split and Mix* metody. Při použití tří různých aminokyselin lze připravit 27 tripeptidů.¹⁶

2 Cíle práce

Dlouhodobým cílem laboratoře Chemické biologie PŘF UK je tvorba peptidových kombinatoriálních knihoven sloužících jako platformy pro fenotypizaci a screening proteáz. Dílčím, a zároveň prvním, krokem tohoto výzkumu je vyvinutí úspěšné metody pro syntézu fluorogenních peptidových knihoven na vhodné pevné fázi a následná proteolýza těchto substrátů proteázami.

Obecným cílem této práce bylo prověření možností syntézy fluorogenních peptidů na různých pevných fázích a detekce enzymatického štěpení proteázami pomocí fluorescence.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Obecné aspekty

Záměrem tohoto výzkumu je syntéza obecné platformy pro studování aktivity a specificity proteáz, tedy pro screening sekvencí aminokyselin v peptidovém řetězci, kterou je schopna proteáza štěpit. Aplikace takovéto platformy by sloužila k určování těchto sekvencí u jednotlivých proteáz nebo jejich směsí. Pro takovýto screening specificity proteáz mohou být využity peptidy z peptidové knihovny. Peptidy lze syntetizovat v roztoku, a výsledná knihovna je pak souborem roztoků obsahujících různé peptidy. Nevýhodou knihoven v roztoku je však omezený počet obsažených peptidů, neboť každý peptid je při syntéze v roztoku připravován *de facto* zvlášť. Druhou možností je syntéza peptidů na pevné fázi, na které lze pomocí metod kombinatoriální chemie docílit knihovny o milionech různých peptidů. Pevná fáze je v tomto ohledu ideální platformou pro syntézu, neboť každé zrno může být vlastním substrátem obsahujícím specifickou peptidovou sekvenci. Při vhodně zvolené metodě screeningu se změny v sekvenci způsobené enzymatickým štěpením projeví pozorovatelnou změnou jednotlivých beadů pevné fáze. Tyto změny lze vzhledem k jejich rozměrům snadno detekovat, např. pomocí mikroskopu. Výhoda pevné fáze tedy spočívá v tom, že změny na molekulární úrovni způsobí viditelné makroskopické projevy.¹⁷ Byla popsána metodika screeningu založená na barvení pevné fáze barvivy.¹⁸ Nevýhoda tohoto screeningu spočívá v závislosti výsledku experimentu, tedy zbarvení substrátu, na použité koncentraci barviva. Interpretace výsledků je tedy značně problematická, neboť mohou nastávat falešně-pozitivní výsledky experimentů. Tento problém lze obejít použitím screeningu fluorogenního, neboť fluorescence substrátu je způsobena vždy kovalentně vázaným fluoroforem. Pro fluorogenní screening, tedy tvorbu proteázových fluorogenních substrátů na pevné fázi, je vhodná metodika Fluorescence-Quenching systém. Aplikace této metody při peptidové syntéze na pevné fázi spočívá v zapojení fluoroforu a zhášeče na začátek, respektive na konec syntetizované peptidové sekvence. Peptid tak funguje jako kovalentní spoj mezi fluoroforem a zhášečem, a podmiňuje tak zhášení fluoroforu. Pevná fáze obsahující takovouto sekvenci tedy fluorescenci nevykazuje, neboť fluorescence fluoroforu je potlačena zhášečem. Při enzymatické reakci s vhodnou proteázou však může dojít k rozštěpení peptidové sekvence a uvolnění zhášeče ze systému (Schéma 7.).¹⁹



Schéma 7. Fluorescence-Quenching systém na pevné fázi. Zapojení fluoroforu (*F*) a zhášeče (*Q*) do peptidové sekvence. Jednotlivé aminokyseliny jsou označeny *X*.

Odštěpení části peptidu společně se zhášečem má za následek uvolnění fluorescenčního signálu fluoroforu, a tedy i pozorovatelnou fluorescenci celé pevné fáze. Metoda fluorogenního screeningu tedy spočívá v enzymatickém působení proteáz na pevnou fázi a následné detekci zrn vykazujících fluorescenci.

Typickým fluoroforem ve Fluorescence-Quenching systému použitelným při peptidové syntéze je kyselina anthranilová. Její výhoda spočívá v možnosti navázání na *L*-lysin, a tedy zapojení do peptidové sekvence, bez ztráty fluorescenčních vlastností. Vzniklý derivát, *L*-lysin(Ant), je rovněž fluoroforem. Jako zhášeč těchto fluoroforů slouží *L*-nitrotyrosin, tedy derivát proteinogenního tyrosinu, navázaný v peptidové sekvenci (Schéma 8 a Schéma 9).¹⁹

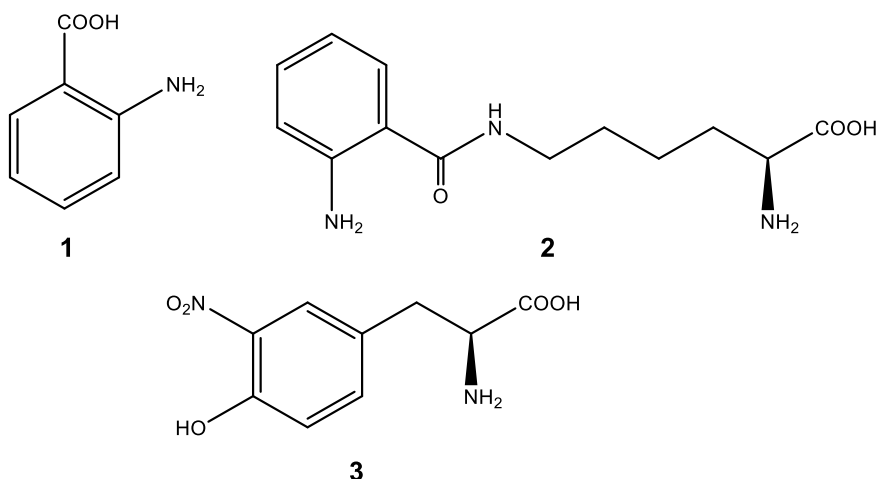


Schéma 8. Struktury kyseliny anthranilové (1), *L*-lysin(Ant) (2) a *L*-nitrotyrosinu (3)

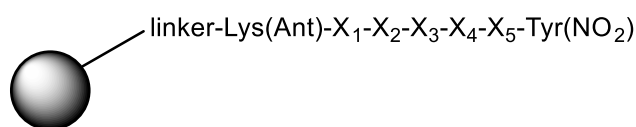


Schéma 9. Lysin(Ant) a nitrotyrosin navázané v peptidové sekvenci na pevné fázi

Fluorescence-Quenching systém lysin(Ant)-nitrotyrosin byl v literatuře¹⁹ aplikován na pevnou fázi PEGA. Nevýhodou tohoto materiálu jsou malé póry, kterými neproniknou makromolekuly enzymů větší než 20 kDa. Pro tvorbu obecných proteázových substrátů je tedy pevná fáze PEGA nevhodná. Uvedená metodika byla tedy v této práci aplikována na pevnou fázi TentaGel. Vzhledem k rozměrům pórů zrn TentaGel se předpokládalo jen povrchové proteolytické štěpení (tzv. *Shaving*). Pevné

fáze TentaGel (angl. *TentaGel resins*) jsou obecně kopolymery polystyrenu a polyethylenglykolu. Jednotlivé beady TentaGelu jsou tedy tvořeny polystyrenovým jádrem s naroubovanou vnější vrstvou polyethylenglykolu. Na této vnější vrstvě jsou dále navázány volné aminové skupiny.^{20,21}

Pevné fáze PEGA a TentaGel byly vyvinuty pro možnosti biogenních screeningů. Tyto materiály jsou oproti klasickým resinům (*Merrifield, Wang, Ring Acid resins*) hydrofilní, a lze je tak využívat i ve vodném prostředí. Zásadní odlišností oproti původním resinům je nehydrolyzovatelná aminová skupina na povrchu pevné fáze, a tedy nemožnost uvolnění peptidu kyselou hydrolyzou TFA.^{20,21}

Pro uvolnění peptidu z pevné fáze se tedy využívá metodika s využitím methioninu jakožto počáteční aminokyseliny každé sekvence. Při reakci peptidu obsahujícího methionin s bromkyanem v kyselém prostředí dochází k rozložení peptidového řetězce a vzniku laktonu v poloze methioninu (Schéma 10.). Aminokyselinová sekvence navázaná v řetězci za methioninem je tak uvolněna z pevné fáze a je možné ji analyzovat.^{22,23}

