UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. lékařská fakulta

Dizertační práce

SEPARACE ŽALUDEČNÍCH ASPARTÁTOVÝCH PROTEAS POMOCÍ AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

Mgr. Jana Frýdlová

Školitel: Ing. Zdenka Kučerová, CSc.

Praha 2009

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

Praha 2009 *Jana Frýdlová*

Na tomto místě chci poděkovat Ing. Zdence Kučerové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a pomoc, kterou mi v průběhu mé práce poskytovala.

Dále děkuji Prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. z Přírodovědecké fakulty UK za trvalý zájem o tuto práci, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala.

Můj dík patří také kolegům z Ústavu patologické fyziologie a CEH 1. LF UK, zejména Mgr. Lence Novotné, za vytvoření přátelského pracovního prostředí a ochotu vždy pomoci. Dále děkuji Mgr. Petru Přikrylovi, PhD. za konzultace a rady týkající se práce s MALDI-TOF/TOF MS.

V neposlední řadě děkuji rodičům a celé své rodině za podporu během mého studia.

Na závěr děkuji Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční prostředky poskytnuté pro vypracování této práce (granty MSM 111100003, MSM 0021620806 a LC 06044) a GA ČR (grant 203/05/0241).

Obsah

Seznam použitých zkratek **7**

Úvod **8**

1. Teoretický úvod **9**

1.1. Aspartátové proteasy **9**

1.1.1. Nomenklatura žaludečních aspartátových proteas 9

1.1.2. Syntéza a sekrece pepsinogenů v lidském těle 10

1.1.3. Polymorfizmus lidských pepsinogenů 11

1.1.4. Aktivace pepsinogenů na pepsiny 11

1.1.5. Struktura pepsinogenů a pepsinů 12

1.1.6. Fyzikálně-chemické vlastnosti pepsinů a pepsinogenů 14

1.1.7. Proteolytická aktivita pepsinů 15

1.1.8. Inhibitory pepsinů 17

1.2. Hladiny pepsinogenů v lidském těle **18**

1.2.1. Hladiny pepsinogenů ve zdravém lidském těle 18

1.2.2. Patologické změny hladin pepsinogenů v lidském těle 18

1.2.2.1. Změny hladin pepsinogenů při infekci bakterií *Helicobacter pylori* 19

1.2.2.2. Změny hladin pepsinogenů při gastritidě 19

1.2.2.3. Změny hladin pepsinogenů při peptickém vředu a při rakovině žaludku 20

1.2.3. Stanovení pepsinogenů v klinické praxi 21

1.3. Metody izolace a separace pepsinogenů a pepsinů **21**

1.3.1. Elektroforetické metody 21

1.3.1.1. Nativní elektroforéza 21

1.3.1.2. Imunoelektroforéza 22

1.3.1.3. Izoelektrická fokusace 22

1.3.2. Chromatografické metody 22

1.3.2.1. Iontově-výměnná chromatografie 23

1.3.2.2. Afinitní chromatografie 23

1.3.2.2.1. Imunoafinitní chromatografie 24

1.3.2.2.2. Afinitní chromatografie využívající jako ligand inhibitor 24

1.3.2.2.3. Afinitní chromatografie využívající jako ligand derivát substrátu 24

2. Cíl práce 26

3. Experimentální část 27

3.1. Použité chemikálie 27

3.2. Přístroje 27

3.3. Příprava afinitních sorbentů 28

3.3.1. Aktivace Sepharosy 4B divinylsulfonem 28

3.3.2. Vazba ethylendiaminového oddalovacího můstku nebo L-tyrosinu 28

3.3.3. Vazba N-acetyl-L-fenylalaninu nebo Boc-3,5-dijod-L-tyrosinu 29

3.3.4. Odstranění chránící skupiny z Boc-3,5-dijod-L-tyrosinu 29

3.3.5. Jodace Sepharosy 4B s imobilizovaným L-tyrosinem 29

3.4. Příprava magnetických částic s imobilizovanou kyselou fosfatasou z brambor 29

3.5. Příprava vzorků pro afinitní chromatografii 30

3.5.1. Potkaní a lidské pepsiny a pepsinogeny 30

3.5.2. Inhibice prasečího pepsinu A 31

3.5.3. Defosforylace prasečího pepsinu A 31

3.6. Afinitní chromatografie 31

3.6.1. Obecný postup afinitní chromatografie 31

3.6.2. Roztoky použité při afinitní chromatografii pepsinů 32

3.6.3. Roztoky použité při afinitní chromatografii pepsinogenů 33

3.6.4. Stanovení kapacity afinitních sorbentů pro prasečí pepsin A 33

3.7. Štěpení proteinů α-chymotrypsinem 34

3.8. Odsolení peptidů na C18 fázi naplněné ve špičkách (PerfectPure C18 Tip) 34

3.9. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a MALDI-TOF/TOF 34

3.10. Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza lidských pepsinogenů 35

3.11. Inkubace lidských pepsinogenů s monoklonálními protilátkami 36

3.12. Analytické metody 37

3.12.1. Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA 37

3.12.2. Stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského 37
3.12.3. Stanovení množství fosforu 38

4. Výsledky a diskuze 39

4.1. Příprava afinitních sorbentů 39

4.2. Afinitní chromatografie prasečího pepsinu A 41
4.2.1. Optimalizace podmínek chromatografie prasečího pepsinu A na afinitních sorbentech 41
4.2.1.1. Ligand imobilizovaný na matrici přes svou aminoskupinu; optimalizace chromatografických podmínek pro prasečí pepsin A na jodované L-tyrosin-Sepharose 41
4.2.1.2. Ligand imobilizovaný na matrici přes svou karboxylovou skupinu 43
4.2.1.2.1. Optimalizace chromatografických podmínek pro prasečí pepsin A na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharose 43
4.2.1.2.2. Optimalizace chromatografických podmínek pro prasečí pepsin A na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose 45
4.2.2. Nespecifické sorpce na afinitních sorbentech 46
4.2.3. Studium interakce prasečího pepsinu A s afinitními sorbenty 49
4.2.3.1. Úloha aktivního místa při interakci enzymu se sorbentem 49
4.2.3.2. Vliv přítomnosti fosfátové skupiny v molekule prasečího pepsinu A na jeho interakci s N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosou 52

4.3. Separace pepsinu A a pepsinu C 53
4.3.1. Separace lidských pepsinů na jodované L-tyrosin-Sepharose 53
4.3.2. Separace lidských pepsinů na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharose 55
4.3.3. Izolace a separace pepsinu A a pepsinu C na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose 56
4.3.3.1. Separace prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C 56
4.3.3.2. Separace a izolace lidského pepsinu A a pepsinu C 57

4.4. Separace lidských pepsinogenů na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose 59

5. Závěr 64

Seznam použité literatury 66

Seznam použitých zkratek

BCA	bicinchoninová kyselina
Boc	N-*terc*-butyloxykarbonyl
BSA	hovězí sérový albumin
DEAE	diethylaminoethyl
H. pylori	*Helicobacter pylori*
MALDI	„matrix assisted laser desorption ionization“
MALDI-TOF	„matrix assisted laser desorption ionization-time of flight“
MALDI-TOF/TOF MS	„matrix assisted laser desorption ionization-time of flight/time of flight mass spectrometry“
MES	2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometr
PG A	pepsinogen A
PG C	pepsinogen C
PTFE	polytetrafluorethylen
SMP	„slow moving protease“

Úvod

Lidská žaludeční šťáva obsahuje zejména pepsin A a pepsin C. Oba tyto trávicí enzymy jsou produkovány v žaludeční sliznici jako inaktivní pepsinogeny (pepsinogen A a pepsinogen C), které se liší svými fyzikálně-chemickými a imunologickými vlastnostmi. Oba pepsinogeny jsou tvořeny několika izozymogeny, které se podařilo separovat a identifikovat pomocí nativní elektroforézy. K aktivaci pepsinogenů na příslušné pepsiny dochází v kyselém prostředí žaludku.

Hladiny pepsinogenů v krevním séru odrážejí morfologický a funkční stav žaludeční sliznice. Již mnoho let je pozorována souvislost mezi hladinami lidských pepsinogenů a některými žaludečními onemocněními. Z diagnostického hlediska je zajímavý především vzájemný poměr pepsinogenu A k pepsinogenu C nejen v žaludeční sliznici, ale také v krevním séru. Pacienti s rakovinou žaludku nebo s atrofickou gastritidou mají oproti zdravým jedincům významně snížený poměr pepsinogenu A k pepsinogenu C v krevním séru. Během žaludečních onemocnění dochází také ke změnám zastoupení jednotlivých izozymogenů pepsinogenů. Určení těchto změn by proto mohlo být významné pro včasnou diagnostiku zmíněných závažných onemocnění.

Předkládaná dizertační práce je součástí projektu, který se zabývá zejména vývojem metod pro zjištění změny exprese aspartátových proteas následkem závažných žaludečních onemocnění. Jedním z cílů tohoto projektu je i vypracování metody pro separaci pepsinogenu A a pepsinogenu C a jejich aktivních forem, která by byla vhodná pro sledování jejich změn během zmíněných onemocnění. Předkládaná dizertační práce se konkrétně zabývá přípravou afinitních sorbentů a hledáním nejvhodnějších podmínek pro izolaci a separaci pepsinů, případně pepsinogenů.

1. Teoretický úvod

1.1. Aspartátové proteasy

Aspartátové proteasy jsou velmi rozšířené proteolytické enzymy [1], které se účastní různých procesů. Podílejí se na hydrolýze peptidových vazeb v molekule proteinů a peptidů. Dříve byly tyto enzymy kvůli své aktivitě při pH 1,5 až 5,0 označovány jako kyselé proteasy [2]. Dnes je však pro ně používán název apartátové proteasy zavedený IUB, který vychází z reakčního mechanizmu. Aktivní místo těchto proteas obsahuje dva zbytky asparagové kyseliny. Aspartátové proteasy se řadí do třídy hydrolas a podtřídy C-N hydrolas.

Aspartátové proteasy lze nalézt nejen v těle živočichů, ale i např. v rostlinách, mikroorganizmech a ve viru HIV [1]. Lidské tkáně produkují celou řadu těchto proteas, např. pepsin A (EC 3.4.23.1), pepsin C (EC 3.4.23.3), chymosin (EC 3.4.23.4), kathepsin D (EC 3.4.23.5), renin (EC 3.4.23.15) a kathepsin E (EC 3.4.23.34).

1.1.1. Nomenklatura žaludečních aspartátových proteas

Dosud nebyla úplně sjednocena nomenklatura žaludečních aspartátových proteas (viz tab. 1.1). Zpočátku bylo názvosloví těchto proteas velmi chaotické, neboť většina autorů zabývajících se studiem těchto enzymů ve svých publikacích používala svou vlastní terminologii, ve které byly jednotlivé zymogeny/aktivní enzymy očíslovány na základě jejich chromatografického či elektroforetického chování [2 - 4, 6]. Nomenklatura dnes používaná v biochemické literatuře je často odlišná od klinické a lékařské. Biochemici preferují triviální názvy enzymů a nomenklaturu enzymů navrženou IUB, která je založena na reakčním mechanizmu. V klinické a lékařské literatuře je dávána přednost rozdělení lidských pepsinogenů na základě imunologických vlastností do I. a II. skupiny [4].

Tab. 1.1 Přehled lidských žaludečních aspartátových proteas používaných v této práci [2 - 5]

Kódové číslo	Aktivní forma	Zymogen
EC 3.4.23.1	pepsin A (pepsin, pepsin I)*	pepsinogen A (PG A) (pepsinogen, pepsinogen I)*
EC 3.4.23.3	pepsin C (gastriksin, pepsin II)*	pepsinogen C (PG C) (progastriksin, pepsinogen II)*

* další používaná nomenklatura

1.1.2. Syntéza a sekrece pepsinogenů v lidském těle

Pepsiny jsou produkovány v inaktivní formě jako prepepsinogeny, které jsou složeny ze signálního peptidu, aktivačního peptidu a aktivní enzymové části [1, 4]. Signální peptid je odštěpen při vstupu do endoplazmatického retikula. Po průchodu pepsinogenů Golgiho aparátem a po oddělení lysozomálních enzymů jsou pepsinogeny skladovány v sekrečních granulích. Pomocí stimulačních signálů jsou pepsinogeny vylučovány ze sekrečních granulí procesem exocytózy [1]. Na iniciaci tohoto procesu se podílí celá řada stimulačních signálů např. acetylcholin, gastrin, pentagastrin, sekretin a bombesin. Inhibici sekrece pepsinogenů způsobuje např. prostaglandin, somatostatin a glukagon [1, 2].

V lidském organizmu je několik míst výskytu PG A a PG C (tab. 1.2) [1, 2]. Oba pepsinogeny jsou produkovány hlavními buňkami těla a fundu žaludku. PG C je navíc produkován v Brunnerových žlázách v proximálním duodenu, v pylorických žlázách v antru a dále v epitelových buňkách prostaty a v semenných váčcích, ze kterých se PG C dostává do semenné plazmy [1, 2, 7]. PG A a PG C se dostávají z místa vzniku do krve [1, 2]. Za klíčový orgán pro eliminaci pepsinogenů z krve jsou považovány ledviny [2, 8]. PG C je u zdravých jedinců kompletně reabsorbován a metabolizován ledvinami, zatímco PG A jen ze dvou třetin, a proto je v moči detegován pouze PG A [2].

Tab. 1.2 Vybraná místa výskytu pepsinogenu A a pepsinogenu C ve zdravém lidském těle [1, 2]
+ přítomnost; – absence

Původ	PG A	PG C
Tělo žaludku	+	+
Antrum žaludku	–	+
Proximální duodenum	–	+
Prostata	–	+
Semenné váčky	–	+
Krev	+	+
Moč	+	–/(+)*
Semenná plazma	–	+

* Pouze v některých případech zdravých lidí bylo v moči stanoveno i stopové množství PG C.

1.1.3. Polymorfizmus lidských pepsinogenů

Lidský PG A i PG C se skládá z několika izozymogenů, které se liší v celkovém molekulovém náboji, molekulové hmotnosti nebo v obojím. Samloff [3] v roce 1969 pomocí elektroforézy na agarovém gelu rozdělil pepsinogeny z extraktu lidské žaludeční sliznice na osm proteolyticky aktivních proužků, které označil podle klesající anodické mobility jako Pg 1 až Pg 7 a poslední nejpomalejší pás jako SMP („slow moving protease“, později označována jako kathepsin E [1]). Dále zjistil, že Pg 1 a SMP vykazují největší molekulovou hmotnost a že jsou odpovědné za méně než 5% z celkové proteolytické aktivity žaludečního slizničního extraktu. Pepsinogen A je složen z pěti frakcí Pg 1 až Pg 5 a pepsinogen C z Pg 6 až Pg 7.

Izozymogeny Pg 3, Pg 4 a Pg 5 jsou produkty tří různých genů, které jsou lokalizovány na chromozomu 11. Izozymogen Pg 7 je kódován jedním genem na chromozomu 6. Ostatní izozymogeny vznikají posttranslačními modifikacemi (Pg 2 z Pg 3 a Pg 6 z Pg 7) [9]. Pg 3 a Pg 5 se liší pouze jednou aminokyselinou v aktivačním peptidu [10]. Při aktivaci jsou aktivační peptidy odštěpeny a oba izozymogeny poskytují pouze jediný pepsin. Původ Pg 1 nebyl dosud objasněn [9]. Fenotypové variace jsou výsledkem několika haplotypů obsahujících geny v různé kombinaci nebo v různém počtu kopií či obojí [1, 9].

1.1.4. Aktivace pepsinogenů na pepsiny

Pepsiny jsou syntetizovány ve formě inaktivních pepsinogenů. Po sekreci těchto zymogenů do kyselého prostředí žaludku jsou vlivem nízkého pH a autokatalýzy konvertovány na aktivní enzymy [1]. Aktivace pepsinogenů probíhá při hodnotách pH pod 5,0. Během tohoto děje dochází k protonaci kyselých aminokyselinových zbytků v aktivní části enzymu, a tím k zeslabení elektrostatických interakcí mezi aktivačním peptidem a aktivním enzymem. Aktivační peptid podstupuje konformační změny, a tím iniciuje aktivační reakci. Výše zmíněnými procesy dochází k odkrytí aktivního místa a následně k autokatalytickému odštěpení aktivačního peptidu [4, 11]. Rychlost aktivační reakce vzrůstá se snižující se hodnotou pH, ale zanedbatelná aktivace probíhá i při hodnotách pH nad 5,0 (cit. [11]).

Aktivace pepsinogenu na pepsin vyžaduje proteolytické odštěpení aktivačního peptidu z N-koncové části polypeptidového řetězce zymogenu a disociaci tohoto odštěpeného aktivačního peptidu od aktivní enzymové části. Odštěpení aktivačního peptidu může probíhat přímo, nebo vícekrokově [4, 11]. Přímá cesta zahrnuje proteolytické rozštěpení peptidové vazby mezi C-koncem aktivačního peptidu a N-koncem pepsinové části (např. u opičího PG A,

kuřecího PG A). Vícekroková cesta zahrnuje proteolytické rozštěpení peptidové vazby uvnitř aktivačního peptidu na jednom či více místech s následným rozštěpením vazby mezi zbylou částí aktivačního peptidu a pepsinovou částí (např. u opičího PG C, hovězího PG A). Aktivace lidského PG A a PG C probíhá přes jeden meziprodukt ve dvou krocích. V některých případech se při uvolnění aktivačního peptidu uplatňují oba výše zmíněné způsoby. Například u prasečího PG A se při pH 2,0 uplatňuje přímý i dvoukrokový způsob. Který z těchto způsobů je preferován, závisí na koncentraci prasečího PG A [11]. Při proteolytickém odštěpení aktivačního peptidu se uplatňují intramolekulární i intermolekulární reakce [1, 4, 11].