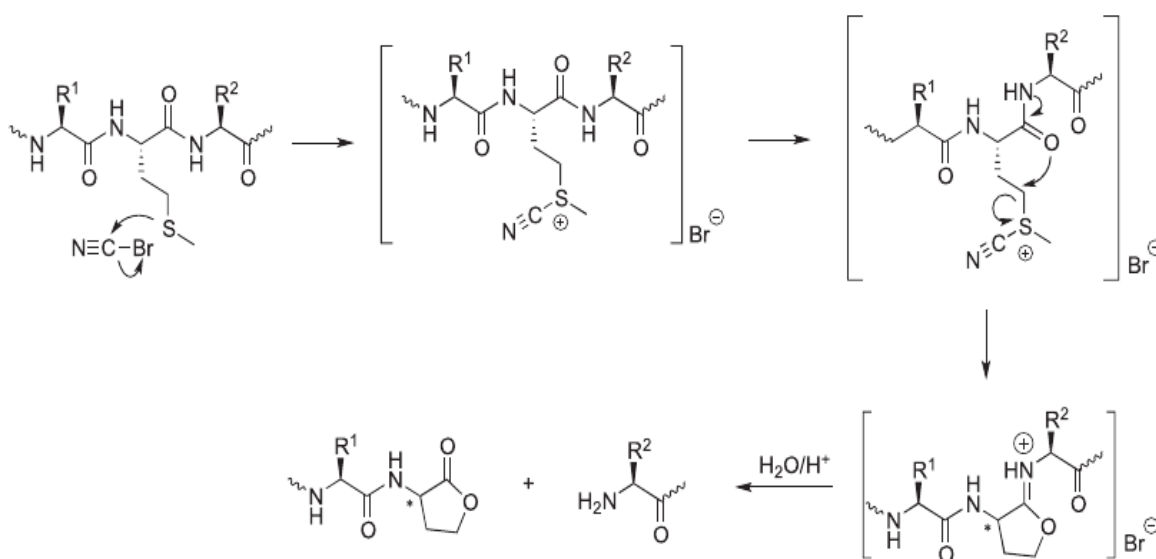


Schéma 10. Reakce methioninu s bromkyanem při uvolňování peptidu z pevné fáze²³

Methionin je v peptidové sekvenci navázán jako první aminokyselina po linkeru. Za ním dále následuje fluorofor, sekvence aminokyselin štěpitelná proteázami a zhášeč. Změny v sekvenci způsobené proteolytickým štěpením jsou tedy vždy v pozicích za methioninem, a lze je tedy po provedeném experimentu uvolněním z pevné fáze detekovat.

3.1.1 Proteolýza

Pro testování proteázových substrátů byly používány proteázy chymotrypsin, trypsin a pepsin. Jedná se o modelové a komerčně dostupné proteázy. Substrátová specifita těchto proteáz je uvedena v následující tabulce a ve schématu.²⁴

Tabulka 1: Charakterizace proteáz²⁴

Enzym	C ₂	C ₁	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄
Chymotrypsin	-	ne M, P	W	-	-	-
	-	ne P, Y	M	-	-	-
	-	ne D, M, P, W	H	-	-	-
Trypsin	-	P	K	W	-	-
	-	P	R	M	-	-
Pepsin	ne P	F, L, W, Y	ne R	ne P	ne H, K, R	-
	ne P	-	F, L, W, Y	ne P	ne H, K, R	-

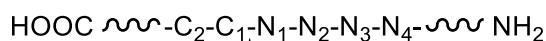


Schéma 11. Schématická struktura proteázového substrátu²⁴

Jak je uvedeno ve schématu, při proteolýze je štěpena peptidová vazba mezi aminokyselinami označenými N₁ a C₁. Tato štěpená peptidová vazba dělí pomyslně peptid na část směřující k C-konci a část směřující k N-konci. Pozice, tedy jednotlivé aminokyseliny v řetězci, nesou označení N a C dle konce, ke kterému směřují a dále číselné označení pořadí. Při syntéze na pevné fázi směřuje C-konec peptidového řetězce směrem k zrně pevné fáze, terminálním N-koncem je řetězec naopak zakončen.

3.2 Příprava a proteolýza substrátů na TentaGelu

Pevná fáze TentaGel je vysoce porézní, syntetizované peptidy jsou tedy navázané jak na povrchových, tak ve vnitřních vrstvách polymerních zrn. Vzhledem k malým rozměrům pórů jsou peptidové sekvence ve vnitřních prostorech nepřístupné makromolekulám proteáz, a proteolytické štěpení tak probíhá pouze na vnějších povrchových vrstvách. Proteolýza tak probíhá jako jakési „oholení“ (angl. *shaving*) povrchu pevné fáze (Schéma 12.). Vzhledem k tomu byla předpokládaným projevem proteolýzy fluorescence na povrchu zrn.^{20,21}

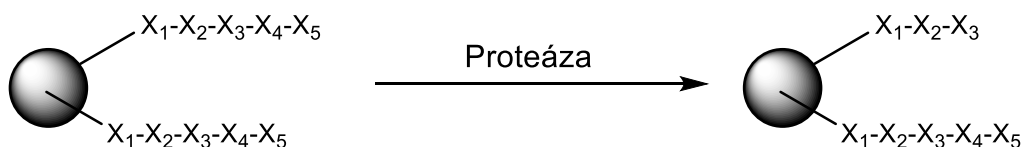


Schéma 12. Mechanismus povrchového proteolytického štěpení na pevné fázi TentaGel

Tento způsob proteolýzy je výhodný pro možnost analýzy výchozí peptidové sekvence po enzymatickém štěpení, neboť část původního peptidu vždy zůstane navázána ve vnitřních vrstvách pevné fáze.^{20,21}

3.2.1 Syntéza peptidu s využitím linkeru

Na pevné fázi TentaGel byl připraven peptid 1. (Schéma 13.).

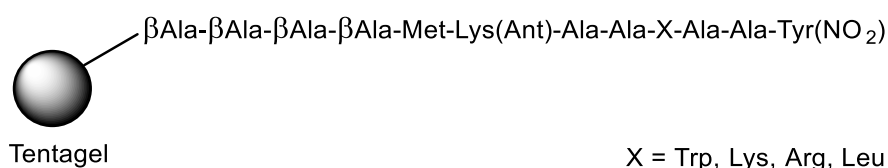


Schéma 13. Peptid 1

Při syntéze byl využit linker (spojka), skládající se ze čtyř β -alaninů, pro oddálení peptidové sekvence od povrchu pevné fáze. Po osmém reakčním kroku, tedy po navázání druhého alaninu, a ochránění od Fmoc byla pevná fáze rozdělena na čtyři části. S každou částí jsem byl proveden coupling jedné vybrané aminokyseliny. Aminokyseliny byly vybrány tak, aby byla finální peptidová sekvence substrátem pro jednu danou proteázu. V následující tabulce jsou uvedeny čtyři využití aminokyseliny a proteázy, kterými byly příslušné peptidové sekvence štěpeny.

Tabulka 2: Aminokyseliny obsažené v jednotlivých sekvencích a příslušné proteázy

Aminokyselina	Proteáza
Tryptofan	Chymotrypsin
Lysin	Trypsin
Arginin	Trypsin
Leucin	Pepsin

Před couplingem nitrotyrosinu bylo z každého vzorku pevné fáze malé množství odebráno. Odebrané vzorky slouží jako tzv. pozitivní reference, tedy reference pro pozitivní fluorescenční signál sekvence bez přítomného zhášedce.

3.2.2 Proteolytické štěpení připravené sekvence

Před proteolýzou bylo z každého vzorku pevné fáze malé množství odebráno. Odebrané vzorky slouží jako tzv. negativní reference, tedy reference pro ověření

nepřítomnosti fluorescenčního signálu bez enzymatického štěpení. Peptidy na pevné fáze byly následně inkubovány s chymotrypsinem ($X = \text{Trp}$), trypsinem ($X = \text{Lys}, \text{Arg}$) a pepsinem ($X = \text{Leu}$). Uvolněný fluorescenční signál nebyl u žádného vzorku pevné fáze pozorován, a tak byla proteolýza zopakována. Výsledek po dvojnásobném proteolytickém štěpení byl nadále negativní. Pozitivní reference, tedy sekvence neobsahující zhášec, vykazovaly vždy silnou fluorescenci, naopak negativní reference, tedy vzorky odebrané před proteolytickým štěpením, stejně jako proteolyticky štěpené vzorky, byly zcela bez fluorescenčního signálu. Povrchová proteolýza na TentaGelu tedy nebyla prokázána.

Negativní výsledek mohl být způsoben přílišnou koncentrací nitrotyrosinu, tedy zhášeče. Ten je pravděpodobně při povrchovém proteolytickém štěpení odštěpen pouze z peptidových sekvencí na povrchu pevné fáze, na sekvencích z vnitřní části pevné fáze však zůstává. Pokud by byla jedna molekula nitrotyrosinu schopna způsobovat zhášení i jiných peptidů, tedy nejen té, na kterou je kovalentně vázána, mohl by být fluorescenční signál i po proteolýze blokován. Uvolněné fluorofory z rozštěpených sekvencí na povrchu by byly totiž okamžitě zhášeny nitrotyrosinem z nerozštěpených vnitřních sekvencí.

V následujícím experimentu byla testována tato hypotéza, tedy přílišná koncentrace nitrotyrosinu v peptidových sekvencích. Byly tedy zkoumány účinky zhášeče při proteolýze.

3.2.3 Syntéza peptidu pro testování koncentrace zhášeče

Na pevné fázi TentaGel byl připraven peptid 2 (Schéma 14.).