1.1.5. Struktura pepsinogenů a pepsinů

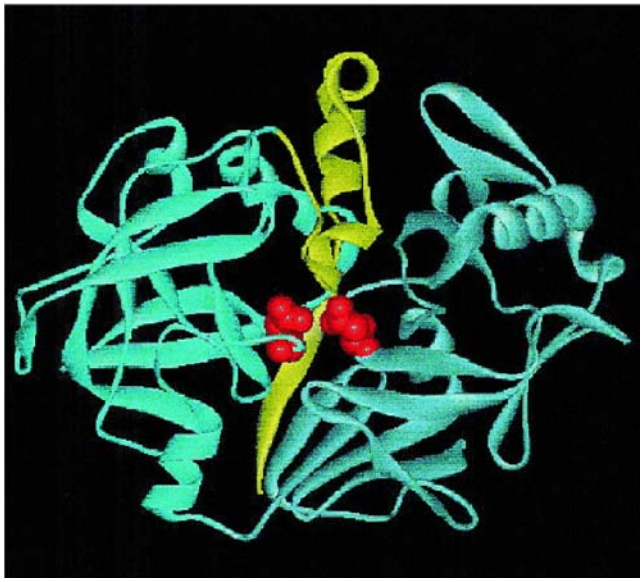
Dosud byla popsána kompletní primární struktura u více než padesáti pepsinogenů. V aminokyselinové sekvenci vyvozené z nukleotidové sekvence cDNA nebo genomické DNA byly identifikovány tři části: signální peptid (prepeptid), aktivační peptid (propeptid) a aktivní enzymová část (pepsinová část). Signální peptid je vysoce hydrofobní a je odstraněn již během syntézy pepsinogenu. Nativní pepsinogen je tvořen pouze pepsinovou částí a aktivačním peptidem, který je uvolněn během aktivace pepsinogenu na pepsin. Například u prasečího PG A je signální peptid tvořen 15 aminokyselinovými zbytky, aktivační peptid tvoří 44 aminokyselinových zbytků a pepsinovou část 326 aminokyselinových zbytků [4]. Žaludeční zymogeny obecně tvoří jednoduchý polypeptidový řetězec složený přibližně z 370 aminokyselinových zbytků (tab. 1.3). V N-koncové části polypeptidového řetězce pepsinogenu je aktivační peptid, který má u stejného typu pepsinogenů různou délku a obsahuje různé množství bazických aminokyselinových zbytků v závislosti na živočišném druhu (tab. 1.3) [11].

Prasečí pepsin A je tvořen jednoduchým polypeptidovým řetězcem, ve kterém jsou tři intramolekulární disulfidické můstky. Největší zastoupení v řetězci mají zbytky serinu, glycinu a asparagové kyseliny. Z celkového počtu aminokyselinových zbytků je pouze jeden lysinový, jeden histidinový a dva argininové [12]. U prasečího pepsinu A byla v jeho polypeptidovém řetězci prokázána fosforylace serinového zbytku v pozici 68 (cit. [12, 13]). U některých izoforem lidského PG A byla nalezena jedna fosfátová skupina vázaná na serinový zbytek, jehož pozice v polypeptidovém řetězci nebyla dosud určena [14]. Naproti tomu u potkaního [15] a lidského [14] PG C nebyla fosfátová skupina zjištěna.

Tab. 1.3 Počet aminokyselinových zbytků v polypeptidových řetězcích pepsinogenů používaných v této práci [11]

Pepsinogen	Celkový počet aminokyselinových zbytků v řetězci	Počet aminokyselinových zbytků v aktivačním peptidu	Počet bazických zbytků v aktivačním peptidu
Prasečí PG A	370	44	13
Lidský PG A	373	47	13
Potkaní PG C	376	46	12
Lidský PG C	372	43	12

Terciární struktura je známá pro prasečí pepsin A, prasečí a lidský PG A a lidský PG C [4]. Lidský PG A a prasečí PG A jsou si podobnější než lidský PG A a lidský PG C [11]. Aktivní enzymovou část zymogenu tvoří dvě téměř shodné domény, které jsou k sobě zrcadlově obrácené. Obě domény se skládají převážně ze struktury β-skládaného listu. V rozsedlině mezi těmito doménami se nachází štěrbina, ve které se vyskytují dva zbytky asparagové kyseliny. U prasečího pepsinu A se tyto zbytky nacházejí v polypeptidovém řetězci v pozici 32 a 215. Zmíněná štěrbina je u aktivního pepsinu volně přístupná pro substrát. Naproti tomu pepsinogeny mají v neutrálním pH tuto štěrbinu překrytu aktivačním peptidem (obr. 1.1), čímž je zamezeno přístupu substrátu do aktivního místa. Aktivační peptid je v aktivním místě vázán hlavně elektrostatickými silami, ačkoli vodíkové a hydrofobní interakce hrají také svou roli. Aktivační peptid prasečího PG A a lidského PG C je na N-konci tvořen jednou β-strukturou, která je následována třemi krátkými helikálními oblastmi. C-konec aktivačního peptidu vykazuje velkou konformační ohebnost [11].



Obr. 1.1 Terciární struktura prasečího pepsinogenu A [11]
modře – aktivní enzymová část, červeně – 2 zbytky asparagové kyseliny v aktivním místě, žlutě – aktivační peptid; terciární struktura lidského pepsinogenu C je podobná.

1.1.6. Fyzikálně-chemické vlastnosti pepsinů a pepsinogenů

Pepsiny jsou syntetizovány v inaktivní formě jako příslušné pepsinogeny. Ke vzniku pepsinu z pepsinogenu dochází při pH nižším než 5,0 odštěpením aktivačního peptidu [11]. Pepsinogeny jsou stabilní v oblasti pH 5,0 až 8,5. Při pH vyšším než 8,5 dochází k jejich denaturaci [16].

Aspartátové proteasy se vyznačují neobvykle nízkým pH optimem proteolytické aktivity. Lidský pepsin A vykazuje nejvyšší proteolytickou aktivitu při pH 2,0 a lidský pepsin C při pH 2,3 (stanoveno za použití hemoglobinu jako substrátu). Při zvýšení pH nad 3 dochází u obou pepsinů k rychlé ztrátě proteolytické aktivity [10]. V rozmezí pH 5,0 až 6,5 již prakticky nevykazují proteolytickou aktivitu, ale zpětnou úpravou na pH 2,0 lze jejich aktivitu opět obnovit [17].

Oba lidské pepsiny jsou stabilní v oblasti pH 1,0 až 6,5 (cit. [17]). Při pH 7,0 pepsin A rychle ztrácí aktivitu, zatímco pepsin C je při tomto pH ještě relativně stabilní [10]. Při pH vyšším než 7,5 jsou oba pepsiny ireverzibilně inaktivovány [17]. Denaturace pepsinů vysokým pH má fyziologický význam, protože zabraňuje nežádoucí proteolytické aktivitě pepsinu po opuštění kyselého prostředí žaludku [1].

Pepsin A je teplotně stabilnější než pepsin C [10]. Oba pepsiny jsou stabilní do teploty 45°C. Při vyšších teplotách nastává jejich postupná denaturace. Při teplotě 65°C jsou oba pepsiny prakticky zcela denaturovány.

V tabulce 1.4 jsou uvedeny relativní molekulové hmotnosti pepsinů a pepsinogenů, které byly používány v této práci.

Tab. 1.4 Relativní molekulové hmotnosti pepsinů a pepsinogenů používaných v této práci

Protein	M_r*
Prasečí PG A	39 533
Lidský PG A	40 306
Prasečí pepsin A	34 510
Lidský pepsin A	34 628
Potkaní PG C	41 021
Lidský PG C	40 568
Potkaní pepsin C	35 538
Lidský pepsin C	35 461

* Relativní molekulová hmotnost vypočítaná z aminokyselinové sekvence příslušného proteinu (databáze Expasy, SIB, Švýcarsko).

1.1.7. Proteolytická aktivita pepsinů

Pepsiny patří mezi endoproteasy, které hydrolyzují proteiny různou rychlostí v závislosti na substrátu [4, 10, 18]. Tyto enzymy vykazují maximální aktivitu v kyselé oblasti pH (tab. 1.5). K účinnější hydrolýze proteinů těmito enzymy přispívá také denaturace štěpených proteinů způsobená kyselým pH v žaludku [1, 4].

Aktivní místo prasečího pepsinu A obsahující v aminokyselinovém řetězci dva zbytky asparagové kyseliny v pozici 32 a 215 je obklopeno sedmi aminokyselinovými zbytky, které tvoří vazebné místo pro substrát (viz obr. 1.2) [4, 21]. Ve vazebném místě pepsinu dochází k interakcím, které slouží k orientaci substrátu tak, aby byla štěpená vazba blízko k Asp-32 a Asp-215. Karboxylové skupiny těchto dvou aspartátových zbytků jsou vzájemně umístěny v takové vzdálenosti, která jim umožňuje společně sdílet proton [4]. Vzhledem k tomu, že aspartátové proteasy mají shodné uspořádání aspartátových zbytků, je pravděpodobné, že všechny enzymy této skupiny mají stejný katalytický mechanizmus [1, 22].