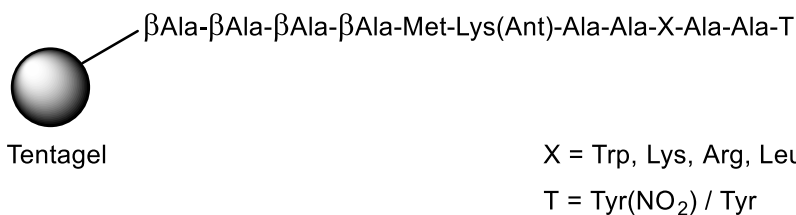


Schéma 14. Peptid 2

Každá připravená peptidová sekvence liší se aminokyselinou na pozici X v řetězci byla před couplingem zhášeče rozdělena na pět částí. S každou částí byl proveden coupling obsahující směs nitrotyrosinu a tyrosinu o daném poměru. Tyrosin, na rozdíl od nitrotyrosinu, není zhášečem, a proto na peptidové sekvenci nezhasí fluorescenci fluoroforu. Při použití směsi nitrotyrosinu s tyrosinem místo samotného nitrotyrosinu je tedy zhášecí účinek snížen, neboť jen určitá frakce peptidových sekvencí obsahuje navázaný zhášec.

Poměry tyrosinu a nitrotyrosinu pro jednotlivé sekvence jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 3: Poměry tyrosinu a nitrotyrosinu pro jednotlivé sekvence

Peptid	Tyrosin	Nitrotyrosin
1.	0	1
2.	0,25	0,75
3.	0,5	0,5
4.	0,75	0,25
5.	1	0

3.2.4 Proteolytické štěpení pro testování koncentrace zhášeče

Každá sada peptidových sekvencí byla vystavena účinkům příslušné proteázy a vzorky byly vyhodnoceny pod mikroskopem. Hledaným pozitivním výsledkem byl pozorovatelný rozdíl fluorescence mezi referencí (vzorek proteolyticky neštěpený) a vzorkem proteolyticky štěpeným. Takový vzorek by tedy obsahoval ideální poměr tyrosinu a nitrotyrosinu. Před proteolýzou by bylo dané množství nitrotyrosinu dostačující pro zhášení veškerého fluoroforu, pevná fáze by tedy fluorescenci nevykazovala. Po proteolýze, a tedy po odštěpení nitrotyrosinu z povrchu pevné fáze, by již uvolněný fluorofor nebyl zhášen, a pevná fáze by tak vykazovala fluorescenci. Jednalo by se tak o mezní poměr, při kterém by byl zhášeč maximálně nasycen zhášením fluoroforu. Po odštěpení malého množství zhášeče by již uvolněný fluorofor nemohl být zahrnut do plně nasycených komplexů zhášeč-fluorofor a projevil by se tak fluorescenční signál.

Hledaný výsledek nebyl u žádného vzorku pozorován. Při poměrech 0,5:0,5; 0,75:0,25 a 1:0 (tyrosin: nitrotyrosin) byla koncentrace zhášeče nedostačující, a fluorescenci tak vykazovaly reference i vzorky proteolyticky štěpené. Při poměru 0:1 (tyrosin: nitrotyrosin) naopak nevykazovaly fluorescenci reference ani štěpené vzorky, neboť vzorek obsahoval 100% nitrotyrosinu. Stejný výsledek však vykazoval i vzorek 0,25:0,75 (tyrosin: nitrotyrosin). Fluorescenční signál nebyl pozorován u reference ani u štěpeného vzorku i přesto, že obsahoval pouze 75% nitrotyrosinu, tedy zhášeče. Tento výsledek tedy nasvědčuje hypotéze o schopnosti nitrotyrosinu zhášet více než jeden fluorofor navázaný na peptidové sekvenci.

3.3 Příprava a proteolýza substrátů na porézním skle

Vzhledem k nepřítomnosti fluorescenčního signálu po proteolytickém štěpení na pevné fázi TentaGel byly využity odlišné pevné fáze, a to porézní skla (CPG). Jedná se o materiály primárně používané pro syntézy oligonukleotidů. Využití pro peptidovou syntézu je v literatuře zcela ojedinělé. Cílem experimentů tedy bylo aplikovat zvolenou metodiku peptidové syntézy na tyto pevné fáze.

Porézní sklo se od TentaGelu zásadně liší velikostí pórů. Póry porézního skla jsou svými rozměry zcela přístupny makromolekulám enzymů, proteolytické štěpení tedy neprobíhá jen na peptidech z povrchu pevné fáze, ale na všech peptidech obsažených na pevné fázi.²⁰

3.3.1 Syntéza peptidu na skle LCAA CPG

Prvním použitým typem porézního skla bylo sklo LCAA CPG. Označení LCAA je zkratkou pro *Long Chain Amino Acids*, neboli dlouhý aminokyselinový řetězec. Jedná se tedy o materiál, na jehož povrch je již navázán řetězec aminokyselin, sloužící jako linker. U tohoto materiálu se jedná o linker čítající 30 uhlíků. Vzhledem k přítomnosti linkeru nebyla již při syntéze použita sekvence čtyř β -alaninů.

Na pevné fázi LCAA CPG byl připraven peptid 3, univerzální pro proteolytické štěpení chymotrypsinem i trypsinem (Schéma 15).

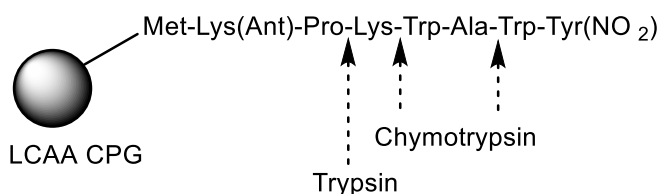
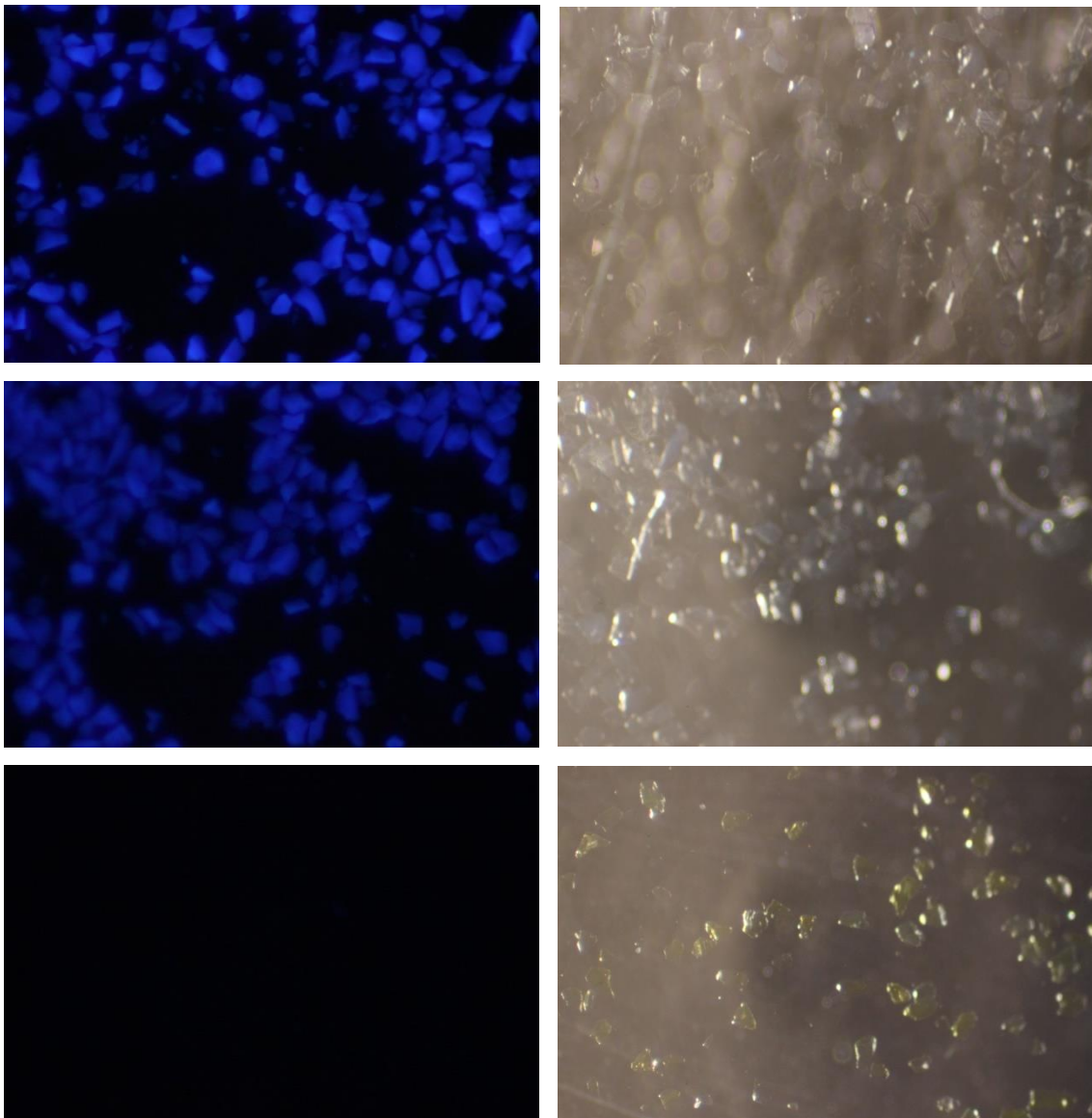


Schéma 15. Peptid 3 a místa štěpení proteázami

Peptidová sekvence byla úspěšně připravena, čímž byla prokázána možná aplikace metodiky peptidové syntézy i na porézní sklo LCAA CPG.

3.3.2 Proteolytické štěpení na skle LCAA CPG

Peptidy na pevné fázi (Schéma 15.) byla vystaveny účinkům chymotrypsinu a trypsinu. Oba substráty vykazovaly pozorovatelný fluorescenční signál. Pozitivní výsledek byl také potvrzen nepřítomností fluorescenčního signálu u příslušné reference, tedy u proteolyticky neštěpeného vzorku. Proteolytické štěpení na pevné fázi tak bylo potvrzeno signifikantním vzrůstem fluorescence způsobeným odštěpením zhášeče z peptidové sekvence. Výsledky proteolytického štěpení na skle LCAA CPG jsou zobrazeny na následujících snímcích pevné fáze (Obrázek 1).



Obrázek 1. Snímky pevné fáze po proteolytickém štěpení chymotrypsinem, trypsinem a proteolyticky neštěpená reference (v pořadí od horního ke spodnímu). Nalevo snímek fluorescence (excitace 365 nm), napravo snímek při viditelném světle.

3.3.3 Syntéza peptidu na skle CPG beads

Nevýhodou skla LCAA CPG je heterogenita jednotlivých částic pevné fáze, a dále jeho křehkost a nedostatečná mechanická odolnost. Z toho důvodu bylo zvoleno porézní sklo CPG beads. Jedná se o sférické částice, které jsou rozměrově unifikovanější a mechanicky odolnější.

Na pevné fázi CPG beads byl připraven peptid 4, univerzální pro proteolytické štěpení chymotrypsinem, trypsinem i pepsinem (Schéma 16.).

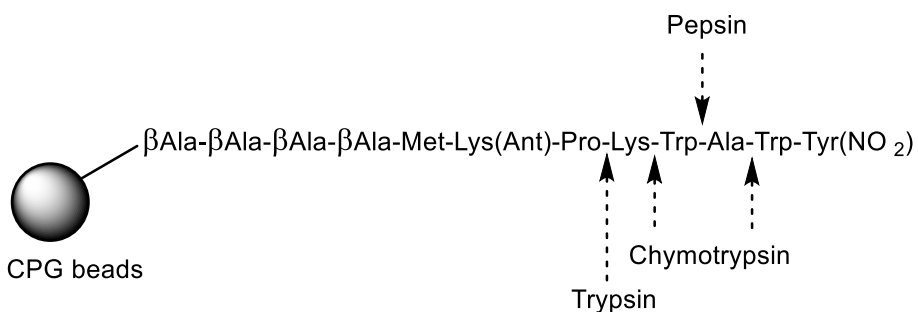
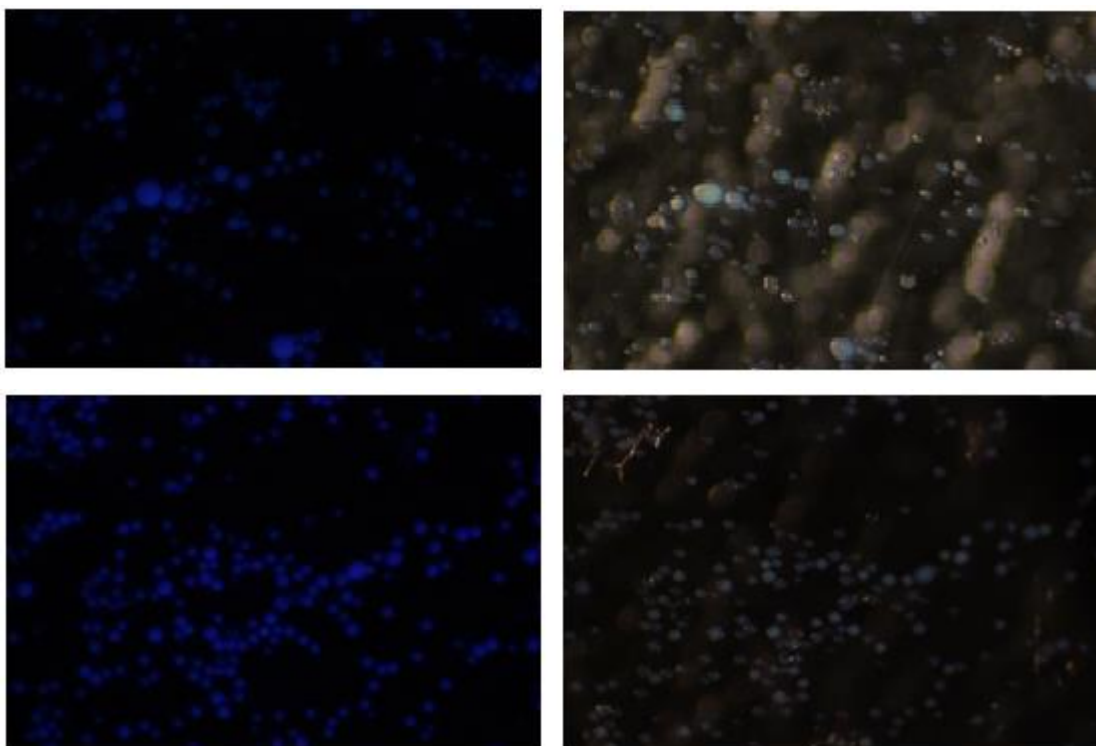


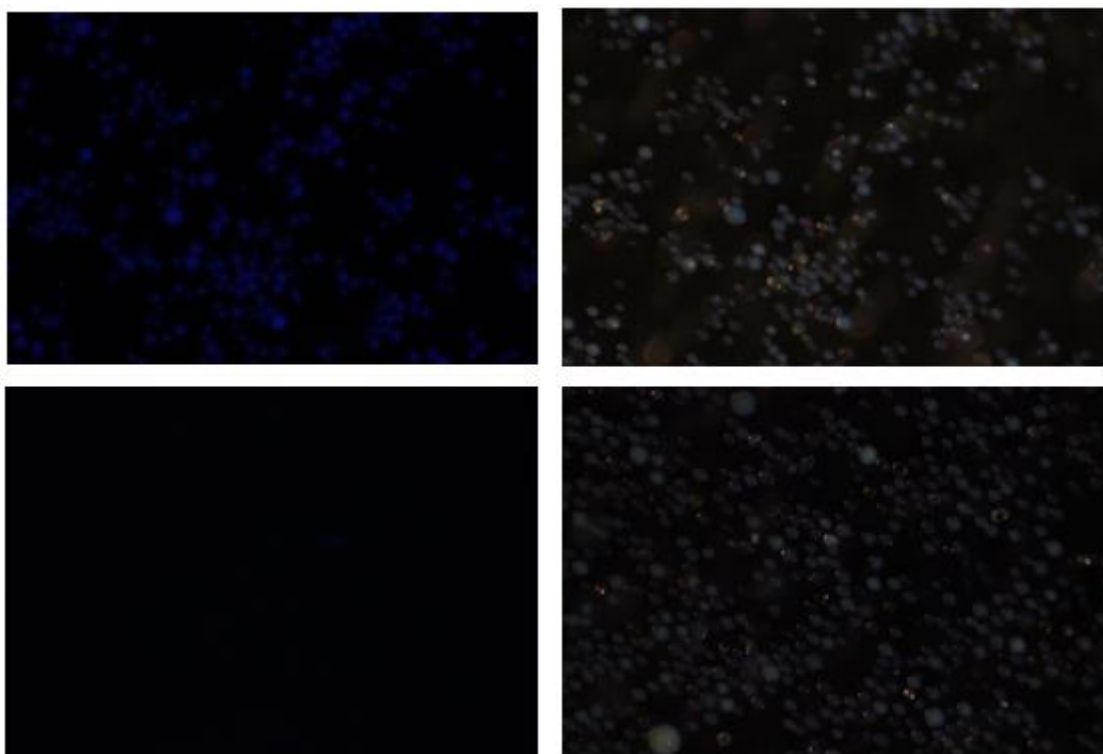
Schéma 16. Peptid 4 a místa štěpení proteázami

Peptidová sekvence byla úspěšně připravena, čímž byla prokázána možná aplikace metodiky peptidové syntézy i na porézní sklo CPG beads.

3.3.4 Proteolytické štěpení na skle CPG beads

Peptidová sekvence (Schéma 16) byla vystavena účinkům chymotrypsinu, trypsinu a pepsinu. Všechny substráty vykazovaly pozorovatelný vzrůst fluorescenčního signálu. Pozitivní výsledek byl také potvrzen nepřítomností fluorescenčního signálu u proteolyticky neštěpené reference. Proteolytické štěpení na pevné fázi bylo tedy opět prokázáno. Výsledky proteolytického štěpení na skle CPG beads jsou zobrazeny na snímcích pevné fáze (Obrázek 2).





Obrázek 2. Snímky pevné fáze po proteolytickém štěpení chymotrypsinem, trypsinem, pepsinem a proteolyticky neštěpená reference (v pořadí od horního ke spodnímu). Nalevo snímek fluorescence (excitace 365 nm), napravo snímek při viditelném světle.