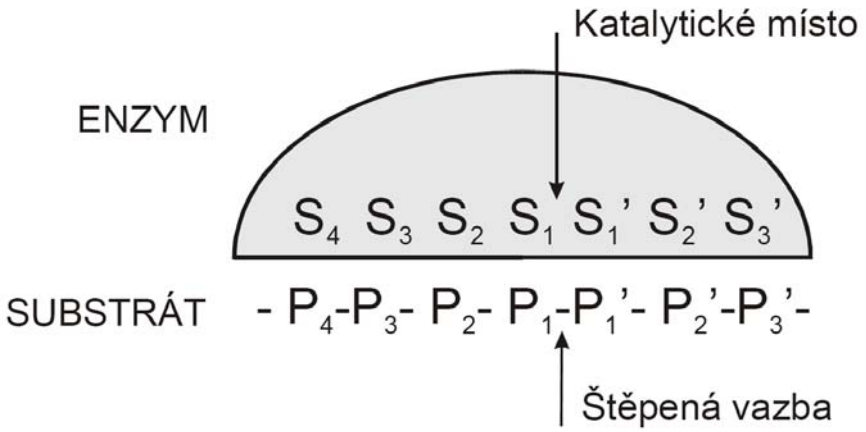
Tab. 1.5 Preferované vazby štěpení a pH optimum pepsinů různého původu

Pepsin	Preferenčně štěpené vazby	pH optimum*
Lidský pepsin A	Yaa -|-Yaa** (cit. [1, 4, 21, 22])	2,0 (cit. [10])
Prasečí pepsin A		2,2 (cit. [19])
Lidský pepsin C	Tyr-|-Xaa*** (cit. [4])	2,3 (cit. [10])
Potkaní pepsin C		2,0 (cit. [20])

* stanoveno za použití hemoglobinu jako substrátu

** Yaa – zbytek aromatické nebo hydrofobní aminokyseliny

*** Xaa – jakýkoli aminokyselinový zbytek



Obr. 1.2 Schéma interakce substrátu s aktivním místem enzymu [21]
P_4 až P_3' – aminokyselinové zbytky substrátu, které interagují s aktivním místem enzymu;
S_4 až S_3' – aminokyselinové zbytky aktivního místa enzymu, které interagují se substrátem.

Odlišnosti ve vazebném místě enzymů mají vliv na vazbu substrátu, a tím na specifitu jednotlivých enzymů. Specifita je charakterizována nejen aminokyselinovými zbytky v sousedství štěpené peptidové vazby ale i aminokyselinovými zbytky, které se účastní interakce aktivního místa enzymu se substrátem [1]. K popisu aminokyselinových zbytků substrátu a aminokyselinových zbytků aktivního místa enzymu, které interagují se substrátem, jsou používána písmena P (P´), respektive S (S´) s indexem n (obr. 1.2) [21]. P_n označuje pozici „n-tého“ aminokyselinového zbytku v N-koncové části substrátu, která je počítána od štěpené vazby, zatímco P_n' je pozice v C-koncové části substrátu také počítána od štěpené vazby.

Zbytky aminokyselin aktivního místa enzymu, které interagují se substrátem, jsou značeny obdobně S_n a $S_n´$. Obecně aspartátové proteasy preferují hydrofobní zbytky v pozici P_1-$P_1´$ (cit. [1]).

Při studiu specifity a mechanizmu proteolytické aktivity pepsinů různého původu byly ve většině studií přednostně využívány syntetické substráty různého složení a délky [23 - 26] a jen výjimečně byly použity pro studium specifity polypeptidové nebo proteinové substráty [21]. Bylo zjištěno, že pepsin preferuje aromatické nebo hydrofobní zbytky v pozici P_1 a $P_1´$ (tab. 1.5). Prasečí pepsin A s vysokou pravděpodobností štěpí následující vazby: Phe-Tyr, Phe-His, Phe-Ala, Met-Met, Met-His, Trp-Glu, Trp-Ile, Tyr-Met [21]. Štěpení je navíc pozitivně či negativně ovlivňováno aminokyselinovými zbytky v jiných pozicích. Například prolin ovlivňuje štěpení vazby při svém umístění v pozici P_3 a P_4 pozitivně, zatímco v ostatních místech (P_2 až $P_3´$) negativně [21]. Lidský pepsin A a pepsin C mají sice obdobnou substrátovou specifitu, ale pepsin C preferuje tyrosinový zbytek v pozici P_1 a tedy preferuje štěpení vazeb Tyr-Xaa (jakýkoli aminokyselinový zbytek) [4].

1.1.8. Inhibitory pepsinů

Aspartátové proteasy jsou inhibovány s různou účinností následujícími třemi specifickými inhibitory: pepstatinem A, diazoacetylnorleucin methylesterem (DAN) a 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxy)propanem (EPNP) [1]. Syntetický inhibitor DAN se kovalentně váže na aspartátový zbytek v aktivním místě v pozici 215 aminokyselinového řetězce [1]. Inhibice lidského pepsinu A tímto inhibitorem probíhá v přítomnosti měďnatých iontů okamžitě, ale lidský pepsin C není za stejných podmínek významně inhibován [10]. EPNP se kovalentně váže na aspartátový zbytek v aktivním místě v pozici 32 aminokyselinového řetězce [1]. Navázání dvou molekul EPNP na jednu molekulu enzymu způsobí kompletní inaktivaci enzymu [27]. EPNP inaktivuje pepsiny s různou účinností [10]. Inhibice těmito syntetickými substráty probíhá ireverzibilně [1].

Pepstatin A, izolovaný z filtrátu kultur rodu *Streptomyces*, je přirozeným specifickým inhibitorem kyselých proteas [28] a má následující složení: isovaleryl-L-valyl-L-valyl-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoyl-L-alanyl-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanová kyselina [29]. Uvedený inhibitor je málo rozpustný ve vodných roztocích a má velmi malou toxicitu, což bylo prokázáno např. u potkanů a opic [30]. Tento inhibitor inhibuje např. lidský pepsin A i lidský pepsin C [10, 28, 31], prasečí pepsin A [28, 31], renin, kathepsin D [32], ale neinhibuje neaspartátové proteasy např. trypsin, α-chymotrypsin, plasmin, kalikrein, papain [30].

Pepstatin A se pevně váže na pepsin prostřednictvím velkého počtu nekovalentních interakcí s aktivním místem enzymu [33, 34], čímž zamezuje přístupu substrátu do aktivního místa, a tím i jeho štěpení [1]. Tento inhibitor neinteraguje s pepsinogeny [33, 35]. Pepstatin A je obecně účinným inhibitorem aspartátových proteas, ale jednotlivé enzymy se liší svou afinitou k tomuto inhibitoru [10, 28]. Lidský pepsin A je téměř kompletně inhibován ekvimolárním množstvím pepstatinu A, zatímco pepsin C vyžaduje deseti až dvacetinásobný molární nadbytek pepstatinu A [10]. Při orálním podání kapslí obsahujících pepstatin A pacientům s žaludečními vředy byla hodinu po podání tohoto inhibitoru zredukována celková aktivita pepsinů v jejich žaludeční šťávě na méně než 10% původní aktivity [28]. Inhibice pepsinů pepstatinem A je relativně nezávislá na pH v oblasti 1,5 až 3,8. Při vyšším pH se ale účinnost inhibice snižuje [35].

1.2. Hladiny pepsinogenů v lidském těle

1.2.1. Hladiny pepsinogenů ve zdravém lidském těle

Metabolizmus pepsinogenů je známý jen částečně. PG A a PG C vstupují do krve mechanizmem, který není dosud zcela objasněn [9, 36]. V krvi jsou oba pepsinogeny neaktivní a nemají žádnou známou funkci [9]. Hodnoty hladin obou pepsinogenů v krevním séru na lačno souvisí s rychlostí jejich syntézy a s množstvím buněk v žaludeční sliznici [9]. Ze sérových hladin pepsinogenů je možné usuzovat na abnormality ve struktuře a funkci žaludeční sliznice [37 - 48]. U zdravých jedinců je vždy hladina PG A vyšší než PG C [38, 39, 49, 50]. Hladina PG A se u zdravých osob pohybuje cca od 13 do 175 μg/l a pro PG C od 1,1 do 40,0 μg/l (cit. [38, 39, 41, 42, 49, 50]).

Zdraví jedinci mají v krevním séru konstantní hladinu PG A a PG C. Výše těchto hladin je však individuální a může vykazovat významné rozdíly i mezi jedinci v rámci jedné skupiny [2]. Rozdíl v hladinách mezi jednotlivci souvisí např. s věkem [38, 39, 51], pohlavím [39, 51], národností [2, 38, 39, 40, 41], životosprávou i dietou [2]. Při dlouhodobém kouření se zvyšuje hladina PG A v séru [52, 53]. Z diagnostického hlediska je proto považováno za významnější udávat hodnotu poměru PG A/PG C, než absolutní hodnoty hladin jednotlivých pepsinogenů v séru [39, 41, 45].

1.2.2. Patologické změny hladin pepsinogenů v lidském těle

Již mnoho let je studována souvislost mezi změnou exprese a produkce pepsinogenů a různými patofyziologickými stavy organizmu. Např. u pacientů s rakovinou prsu [54 - 56],

karcinomem ovarií [57] nebo karcinomem prostaty [58, 59] byla prokázána produkce PG C v zasažených tkáních či v jejich částech, kde není za normálního fyziologického stavu tento pepsinogen produkován. Produkce PG C v těchto případech je pravděpodobně důsledkem maligních transformací.

Velká pozornost je zaměřována zejména na patologické změny žaludeční sliznice a s ní související změny hladin PG A a PG C v žaludeční sliznici a v krevním séru. Stále jsou hledány biomarkery pro diagnostiku žaludečních onemocnění (např. gastritidy a rakoviny žaludku). Jedním z nich je i stanovení hladin PG A a PG C a zejména poměru PG A/PG C v séru.