3.3.5 Syntéza peptidu s D-tryptofanem

Porézní sklo CPG beads se ukázalo jako vhodné médium pro přípravu fluorogenních peptidů na pevné fázi. Problémem je však fakt, že proteolýza probíhá vzhledem k rozměrům pórů na všech peptidových sekvencích beze zbytku. Pro tvorbu kombinatoriálních knihoven je však možnost dekódování sekvencí na zrnech pevné fáze klíčová, a proto musí část výchozího peptidu na pevné fázi zůstat i po enzymatické reakci.

Pro možnou analýzu výchozího peptidu byla zvolena metodika syntézy peptidových sekvencí obsahujících *D*-aminokyseliny. Tato metodika je založena na specifitě proteáz výhradně vůči *L*-aminokyselinám. Peptidy obsahující v proteolyticky aktivní sekvenci *D*-enantiomerní analogy nemohou být proteázami štěpeny. Pokud tedy pevná fáze obsahuje dvojí peptidy lišící se enantiomerní formou aminokyseliny v proteolyticky aktivní sekvenci, dojde při enzymatické reakci k rozštěpení pouze peptidů obsahujících *L*-enantiomer (Schéma 17.). Peptidové sekvence obsahující neproteinogenní enantiomer jsou zachovány a mohou poskytovat informaci o výchozím peptidu.

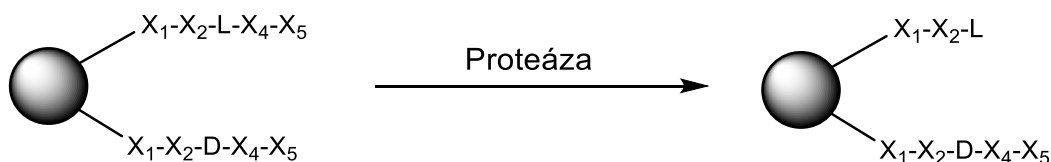


Schéma 17. Proteolytické štěpení s využitím *D*-aminokyselin

Na pevné fázi CPG beads byl připraven peptid 5 (Schéma 18.).

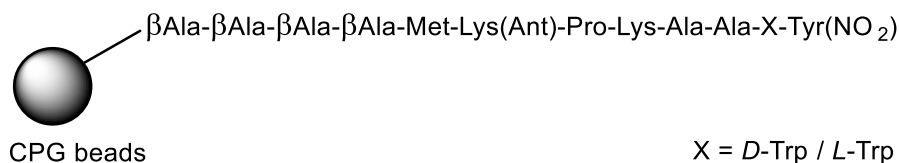


Schéma 18. Peptid 5

Celkem bylo připraveno 6 sekvencí lišících se poměrem *D*-tryptofanu a *L*-tryptofanu na pozici *X*. Poměry těchto aminokyselin pro jednotlivé sekvence jsou uvedeny v následující tabulce.

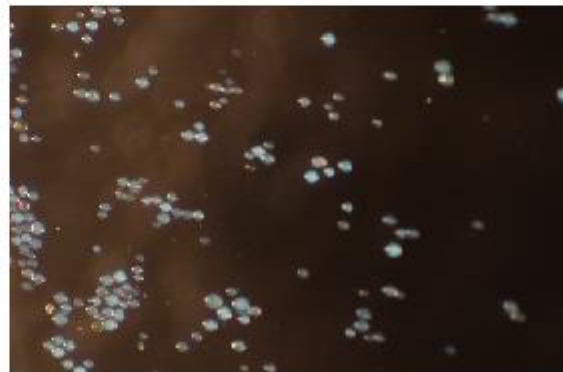
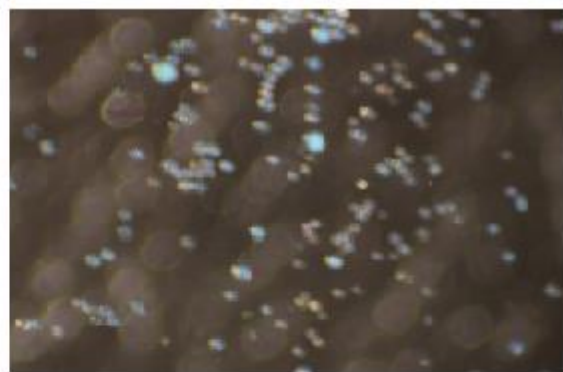
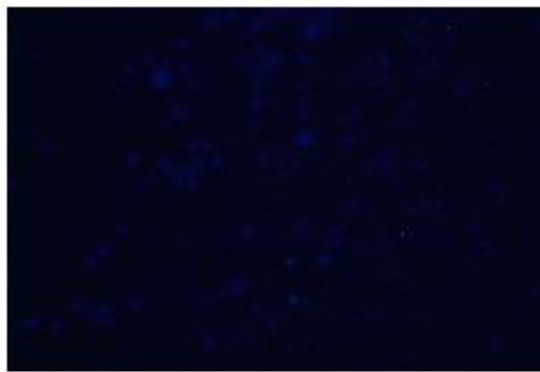
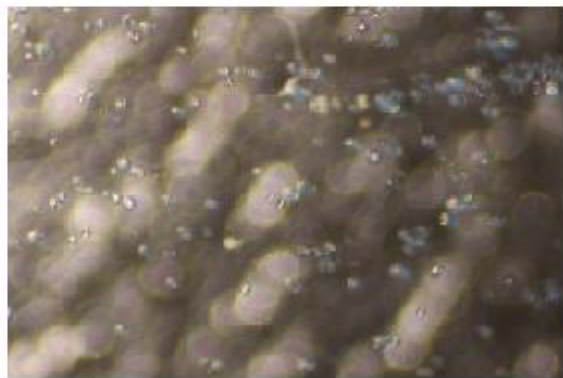
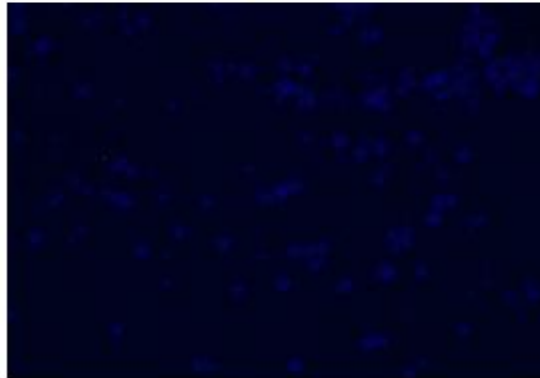
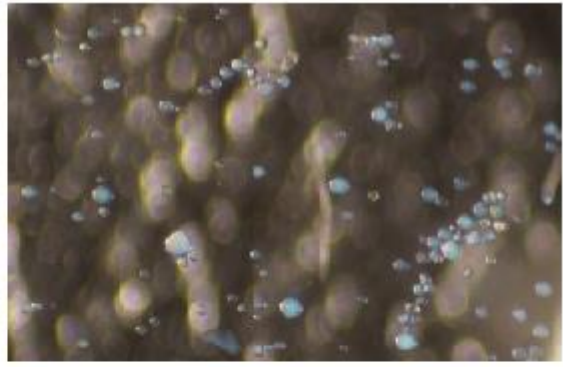
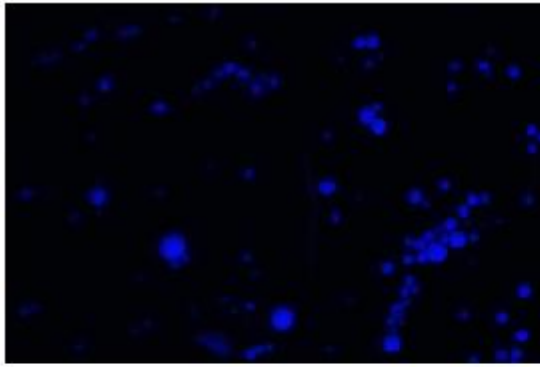
Tabulka 4: Poměry *D*-tryptofanu a *L*-tryptofanu pro jednotlivé sekvence

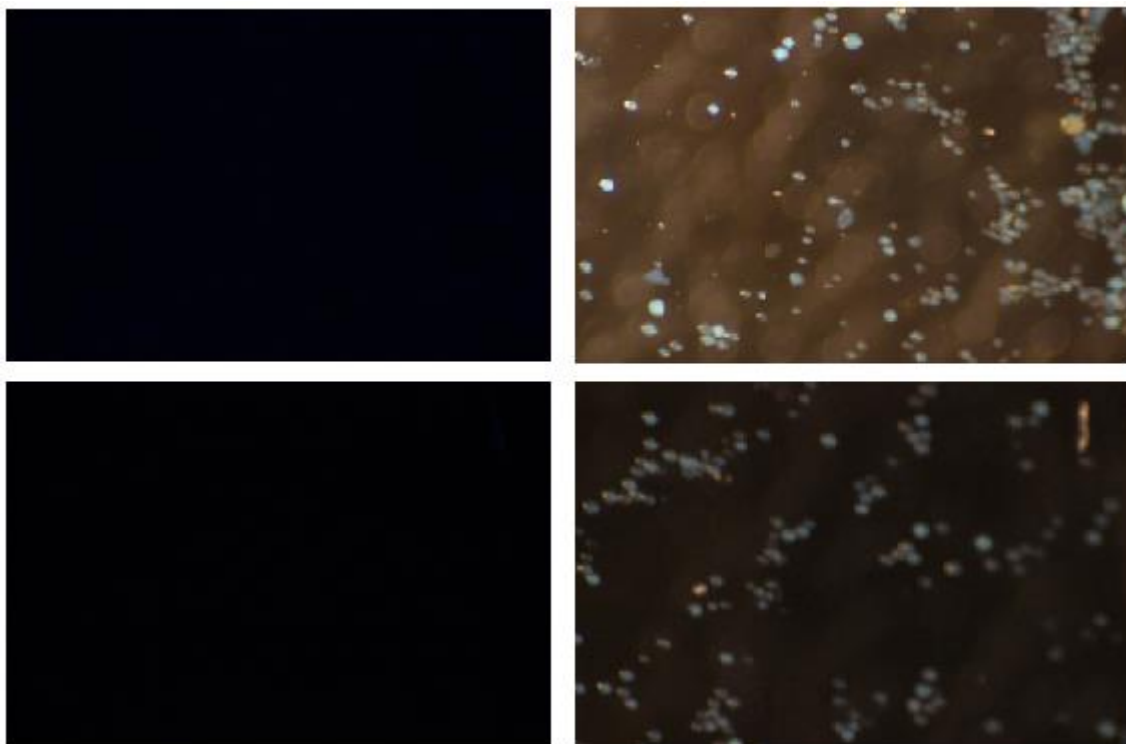
Peptid	<i>D</i> -tryptofan	<i>L</i> -tryptofan
1.	0	1
2.	0,2	0,8
3.	0,4	0,6
4.	0,6	0,4
5.	0,8	0,2
6.	1	0

3.3.6 Proteolytické štěpení peptidu s *D*-tryptofanem

Připravené peptidové sekvence byly inkubovány chymotrypsinem. Při pozorování pevné fáze pod mikroskopem odpovídala míra fluorescence jednotlivých vzorků množství *L*-tryptofanu v peptidových sekvencích. Proteolytické štěpení tedy proběhlo jen do té míry, do jaké byl na peptidových sekvencích přítomen proteolyticky aktivní *L*-tryptofan.

Zvyšující se fluorescence jednotlivých vzorků v závislosti na množství *L*-tryptofanu jsou zobrazeny na snímcích pevné fáze (Obrázek 3).





Obrázek 3. Snímky proteolyticky štěpené pevné fáze o různých množstvích L-tryptofanu a D-tryptofanu, tedy o poměru $D:L = 0:1$; $0,2:0,8$; $0,4:0,6$; $0,6:0,4$; $0,8:0,2$ a $1:0$. Nalevo snímek fluorescence (excitace 364 nm), napravo snímek při viditelném světle.

Pro zachování co nejintenzivnějšího fluorescenčního signálu pevné fáze je ideální vzorek 2, tedy poměr D a L formy $0,2:0,8$. Tento vzorek obsahuje ve svých sekvencích z 80 % L-tryptofan a vykazuje tedy dostatečnou, a v rámci vzorků obsahujících D-tryptofan i maximální, fluorescenci. Zbýlých 20 % sekvencí však obsahuje D-tryptofan, díky kterému je na pevné fázi zachována informace o výchozí peptidové sekvenci.

3.3.7 MS analýza vzorků s D-tryptofanem

Pro ověření možné detekce peptidové sekvence z jednoho zrna při daném množství D-tryptofanu byla provedena se vzorkem 2 (poměr D a L formy $0,2:0,8$) MS analýza. Pro referenční detekci peptidové sekvence byla provedena rovněž MS analýza vzorku 6 (poměr D a L formy $1:0$). Peptidy z obou vzorků byly reakcí s bromkyanem odštěpeny z pevné fáze. Oba vzorky obsahují výchozí proteolyticky neštěpený peptid s obsaženým D-tryptofanem uvolněný z pevné fáze (peptid 6) o molekulové hmotnosti MW 1109,5294 (Schéma 19.).

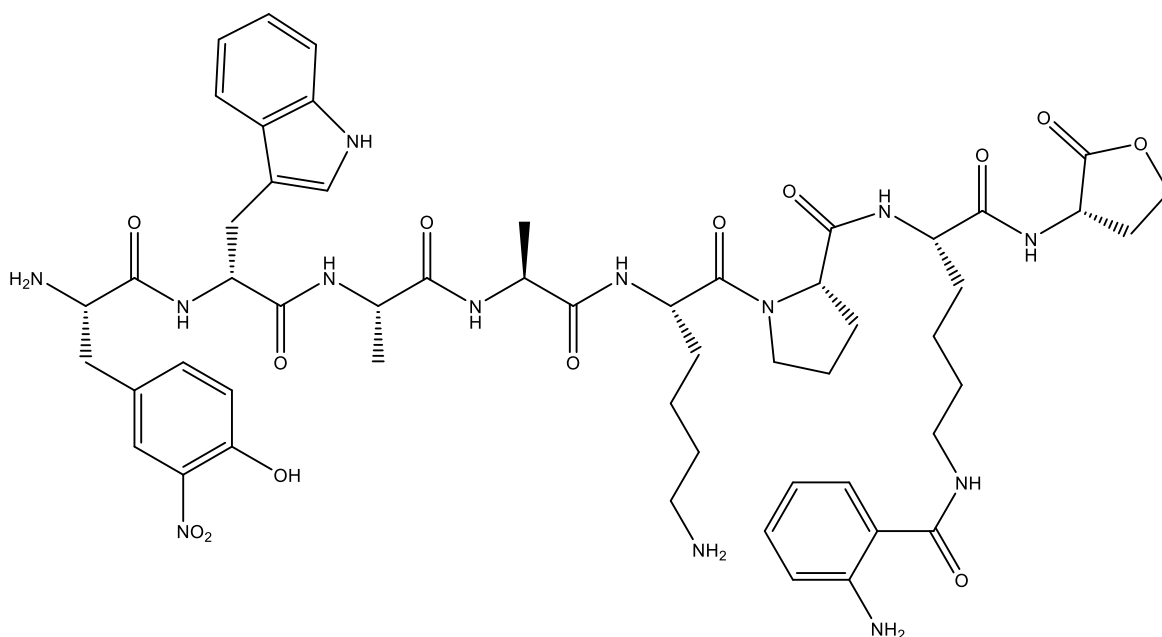


Schéma 19. Struktura peptidu 6

Získaná MS spektra jsou přiložena v kapitole Přílohy. HPLC-MS analýza prokázala, že peptid 6 je detekovatelný jak ve vzorku 2 (poměr *D* a *L* formy 0,2:0,8), tak ve vzorku 6 (poměr *D* a *L* formy 1:0). Kromě toho fragmentační spektra mateřského iontu ($[M-H^+]$ 1110,5372) v obou vzorcích ukazují možnost *in situ* sekvenace daného peptidu. Tímto je prokázána možnost dekódování aminokyselinových sekvencí i z jednotlivých zrn pevné fáze, což je klíčový aspekt při syntéze kombinatoriálních knihoven.

4 Experimentální část

4.1 Obecné parametry experimentů

Při syntéze byla používána pevná fáze TentaGel S NH₂ (loading 260 μmol/g, velikost zrn 100 μm) zakoupená u firmy Rapp Polymere GmbH, pevná fáze LCAA CPG (loading 30-50 μmol/g, póry 500 Å) poskytnuta Dr. Rosenbergem z ÚOCHB AV ČR a pevná fáze CPG beads (loading 86 μmol/g, póry 1000 Å, velikost zrn 100 μm) zakoupená u firmy Biosearch Technologies. Činidla HBTU, HOBt a BOP byla zakoupena u firmy Sigma-Aldrich. Veškeré další reagenty a činidla byly zakoupeny rovněž u firmy Sigma-Aldrich nebo Iris Biotech GmbH v p.a. čistotě. Rozpouštědla DMF a NMP byla zakoupena v Peptide Grade kvalitě u firmy Iris Biotech GmbH, rozpouštědlo DMA bylo zakoupeno u firmy Sigma-Aldrich v p.a. čistotě. Používané aminokyseliny byly zakoupeny u firmy Iris Biotech GmbH. Jedná se o aminokyseliny chráněné skupinou Fmoc na terminální aminové skupině, a případně skupinou Boc, Pbf či tBu na postranním řetězci. Používané aminokyseliny v jejich konkrétních podobách jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 5: Používané aminokyseliny od firmy Iris Biotech GmbH

Aminokyselina	Chráněná forma
Alanin	Fmoc-L-Ala-OH · H ₂ O
β-Alanin	Fmoc-beta-Ala-OH
Arginin	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH
Glycin	Fmoc-L-Gly-OH
Leucin	Fmoc-L-Leu-OH
Lysin	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH
Methionin	Fmoc-L-Met-OH
D-Tryptofan	Fmoc-D-Trp(Boc)-OH
L-Tryptofan	Fmoc-L-Trp(Boc)-OH
Tyrosin	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH
Prolin	Fmoc-L-Pro-OH · H ₂ O
Nitrotyrosin	Fmoc-Tyr(NO ₂)-OH

NMR spektrum bylo změřeno na přístroji Varian UNITY INOVA – 300. Pro měření bylo jako rozpouštědlo využito DMSO-d₆. Chemické posuny jsou referencovány vůči tomuto rozpouštědlu. Chemický posun DMSO-d₆ je pro ¹H NMR spektrum δ = 2,50 ppm. Chemické posuny jsou uváděny v ppm a hodnoty interakčních konstant *J* v Hz. Pro míchání vzorků během experimentů bylo využíváno rameno rotační vakuové odparky. Pro pozorování pevné fáze a vybírání jednotlivých zrn pro analýzu byl

využíván optický mikroskop Leica 6SD a pro pořizování snímků digitální fotoaparát Canon EOS 600D s expozicí 0“5. Pro analýzu byly vzorky lyofilizovány na lyofilizátoru FreeZone 2.5 od firmy LABCONCO. Hmotnostní spektra byla měřena v servisním centru PřF UK v laboratoři hmotnostní spektrometrie pracoviště BIOCEV na přístroji Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer v kombinaci s nanoHPLC - UltiMate 3000 Nano LC Systems.