1.2.2.1. Změny hladin pepsinogenů při infekci bakterií *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) je spirální bakterie s bičíkem, která má významnou roli ve vzniku některých žaludečních onemocnění (např. gastritidy, peptického vředu, některých nádorů žaludku) [60]. *H. pylori* pozitivní jedinci mají na rozdíl od *H. pylori* negativních významně vyšší hladiny PG A i PG C a nižší poměr PG A/PG C [39 - 41]. Po eradikaci *H. pylori* dochází k významnému snížení hladin obou pepsinogenů a k významnému vzrůstu poměru PG A/PG C [40, 43]. Hodnoty hladin obou pepsinogenů a jejich vzájemný poměr se pak neliší od hodnot *H. pylori* negativních jedinců [40].

1.2.2.2. Změny hladin pepsinogenů při gastritidě

Rozlišovány jsou dva základní typy gastritidy: akutní a chronická. Akutní gastritida většinou vzniká jako součást bakteriální nebo virové infekce, ale v etiologii se uplatňují také např. nesteroidní protizánětlivé léky, alkohol či kouření [60]. Během akutní superficiální gastritidy postihující sliznici fundu dochází ke zvýšení hladin PG A i PG C v séru, což je pravděpodobně způsobeno zvýšeným uvolňováním obou pepsinogenů do krevního oběhu jako odpověď na zánět supraglandulární části sliznice [9].

Chronickou gastritidu lze definovat jako přítomnost chronických zánětlivých změn sliznice, které mohou případně vést k atrofii až metaplazii sliznice. Z morfologického hlediska se rozlišuje několik typů: superficiální nebo hluboká gastritida, atrofická gastritida s částečnou nebo úplnou ztrátou žaludečních žlázek, atrofická gastritida s pylorickou nebo intestinální metaplazií [60]. Při gastritidě dochází ke změnám hladin PG A a PG C v krvi, což může být využito při diagnostice tohoto onemocnění.

U jedinců s chronickou superficiální gastritidou dochází ke zvýšení hladin obou pepsinogenů, ale nepoměrně více vzrůstá PG C. Proto vzájemný poměr PG A/PG C

významně klesá ve srovnání se zdravou kontrolou [9]. Pacienti s chronickou superficiální gastritidou mají ve srovnání s pacienty s atrofickou gastritidou vyšší hladinu PG A i PG C v séru i vyšší poměr PG A/PG C [1]. Během atrofické gastritidy klesá produkce žaludeční kyseliny a zároveň i hladina PG A v séru. Hladina PG C v séru zůstává zvýšená. Pouze u pacientů s pokročilou hlubokou atrofickou gastritidou se hladina PG C vrací k normálním hodnotám. V séru zdravých jedinců je hladina PG A vyšší než PG C, ale v případě pacientů s hlubokou atrofickou gastritidou může být naopak hladina PG C vyšší než PG A [9]. Pacienti s atrofickou gastritidou těla žaludku mají nižší hladinu PG A a poměr PG A/PG C v séru ve srovnání s pacienty s atrofickou gastritidou antra. Hladina PG A a poměru PG A/PG C významně klesá s vyvíjející se atrofickou gastritidou [41]. Byl pozorován vztah mezi hladinou PG A, poměru PG A/PG C a lokalizací gastritidy. Hladina PG A a poměr PG A/PG C je nejvyšší u gastritidy predominantně přítomné v antru. Hladina PG A i poměr PG A/PG C klesá v pořadí: gastritida predominantně přítomná v antru, pangastritida a gastritida predominantně přítomná v těle žaludku. Mezi hladinou PG C a lokalizací gastritidy korelace pozorována nebyla [43]. Ke zvýšené expresi PG C dochází spíše u intestinální metaplazie středního a většího rozsahu než u intestinální metaplazie malého či žádného rozsahu [44]. Celková prevalence atrofické gastritidy s intestinální metaplazií je vyšší u jedinců s nižším poměrem PG A/PG C a nižší hodnotou PG A v séru. U *H. pylori* pozitivních jedinců s atrofickou gastritidou s intestinální metaplazií je poměr PG A/PG C menší než 3,0 (cit. [45]).

1.2.2.3. Změny hladin pepsinogenů při peptickém vředu a při rakovině žaludku

Peptický vřed žaludku je ohraničený defekt sliznice, který zasahuje do submukózy. Často je provázen chronickou gastritidou. Peptický vřed duodena je multifaktoriální onemocnění. Se vznikem vředové choroby je asociován *H. pylori* [60]. Nejčastějším nádorem žaludku je adenokarcinom [61, 62], který se dále rozlišuje na intestinální a difúzní typ.

Hladina PG A v séru je oproti zdravým kontrolám vyšší u pacientů s duodenálním [38, 63] nebo žaludečním [38] vředem, zatímco u pacientů s rakovinou žaludku [38, 41] je nižší. Hladina PG C v séru je oproti kontrolám vyšší u pacientů s duodenálním nebo žaludečním vředem [38, 39], zatímco u pacientů s rakovinou žaludku se hladina tohoto pepsinogenu buď nemění [38] nebo je vyšší [39, 40]. Poměr PG A/PG C je oproti kontrole vyšší u pacientů s duodenálním vředem [38] a nižší u pacientů s rakovinou žaludku [38 - 41, 49]. U žaludečního vředu jsou hladiny PG A i PG C v séru vyšší než u rakoviny žaludku, ale není významný rozdíl mezi těmito skupinami v poměru PG A/PG C [38]. Pacienti s rakovinou žaludku mají oproti

pacientům s atrofickou gastritidou nižší hladinu PG A i poměr PG A/PG C v séru [41]. U raného i pokročilého stádia rakoviny dochází oproti zdravé kontrole ke snížení hladiny PG A i poměru PG A/PG C v séru. Tento pokles je vyšší u pokročilého stádia rakoviny žaludku [38, 41]. U rakoviny žaludku intestinálního typu je oproti difúznímu typu významně nižší hladina PG A i PG C. Poměr PG A/PG C je u jedinců s rakovinou žaludku bez ohledu na histologický typ významně nižší oproti kontrolám [40]. Pomocí imunohistochemických metod bylo zjištěno, že absence či velmi nízká PG C produkce při rakovině žaludku je asociována s krátkou dobou přežití nemocných jedinců a s vyšším relapsem nemoci [64].

Přítomnost a obsah Pg 3 a Pg 5 (izozymogeny PG A) silně závisí na typu žaludečního onemocnění. Pacienti s duodenálním vředem mají poměr izozymogenů Pg 3/Pg 5 cca 3. U pacientů s žaludečním vředem dochází ke zvýšení poměru Pg 3/Pg 5 na hodnotu cca 9 a navíc u těchto jedinců je snížený výskyt Pg 1 v antru. Pacienti s karcinomem žaludku mají poměr Pg 3/Pg 5 nejnižší (pod jedna) a mají významně zvýšenou koncentraci Pg 5 (cit. [65]).

1.2.3. Stanovení pepsinogenů v klinické praxi

V klinické praxi se dnes stanovují koncentrace PG A a PG C v séru imunochemickými metodami (např. ELISA*), které využívají vzájemně odlišných imunochemických vlastností těchto zymogenů. Těmito metodami však nelze stanovit aktivní pepsiny [66]. Dnes je na trhu dostupná řada imunochemických kitů na stanovení obou pepsinogenů v krevním séru [45, 48, 67].

1.3. Metody izolace a separace pepsinogenů a pepsinů

1.3.1. Elektroforetické metody

1.3.1.1. Nativní elektroforéza

Proteiny jsou při nativní elektroforéze separovány na základě svého náboje a velikosti. Pro separaci lidských pepsinů a pepsinogenů byla použita nativní elektroforéza na agarovém nebo polyakrylamidovém gelu. Pomocí elektroforézy na agarovém gelu byly rozděleny pepsinogeny z extraktu lidské žaludeční sliznice na osm proteolyticky aktivních proužků označených podle klesající anodické mobility jako Pg 1 až Pg 7 a SMP (cit. [3]) - později označovaná jako kathepsin E (EC 3.4.23.34) (cit. [1]). Pepsinogeny v polyakrylamidovém gelu

* „Enzyme-linked immunosorbent assay“

putují téměř shodně jako v agarovém, liší se pouze pohyblivostí některých frakcí. Na polyakrylamidovém gelu byl separací pepsinogenů z extraktu lidské žaludeční sliznice [9] získán kathepsin E a Pg 2 až Pg 7, které však překryly pás Pg 1. Navíc Pg 5 a Pg 6 migrovaly společně. Polyakrylamidová [68] a zejména agarová [69 - 72] elektroforéza je často používána k identifikaci jednotlivých pepsinogenů a pepsinů ve frakcích po jejich chromatografické separaci.

1.3.1.2. Imunoelektroforéza

Při raketové imunoelektroforéze dochází k interakci antigenu s polyklonální protilátkou v gelovém prostředí. Tato technika byla použita k semikvantitativnímu určení lidského PG A v extraktu žaludeční sliznice [73]. Dvousměrná imunoelektroforéza, umožňující kvantifikovat několik antigenů ve směsi, byla použita při studiu pepsinogenů v pankreatu [74]. Imunoelektroforéza byla dále použita k ověření čistoty pepsinogenů z extraktu žaludeční sliznice po jejich chromatografické separaci [75, 76].

1.3.1.3. Izoelektrická fokusace

Izolelektrická fokusace (IEF) je elektroforetická metoda založená na separaci proteinů podle jejich izolelektrických bodů. IEF byla použita k separaci chromatograficky purifikovaných lidských PG A a PG C z extraktu žaludeční sliznice pacientů s rakovinou žaludku. Touto metodou bylo získáno deset proteolyticky aktivních proužků, které odpovídaly jednotlivým izoformám pepsinogenů [77]. IEF byla také použita ke studiu pepsinů lidské žaludeční šťávy pacientů s žaludečními onemocněními. U jednotlivých pacientů byl získán různý počet proužků (maximálně však šest), které se navíc lišily i svou proteolytickou aktivitou [78].

1.3.2. Chromatografické metody

Dosud neexistuje jednoduchá univerzální metoda pro purifikaci, izolaci a separaci pepsinů a jejich zymogenů. Většina popsaných postupů pro uvedené proteiny zahrnuje kombinace chromatografických metod. Pepsiny mají tendenci k autoproteolýze a k inaktivaci, proto jsou často izolovány ve formě zymogenů. Pepsinogeny jsou následně aktivovány na pepsiny, které jsou poté separovány na jednotlivé pepsiny. Izolovány a separovány jsou nejčastěji PG A a PG C z extraktu žaludeční sliznice [68, 69, 75, 76, 79, 80], PG A z moči [75, 81], PG C ze semenné plazmy [7], pepsiny z okyseleného extraktu žaludeční sliznice [68, 69] nebo z žaludeční šťávy [70 - 72, 82, 83].

1.3.2.1. Iontově-výměnná chromatografie

Při iontově-výměnné chromatografii jsou proteiny separovány na základě svého náboje. K frakcionaci pepsinu A a pepsinu C z okyseleného extraktu lidské žaludeční sliznice fundu a pyloru byl použit katex (Amberlite CG-50) a k následné identifikaci jednotlivých pepsinů byla použita agarová elektroforéza [69]. K izolaci pepsinů z lidské žaludeční šťávy byl také použit anex (DEAE-celulosa); jednotlivé pepsiny byly separovány následnými rechromatografiemi [70]. Pepsiny byly také separovány chromatografií na DEAE-celulose (provedena „batch-wise“) v kombinaci s chromatografií na TSK DEAE-5PW [71, 82]. TSK DEAE-5PW byl také úspěšně použit při separaci jednotlivých pepsinů z žaludeční šťávy bez předchozí chromatografické purifikace [72, 83].

K purifikaci a frakcionaci pepsinogenů z extraktu lidské žaludeční sliznice se nejčastěji používá anex DEAE-celulosa [69, 79, 80]. Na tomto sorbentu byly separovány pepsinogeny z homogenátů lidské žaludeční sliznice pacientů s karcinomem žaludku a s žaludečním vředem. Byl zjištěn významný rozdíl v chromatografickém profilu pepsinogenů z žaludeční sliznice pacientů s žaludečními vředy a s karcinomem žaludku (stejný počet píků, ale jejich různé vzájemné poměry) [79]. Bank a kol. kombinací chromatografie na DEAE-Sephacelu, na Sephacrylu S-200 HR a na Mono-Q HR5/5 separovali izozymogeny PG A z lidské moči [81]. Kombinací chromatografií na DEAE-celulose a Mono-Q HR5/5 byly separovány některé izozymogeny lidských pepsinogenů z lidské žaludeční sliznice [68]. Sorbent Uno-Q1 byl použit k separaci na DEAE-Separonu purifikovaných lidských PG A a PG C z žaludeční sliznice pacientů s rakovinou žaludku. Ze sorbentu Uno-Q1 byl nejdříve desorbován PG C a poté PG A. Jednotlivé izozymogeny pepsinogenů se však na tomto sorbentu separovat nepodařilo [77].

1.3.2.2. Afinitní chromatografie

Pro izolaci a separaci pepsinů a jejich zymogenů byla také použita afinitní chromatografie, která je založena na schopnosti biologicky aktivních látek se specificky a reverzibilně vázat na komplementární sloučeninu (afinitní ligand) imobilizovanou na matrici. Pro izolaci a separaci pepsinů a jejich zymogenů byl dosud popsán jen omezený počet ligandů, které využívají tvorby komplexů antigen – protilátka [75, 76], enzym – inhibitor [84 - 86] nebo enzym – derivát substrátu [87 - 92].

1.3.2.2.1. Imunoafinitní chromatografie

Imunoafinitní chromatografie byla použita pro izolaci PG A [75] a PG C [76] z žaludeční sliznice a PG A z koncentrované moči. K izolaci PG A z extraktu žaludeční sliznice nebo moči imunoafinitní chromatografií na Sepharose 4B s imobilizovanou protilátkou proti PG A bylo nutné nejdříve vzorky purifikovat iontově-výměnnou chromatografií na DEAE-Sephadexu A-50 (cit. [75]). Aplikací extraktu lidské žaludeční sliznice přímo na Sepharosu 4B s imobilizovanou protilátkou proti PG C byl získán PG C s příměsí dalších látek (např. imunoglobulinů), které byly odstraněny následnou chromatografií na DEAE-Sephadexu A-50 (cit. [76]).

1.3.2.2.2. Afinitní chromatografie využívající jako ligand inhibitor

Purifikace hovězího [84] a ovčího [85] pepsinu byla provedena na Sepharose 4B s imobilizovaným inhibitorem poly-L-lysinem. Pro separaci lidského pepsinu A a pepsinu C z žaludeční šťávy byla použita Sepharosa 4B s imobilizovaným heptapeptidem Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu. V případě separace pepsinů z okyselené žaludeční sliznice na tomto sorbentu bylo nutné nejprve pepsiny izolovat na DEAE-celulose [86].

1.3.2.2.3. Afinitní chromatografie využívající jako ligand derivát substrátu

Při výrobě vhodného sorbentu pro afinitní chromatografii pepsinů a pepsinogenů se vycházelo ze známého substrátu pro pepsin A N-acetyl-L-fenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosinu [4, 18]. Byly připraveny sorbenty obsahující 3,5-dijod-L-tyrosin (ligand) imobilizovaný na matrice na bázi polyakrylamidu nebo Sepharosy 4B. Nejvyšší kapacitu pro prasečí pepsin A měl 3,5-dijod-L-tyrosin imobilizovaný na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B (cit. [88]). Obdobné výsledky byly získány při porovnání vlivu aktivace perlové celulosy (divinylsulfonem) a Sepharosy 4B (divinylsulfonem nebo 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinem) s imobilizovanými jodovanými deriváty L-tyrosinu; nejvýhodnější vlastnosti pro afinitní chromatografii pepsinů byly nalezeny u sorbentů připravených aktivací Sepharosy 4B pomocí divinylsulfonu [89].

Ke zhodnocení příspěvku jednotlivých komponent substrátu N-acetyl-L-fenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosinu na interakci s prasečím pepsinem A byly připraveny sorbenty s imobilizovanými deriváty L-tyrosinu a L-fenylalaninu. Bylo zjištěno, že adsorpce prasečího pepsinu A závisí na substituci aromatických aminokyselin. Kapacita sorbentů na bázi Sepharosy 4B s imobilizovaným monojodovaným derivátem L-tyrosinu (3-jod-L-tyrosin) pro

prasečí pepsin A byla velmi nízká a prakticky se nelišila od kapacity sorbentu s imobilizovaným L-tyrosinem. K výraznému zvýšení kapacity došlo u sorbentů s imobilizovaným 3,5-dijod-L-tyrosinem a při jodaci L-tyrosin-Sepharosy 4B. Tyto sorbenty se také lišily afinitou k lidskému PG A a PG C. Žádný z těchto pepsinogenů neměl afinitu k imobilizovanému L-tyrosinu ani k 3-jod-L-tyrosinu. K imobilizovanému 3,5-dijod-L-tyrosinu měl afinitu jen PG C. K L-tyrosinu jodovanému až po imobilizaci na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B měly afinitu oba pepsinogeny. K imobilizovanému L-fenylalaninu neměl afinitu žádný z lidských pepsinogenů a k p-jod-L-fenylalaninu měl afinitu jen PG C. Na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B byl dále imobilizován N-acetyl-L-fenylalanin, ke kterému měly afinitu oba lidské pepsinogeny a z dosud připravených sorbentů měl i největší kapacitu pro prasečí pepsin A [90].

Byly studovány interakce prasečího pepsinu A a PG A s ligandy imobilizovanými na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B dvěma způsoby: přes jejich volnou aminoskupinu nebo karboxylovou skupinu. Ligandy s volnou aminoskupinou (L-fenylalanin, L-tyrosin a jejich jodované deriváty nebo tyramin) byly imobilizovány přímo na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B. Naproti tomu při imobilizaci ligandů přes volnou karboxylovou skupinu bylo nutné nejdříve zavést ethylendiaminový oddalovací můstek. Karbodiimidovou reakcí byl poté na můstek imobilizován příslušný ligand s chráněnou aminoskupinou (např. N-acetyl-L-fenylalanin, Boc-3,5-dijod-L-tyrosin*, Boc-L-tyrosin). Chránící skupina Boc byla nakonec hydrolyticky odstraněna trifluoroctovou kyselinou. Přítomnost chránící skupiny Boc neměla významný vliv na afinitu enzymu k imobilizovanému 3,5-dijod-L-tyrosinu. Největší kapacita byla zjištěna u sorbentů s imobilizovaným N-acetyl-L-fenylalaninem, 3,5-dijod-L-tyrosinem (imobilizovanými přes karboxylovou skupinu) a tyraminem (imobilizovaným přes aminoskupinu). Vysoká kapacita imobilizovaného tyraminu ve srovnání s L-tyrosinem naznačila, že volná karboxylová skupina ligandu negativně ovlivňuje jeho interakci s prasečím pepsinem A. Prasečí PG A interagoval pouze s ligandy imobilizovanými přes karboxylovou skupinu a s tyraminem [91].