4.2 Syntéza Fmoc-L-Lysin(Boc-Ant)-OH

Nejprve byl Fmoc-L-Lysin(Boc)-OH ochráněn od chránicí skupiny Boc. K Fmoc-L-Lysin(Boc)-OH (5,00 g; 10,67 mmol) bylo přidáno 100 ml směsi DCM/TFA (1/1) a směs byla za stálého míchání ponechána reagovat 1,5 hodiny. Směs byla poté odpařena na vakuové rotační odparce. Pro odstranění všech zbytků TFA byl produkt dvakrát odpařen s toluenem. Získaný meziprodukt (4,00 g; 10,9 mmol) byl rozpuštěn ve 188 ml DMF. Do 500ml baňky byla navážena kyselina N-Boc-anthranilová (3,10 g; 13,1 mmol) a BOP (5,78 g; 13,1 mmol). Směs byla rozpuštěna v 94 ml DMF a bylo přidáno 4,6 ml DIEA. Vzniklá směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byl k reakční směsi přidán roztok ochráněného lysinu v DMF. Byla provedena kontrola pH pomocí pH papírku, pH bylo rovno 7. Dále byl přidán dvojnásobný nadbytek DIEA, tedy 9,2 ml, čímž bylo pH zvýšeno na hodnotu 10 (opět zkontrolováno pH papírkem). Směs byla za stálého míchání ponechána reagovat po dobu 24 hodin. Poté byla směs zfiltrována a promyta s ethylacetátem a nasyceným roztokem chloridu sodného. Vodná fáze byla promyta s ethylacetátem (3x) a organická fáze s nasyceným roztokem chloridu sodného (2x), 1 M roztokem kyseliny sírové, 5% roztokem hydrogenuhličitanu sodného, opět s 1 M roztokem kyseliny sírové a s vodou (2x). Získaná organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařena na rotační vakuové odparce do hustého oleje. Rekrystalizací z diethyletheru byl získán produkt ve formě žluto-hnědé krystalické látky (výtěžek 1,8 g; 23 %). $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.29-1,80 (m, 6 H), 1.46 (s, 9 H), 3.16-3.27 (m, 2 H), 3.87-3.97 (m, 1 H), 4.17-4.33 (m, 3 H), 7.01-7.06 (m, 1 H), 7.27-7.35 (m, 2 H), 7.39-7.48 (m, 3 H), 7.58-7.65 (m, 1 H), 7.69-7.76 (m, 3 H), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 2 H), 8.20 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 1 H), 8.68-8.77 (m, 1 H), 10.72 (s, 1 H), 12.53 (s, 1 H).

4.3 Peptidová syntéza na pevné fázi

Pevná fáze byla nasypána do plastové stříkačky (10, 20 nebo 50 ml) opatřené při ústí kulatou fritou z polymerního materiálu. Do stříkačky bylo nasáto rozpouštědlo určené pro následující syntézy o objemu cca poloviny stříkačky a pevná fáze byla promývána rozpouštědlem za stálého míchání 30 minut. Jako rozpouštědlo byl využíván *N*-methylpyrrolidon nebo *N,N*-dimethylacetamid. Standardně se jako rozpouštědlo pro peptidovou syntézu využívá *N,N*-dimethylformamid, který se však vlivem času rozkládá a poskytuje nežádoucí amin. Tento jev lze obejít použitím výše uvedených rozpouštědel, která rozkladu na amin nepodléhají. Dále byly k pevné fázi přidány 3 ekvivalenty příslušné aminokyseliny, 3 ekvivalenty HBTU, 3 ekvivalenty HOBt a 6 ekvivalentů DIEA. Dávka aminokyseliny, a také směs HBTU a HOBt byla rozpuštěna v rozpouštědle (NMP nebo DMA) za vzniku 0,5 M roztoku. Dávka DIEA byla rozpuštěna v rozpouštědle za vzniku 1 M roztoku. Vzniklé roztoky byly nasáty do stříkačky a za stálého míchání ponechány reagovat 1 hodinu. Poté byla reakční směs ze stříkačky odstraněna. Při syntéze na pevných fázích TentaGel a LCAA CPG byl uvedený postup jedenkrát opakován, coupling byl tedy prováděn dvakrát. V případě pevné fáze CPG beads byl uvedený postup zopakován dvakrát, coupling byl tedy prováděn třikrát. Po poslední reakci byla reakční směs ze stříkačky vystříknuta a nasáváním a protřepáváním byla pevná fáze promyta pětkrát DMF a pětkrát NMP či DMA. Odchránění od chránicí skupiny Fmoc bylo prováděno bazicky pomocí 50% (obj.) roztoku piperidinu v DMF. Do stříkačky s pevnou fází byl nasát roztok (cca jedna polovina objemu stříkačky) a směs byla ponechána za stálého míchání reagovat po dobu 10 minut. Roztok byl ze stříkačky vystříknut a celý postup byl zopakován. Poté byla pevná fáze ve stříkačce promyta pětkrát DMF a pětkrát NMP či DMA. Odchránění chránicí skupiny Boc z kyseliny anthranilové bylo prováděno kyselé pomocí kyseliny trifluoroctové. Do stříkačky s pevnou fází byla nasáta (do cca jedné poloviny objemu stříkačky) směs Fenol/Thioanizol/Voda/TIS/TFA v poměru 0,75/0,5/0,5/0,25/10. Za stálého míchání byla směs ponechána reagovat 2,5 hodiny. Poté byla vystříknuta a pevná fáze byla ve stříkačce řádně promyta pro odstranění všech zbytků TFA, tedy pětkrát DCM, pětkrát DMF, pětkrát směsí DMF/voda (1/1) a pětkrát vodou. Stejným postupem dochází také k odchránění chránících skupin na postranních řetězcích některých aminokyselin, tedy kromě skupiny Boc, také skupin Pbf a tBu.^{19,21}

4.3.1 Kaiser-Test

Po couplingu každé aminokyseliny byl proveden test pro ověření úspěšného navázání aminokyseliny na pevnou fázi, tedy úplného nasycení stávajících volných

aminových skupin novou aminokyselinu, tzv. Kaiser-Test, neboli ninhydrinový test.

Pro Kaiser-Test byl vždy ze stříkačky odebrán špičkou špachtličky malý vzorek pevné fáze do malé vialky a propláchnut 96% roztokem ethanolu. Poté byla přidána jedna kapka roztoku ninhydrinu v ethanolu (0,1 g/ml), jedna kapka roztoku kyanidu draselného v pyridinu (1:50) a jedna kapka roztoku fenolu v ethanolu (4 g/l). Vialka byla umístěna do olejové lázně předehřáté na 120 °C a směs byla ponechána reagovat po dobu 1 minuty. Poté byla vialka vyjmuta a bylo vyhodnoceno zbarvení reakční směsi.⁹

4.4 Proteolytické štěpení enzymy

Enzymatické reakce byly prováděny ve stříkačkách v prostředí pufrů. Štěpení chymotrypsinem a trypsinem probíhalo v prostředí TRIS-pufru (0,1 M Tris, 0,1 M roztok chloridu vápenatého, dotitrováno kyselinou chlorovodíkovou na pH 7,85). Štěpení pepsinem probíhalo v prostředí pufru amonného (0,1 M roztok mravenčanu amonného, dotitrováno kyselinou mravenčí na pH 3,00). Pevná fáze byla nejprve ve stříkačce několikrát promyta příslušným pufrem a poté byla za stálého míchání ponechána s pufrem ekvilibrovat po dobu 30 minut. Malá část vzorku byla odebrána jako reference. Dále byl do stříkačky přidán roztok příslušného enzymu v pufru o koncentraci 1 mg/ml v dávce vůči pevné fázi 10 ml/g, vždy však minimálně 3 ml. Reakční směs byla za stálého míchání a při laboratorní teplotě ponechána 24 hodin. Po skončení enzymatické reakce byla pevná fáze alespoň pětikrát promyta vodou a pufrem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4). Po enzymatické reakci byla pevná fáze pozorována pod mikroskopem při použití ultrafialového světla (excitace 365 nm). Při pozorování byly vždy pořízeny fotografické snímky všech vzorků. Pořízení snímků bylo provedeno také za viditelného světla místo ultrafialového jako důkaz přítomnosti pevné fáze.^{19,20,21}

4.5 MS Analýza

Ze vzorku s peptidovou sekvencí určenou pro analýzu bylo pomocí hodinářské pinzety odebráno pod mikroskopem jedno zrno pevné fáze. Zrno bylo pinzetou přeneseno do PCR trubičky naplněné 10 µl 0,1 M roztoku HCl. Dále bylo přidáno 20 µl roztoku bromkyanu (30 mg/ml) v 0,1 M roztoku HCl. PCR trubička byla obalena alobalem a směs ponechána reagovat po dobu 1 hodiny. Reakční směs byla poté zlyfilizována.²⁶ Takto připravený vzorek byl podroben analýze pomocí LC-MS.^{27,28}

Pro uvolnění peptidové sekvence z pevné fáze pomocí bromkyanu byla využívána i druhá metodika. Odebrané zrno pevné fáze bylo vloženo do PCR trubičky naplněné 10 μ l 70% vodného roztoku TFA. Dále bylo přidáno 20 μ l roztoku bromkyanu (30 mg/ml) v 70% vodném roztoku TFA. Takto připravená PCR trubička byla obalena alobalem a směs ponechána reagovat přes noc, tedy alespoň 12 hodin.²⁹ Tato metodika se však ukázala jako nevhodná pro LC-MS.