* Boc – N-*terc*-butyloxykarbonyl

2. Cíl práce

Téma dizertační práce je součástí dlouhodobého výzkumu, který je zaměřen na studium vztahu aspartátových proteas v lidské žaludeční šťávě a jejich zymogenů v lidské žaludeční sliznici a výskytem závažných žaludečních onemocnění. Určení vzájemného poměru pepsinogenu A a pepsinogenu C je důležité pro diagnostiku atrofické gastritidy, která je často považována za premaligní stav rakoviny žaludku.

Cílem předkládané práce bylo připravit vhodný chromatografický sorbent pro separaci lidských žaludečních aspartátových proteas (pepsinů) a jejich zymogenů (pepsinogenů). K řešení tohoto úkolu bylo třeba:

- Připravit afinitní sorbenty, které by umožnily separaci lidských pepsinů a pepsinogenů, a nalézt nejvhodnější podmínky pro adsorpci a eluci jejich jednotlivých forem.

- Určit základní parametry připravených sorbentů pomocí modelové proteasy - prasečího pepsinu A.

- Studovat adsorpci prasečího pepsinu A na připravených afinitních sorbentech a charakterizovat vazebné místo enzymu, které se na interakci podílí.

- Použít připravené afinitní sorbenty pro separaci lidských pepsinů, případně pepsinogenů ze vzorků lidské žaludeční šťávy a lidské žaludeční sliznice.

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

Prasečí pepsin A (EC 3.4.23.1), prasečí pepsinogen A, hovězí hemoglobin, L-tyrosin, N-acetyl-L-fenylalanin, Boc-3,5-dijod-L-tyrosin, pepstatin A, kuřecí ovalbumin, α-chymotrypsin z hovězího pankreatu (EC 3.4.21.1), trypsin z hovězího pankreatu (EC 3.4.21.4), etylendiamin dihydrochlorid, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-etylkarbodiimid, divinylsulfon, Sepharosa 4B, trifluoroctová kyselina, močovina, hydrogenuhličitan amonný, jodacetamid, dithiotreitol, acetonitril, N,N-dimetylformamid, kyselá fosfatasa z brambor (EC 3.1.3.2), kyanoborohydrid sodný, 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (MES), akrylamid, N,N'-methylenbis(akrylamid), TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Hovězí sérový albumin byl zakoupen od firmy Serva (Heidelberg, Německo). „BCA™ Protein Assay Reagent A", roztok hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 2 mg/ml (standard pro stanovení proteinů) a „Phosphoprotein Phosphate Estimation Assay Kit" byly zakoupeny od firmy Pierce (Rockford, IL, USA). MALDI kalibrační standardy „Peptide Calibration Standard" a α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina byly od firmy Bruker Daltonics (Bremen, Německo). Monoklonální protilátka proti lidskému pepsinogenu A a monoklonální protilátka proti lidskému pepsinogenu C byly od firmy Medix Biochemica (Kauniainen, Finsko). Ostatní chemikálie byly od firmy IPL (Uherský Brod, Česká republika). Špičky naplněné C18 fází (PerfectPure C18 Tip) byly zakoupeny od firmy Eppendorf (Hamburg, Německo) a magnetické částice „Magnetic Glyoxal 4% Agarose Beads" (o velikosti 20 – 75 μm) od firmy BioSciences Bead Division of Colloidal Science Solutions, Inc. (West Warwick, USA).

3.2. Přístroje

Měření bylo prováděno na FPLC („fast protein liquid chromatography") od firmy Ecom (Praha, Česká republika) nebo Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Systém FPLC od firmy Ecom se softwarem CSW (DataApex, Praha, Česká republika) byl složen z programátoru gradientu GP 5, čerpadla LCP 4000, dávkovacího analytického ventilu smyčkového D (1 ml smyčka), UV detektoru LCD 2070 (vlnová délka 280 nm). Systém BioLogic DuoFlow od firmy Bio-Rad byl vybaven gradientovou pumpou, 1 ml dávkovací smyčkou, UV detektorem (vlnová délka 280 nm), vodivostním detektorem, pH detektorem. Oba FPLC systémy byly

dále vybaveny sběračem frakcí Fraction collector 2110 a kolonou Bio-Scale MT2 High-Resolution Column (52 mm × 7 mm i.d.) (vše Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Roztoky vzorků byly před aplikací na kolony filtrovány přes filtrační nástavce Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 μm (Whatman, Maidstone, Kent, UK). Při dialýze roztoků vzorků byly použity dialyzační kazety „Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes“ s celulosovou membránou (10 000 MWCO) od firmy Pierce (Rockford, IL, USA).

Používaná voda byla připravena Milli-Q systémem (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Při přípravě pufrů bylo pH měřeno na digitálním pH-metru Jenway (Essex, UK). Spektrofotometrická měření byla prováděna na Multiskan Microplate Readeru MCC/340 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). K temperování byla používána vodní lázeň Julabo HE-4 (JULABO Labortechnik, Seelbach, Německo), AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet International, Oakham, Rutland, UK) a Orbital Incubator SI50 (Stuart Scientific, Stone, Staffordshire, UK). K odstřeďování byla používána centrifuga s chlazením 5415R (Eppendorf, Hamburg, Německo). Nativní elektroforéza byla prováděna na chlazené vertikální elektroforéze od firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika) a jako zdroj byl použit Power PAC 3000 Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Analýza směsi peptidů získaných štěpením proteinů α-chymotrypsinem byla prováděna ve spolupráci s Mgr. Petrem Přikrylem, PhD. (Ústav patologické fyziologie 1. LF UK, Praha, Česká republika) na hmotnostním spektrometru Autoflex II TOF/TOF systému (Bruker Daltonics, Bremen, Německo) s využitím standardního ocelového terčíku „ MTP 384 massive target T“ s 384 pozicemi (Bruker Daltonics, Bremen, Německo).

3.3. Příprava afinitních sorbentů [90, 91]

3.3.1. Aktivace Sepharosy 4B divinylsulfonem

Sepharosa 4B (10 ml) byla promyta na fritě S 1 destilovanou vodou (500 ml). Po odsátí na fritě byl k promyté suspenzi přidán 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 (10 ml) a divinylsulfon (1 ml). Suspenze byla třepána 70 min za laboratorní teploty. Následně byla promyta destilovanou vodou (500 ml) a 200 mM uhličitanovým pufrem pH 10,7 (200 ml).

3.3.2. Vazba ethylendiaminového oddalovacího můstku nebo L-tyrosinu

Ihned po aktivaci byla divinylsulfonem aktivovaná Sepharosa 4B (10 ml) smíchána s 200 mM uhličitanovým pufrem pH 10,7 (10 ml) obsahujícím ethylendiamin dihydrochlorid

(2 g) nebo L-tyrosin (1 g). Směs byla třepána 16 h za laboratorní teploty. Poté byl gel promyt destilovanou vodou (500 ml) a 200 mM uhličitanovým pufrem pH 10,7 (200 ml).

Potom byla modifikovaná Sepharosa 4B smíchána s roztokem glycinu (100 mg glycinu v 10 ml 200 mM uhličitanového pufru pH 10,7) a třepána 2 h za laboratorní teploty. Následně byl gel promyt destilovanou vodou (500 ml), 200 mM uhličitanovým pufrem pH 10,7 (200 ml) a opět destilovanou vodou (500 ml).

3.3.3. Vazba N-acetyl-L-fenylalaninu nebo Boc-3,5-dijod-L-tyrosinu

Divinylsulfonem aktivovaná Sepharosa 4B obsahující ethylendiaminový oddalovací můstek (10 ml) byla suspendována v roztoku obsahujícím ligand (215 mg ligandu (N-acetyl-L-fenylalaninu nebo Boc-3,5-dijod-L-tyrosinu) v 6 ml destilované vody) a N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid (228 μl). Suspenze byla třepána 24 h za laboratorní teploty a poté promyta destilovanou vodou (500 ml).

3.3.4. Odstranění chránící skupiny z Boc-3,5-dijod-L-tyrosinu

K sorbentu s imobilizovaným Boc-3,5-dijod-L-tyrosinem byl přidán roztok trifluoroctové kyseliny (1,5 ml) v destilované vodě (15 ml). Směs byla třepána 30 min za laboratorní teploty a pak promyta destilovanou vodou (500 ml).

3.3.5. Jodace Sepharosy 4B s imobilizovaným L-tyrosinem

L-tyrosin-Sepharosa 4B byla promyta PBS* (200 ml) a smíchána s roztokem PBS (7,8 ml) obsahujícím jodid draselný (2,4 g) a chloramin B (0,6 g). Po 2 min byla reakce ukončena přidáním roztoku obsahujícího thiosiřičitan sodný (0,1 g) a jodid draselný (2,4 g) v PBS (7,2 ml). Takto připravený sorbent byl nakonec promyt destilovanou vodou (500 ml).