5 Závěr

Dle metodiky Fmoc peptidové syntézy na pevné fázi byly prostudovány možnosti přípravy proteázových fluorogenních substrátů na pevných fázích TentaGel a CPG beads. Na pevné fázi TentaGel se nepodařilo vyvinout metodu pro sledování aktivit proteáz. Porézní sklo CPG beads se ukázalo jako ideální pevná fáze pro syntézu fluorogenních peptidových sekvencí. Byly optimalizovány podmínky peptidové syntézy pro jejich efektivní syntézu. Dále byla vyvinuta metoda pro efektivní dekódování sekvencí peptidů z jednotlivých zrn.

Pro peptidové sekvence na pevné fázi CPG beads byl určen optimální poměr D-formy a L-formy aminokyseliny v řetězci pro dostatečný fluorescenční signál i pro možnou detekci a analýzu dané peptidové sekvence. Tento poměr byl určen jako $D:L = 0,2:0,8$.

Výsledek tohoto bakalářského projektu může být využit při přípravě kombinatoriálních peptidových knihoven.

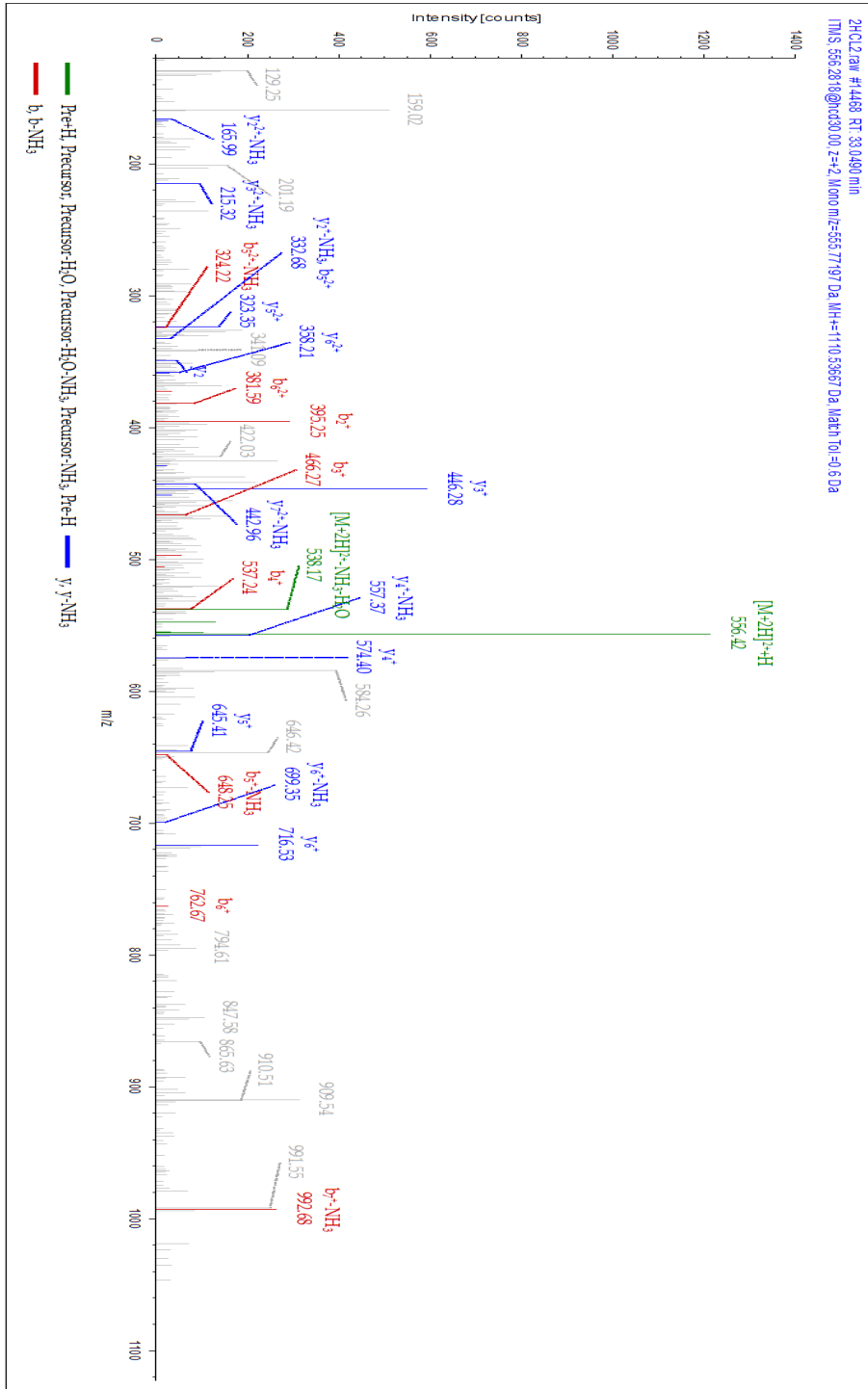
6 Seznam literatury

1. I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert. *Nature Publishing Group*. **2007**, 12.
2. R. B. Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
3. S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth. *Molecules*. **2013**, 18, 4373-4388.
4. <http://www.chem-station.com/en/reactions-2/2014/02/merrifield-solid-phase-peptide-synthesis.html>. [Online] 20. 8. 2016.
5. M. Amblard et al. *Molecular Biotechnology*. **2006**, 33.
6. Ch. D. Chang, J. Meienhofer. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1978**, 11.
7. J. M. Palomo. *Royal Society of Chemistry*. **2014**, 4.
8. Kolektiv autorů. *Biochemie základní kurz*. Praha : Nakladatelství Karolinum, **2009**.
9. M. Friedman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, 385-406.
10. <http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/OCP/ch/chv/oc22/script/SS05/Topic4.pdf>. [Online] 1. 9. 2016
11. A. J. Barrett, J. F. Woessner, N. D. Rawlings. *Handbook of proteolytic enzymes*. **2004**.
12. K. Oda. *Journal of Biochemistry*. **2012**, 151, 13-25.
13. J. Neefjes, N. P. Dantuma. *Nature Reviews*. **2004**, 3, 58-69.
14. J. R. Lakowicz, G. Weber. *Biochemistry*. **1973**, 12 (21), 4161-4170.
15. Cwirla et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1990**, 87, 6378-6382.
16. Olulanu H. Aina et al. *Molecular Pharmaceutics*. **2007**, 4 (5), 631-651.
17. Kit S. Lam, M. Lebl, V. Krchňák. *Chemical Reviews*. **1997**, 411-448.
18. P. Krattiger et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1722-1724.
19. P. M. St. Hilaire, M. Willert, M. A. Juliano, L. Juliano, M. Meldal. *Journal of Combinatorial Chemistry*. **1999**, 509-523.
20. J. Kress, R. Zanaletti, A. Amour, M. Ladlow, J. G. Frey, M. Bradley. *Chem. Eur. J.* **2002**, 3769-3772.
21. Jacob Kofoed, Jean-Louis Reymond. *Chem. Commun.* **2007**, 4453-4455.
22. A. S. Inglis, P. Edman. *Analytical Biochemistry*. **1970**, 37, 73-80.
23. J.C. Sloatweg, R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers. *Journal of Peptide Science*. **2013**, 19, 692-699.

-
24. http://web.expasy.org/peptide_cutter/peptidecutter_enzymes.html. [Online] 20. 8. 2016.
25. Matthias Maier et al. *Macromolecules*. **2011**, *44* (16), 6258-6267.
26. G. J. Juskowiak et al. *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 726-731.
27. B. J. Egner, G. J. Langley, M. Bradley. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2652-2653.
28. B. J. Egner, M. Cardno, M. Bradley. *J. Chem. Soc.* **1995**, 2163-2164.
29. Phillip A. Lichtor, Scott J. Miller. *ACS Comb. Sci.* **2011**, *13*, 321-326.

7 Přílohy

Příloha č. 1: Fragmentační spektrum peptidu 6 ve vzorku 2 ($D:L = 0,2:0,8$)



Příloha č. 2: Fragmentační spektrum peptidu 6 ve vzorku 6 ($D:L = 1:0$)