3.4. Příprava magnetických částic s imobilizovanou kyselou fosfatasou z brambor

Usazené magnetické částice „Magnetic Glyoxal 4% Agarose Beads" (velikost 20 – 75 μm) o objemu 1 ml byly promyty 100 mM hydrogenuhličitanem sodným (4 × 3 ml). Promyté částice byly resuspendovány ve 2 ml roztoku obsahujícího kyselou fosfatasu

* „ Phosphate buffered saline"

z brambor (10 mg/ml 100 mM hydrogenuhličitanu sodného) a třepány za laboratorní teploty 24 h. Následně byly částice promyty 100 mM hydrogenuhličitanem sodným (7 × 3 ml) a smíchány s roztokem glycinu (15 mg glycinu ve 2 ml 100 mM hydrogenuhličitanu sodného) a třepány 1 h za laboratorní teploty. Poté byly promyty destilovanou vodou (5 × 3 ml) a 100 mM hydrogenuhličitanem sodným (3 × 3 ml). Následně byly částice 1 h třepány ve 2 ml 100 mM hydrogenuhličitanu sodného obsahujících kyanoborohydrid sodný (15 mg). Nakonec byly částice promyty destilovanou vodou a uchovávány v roztoku 10 mM octanového pufru pH 5,0 obsahujícího 20 mM $MgCl_2$. Množství proteinů bylo stanoveno metodou BCA (bicinchoninová kyselina, viz kap. 3.12.1.) v roztoku před a po imobilizaci kyselé fosfatasy z brambor a ve všech následujících promývacích roztocích po imobilizaci. Množství imobilizované kyselé fosfatasy z brambor bylo vypočteno jako rozdíl množství proteinů v roztocích před a po imobilizaci fosfatasy. Magnetické částice obsahovaly 4,8 mg fosfatasy/ml usazených částic.

3.5. Příprava vzorků pro afinitní chromatografii

3.5.1. Potkaní a lidské pepsiny a pepsinogeny

Žaludky ze samic potkana získané na 1. LF UK v Praze byly okamžitě zpracovány. Oddělená žaludeční sliznice byla ihned promyta 50 mM Tris pufrem pH 7,2 a homogenizována v 50 mM Tris pufru pH 7,2 (1 g tkáně na 4 ml pufru). Homogenát byl odstřeďován 60 min při 400 g a teplotě 4°C. Supernatant byl uchováván ve zmraženém stavu při teplotě -18°C. Před analýzou byl homogenát žaludeční sliznice potkana okyselen 1 M HCl na pH 3,0, čímž došlo k aktivaci pepsinogenu C na pepsin C. Aktivace probíhala 16 h při teplotě 4°C. Takto upravený homogenát byl před aplikací na afinitní sorbent přefiltrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 μm).

Resekované části lidských žaludků pacientů s různými žaludečními onemocněními (karcinomem žaludku, vředovou chorobou duodena nebo žaludku), získané na 1. chirurgické klinice 1. LF UK v Praze, byly promyty 50 mM Tris pufrem pH 7,2 a rozděleny do několika proužků. Oddělená sliznice byla homogenizována v 50 mM Tris pufru pH 7,2 (1 g tkáně na 4 ml pufru). Homogenát byl odstřeďován 60 min při 400 g a teplotě 4°C. Supernatant byl dlouhodobě uchováván ve zmraženém stavu při teplotě –18°C. V případě separace lidských pepsinogenů byl na afinitní sorbent aplikován filtrát tohoto supernatantu. Filtrace byla provedena přes filtrační nástavec Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 μm. Před

separací lidských pepsinů z homogenátu lidské žaludeční sliznice bylo nutné před analýzou aktivovat pepsinogeny na pepsiny okyselením homogenátu 1 M HCl na pH 3,0. Aktivace pepsinogenů na pepsiny probíhala 16 h při teplotě 4°C. Poté byl takto upravený homogenát přefiltrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 μm).

Lidská žaludeční šťáva zdravého jedince, získaná na 4. interní klinice 1. LF UK v Praze, byla lyofilizována a uchovávána dlouhodobě při teplotě -18°C. Před aplikací na afinitní sorbent byl lyofilizát rozpuštěn v příslušné adsorpční mobilní fázi (2 mg/ml) a přefiltrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 μm).

3.5.2. Inhibice prasečího pepsinu A

Inhibice prasečího pepsinu A byla provedena pepstatinem A. Ke 3 ml roztoku prasečího pepsinu A (1 mg/ml adsorpční mobilní fáze) byly přidány 3 mg pepstatinu A. Směs byla inkubována 12 h při teplotě 4°C. K odstranění nerozpuštěného pepstatinu A byl roztok před aplikací na afinitní sorbent přefiltrován (Puradisc s PTFE membránou o velikosti pórů 1 μm).

3.5.3. Defosforylace prasečího pepsinu A

Ke 4 ml roztoku prasečího pepsinu A (1 mg/ml 10 mM octanového pufru pH 5,0 obsahujícího 20 mM $MgCl_2$) bylo přidáno 950 μl usazených magnetických částic s imobilizovanou kyselou fosfatasou z brambor (příprava částic viz kap. 3.4.). Tato směs byla třepána rychlostí 200 rpm při teplotě 37°C po dobu 25 h. Defosforylace prasečího pepsinu A byla ukončena odebráním magnetických částic z roztoku. Následně byl roztok vzorku dialyzován proti 100 mM octanovému pufru pH 3,7 (2 × 2 h a 1 × 16 h).

3.6. Afinitní chromatografie

3.6.1. Obecný postup afinitní chromatografie

Kolona Bio-Scale MT 2 High-Resolution Column (52 mm × 7 mm i.d.) byla naplněna připravenými sorbenty (viz kap. 3.3.). Před každou analýzou byla kolona promyta adsorpční mobilní fází až do ustálení linie detektoru (cca 40 ml). Poté byl aplikován roztok vzorku (1 ml) a kolona byla opět promyta adsorpční mobilní fází do vymytí všech neadsorbovaných látek (15 – 30 ml). Adsorbované proteiny byly desorbovány příslušnou eluční mobilní fází (izokraticky nebo lineárním gradientem). Chromatografie byly prováděny při průtokové rychlosti 1 ml/min. V průběhu analýz byla měřena absorbance při vlnové délce 280 nm. Po

skončení měření byly kolony promyty cca 40 ml příslušné adsorpční mobilní fáze. Dlouhodobě byly kolony skladovány při teplotě 4°C.

Během analýz byly odebírány frakce (1 ml), ve kterých bylo stanoveno množství proteinů metodou BCA (viz kap. 3.12.1.), případně jejich proteolytická aktivita modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.). Proteolytická aktivita enzymu stanovená metodou podle Ansona a Mirského byla použita k výpočtu výtěžku („recovery"). Výtěžek byl určen jako proteolytická aktivita desorbovaného enzymu vyjádřená v procentech proteolytické aktivity aplikovaného enzymu.

3.6.2. Roztoky použité při afinitní chromatografii pepsinů

Roztoky použité při hledání vhodných chromatografických podmínek pro pepsiny na **jodované L-tyrosin-Sepharose: adsorpce** – (a) 50 mM octanový pufr pH 3,5 – 6,0; (b) 50 mM fosforečnanový pufr pH 3,5 – 6,0; (c) 10 – 100 mM octanový pufr pH 4,0; (d) 25 mM octanový pufr pH 4,0 obsahující 0,3 nebo 1 M NaCl; **eluce** – (a) 25 – 200 mM fosforečnanový pufr pH 6,0; (b) 50 mM fosforečnanový pufr pH 8,0; (c) 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 obsahující 0,15 – 1,00 M NaCl; (d) 50 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 1 M NaCl; (e) 50 mM octanový pufr pH 6,0; (f) 50 mM Tris pufr pH 7,2 obsahující 1 M NaCl; (g) 50 mM fosforečnanový pufr pH 8,0 obsahující 1 M NaCl; (h) (0,6 mg 3,5-dijod-L-tyrosinu a 250 µl N,N-dimethylformamidu)/ml 25 mM octanového pufru pH 4,0.

Roztoky použité při hledání vhodných chromatografických podmínek pro pepsiny na **3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharose: adsorpce** – (a) 100 mM octanový pufr pH 3,5 – 6,0; (b) 0,25 – 1,00 M octanový pufr pH 6,0; (c) 100 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 0 – 1 M NaCl; **eluce** – (a) 50 mM octanový pufr pH 6,7; (b) 50 mM MES pH 6,7; (c) 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,7; (d) 50 mM octanový pufr pH 6,0 (50 mM MES pH 6,0; 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 nebo 6,8) obsahující 1 M NaCl; (e) 50 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 0,5 – 1,0 M NaCl; (f) (0,6 mg 3,5-dijod-L-tyrosinu a 213 µl N,N-dimethylformamidu)/ml 50 mM octanového pufru pH 6,0.

Roztoky použité při hledání vhodných chromatografických podmínek pro pepsiny na **N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose: adsorpce** – (a) 100 mM octanový pufr pH 3,0 – 5,0; (b) 0,025 – 1 M octanový pufr pH 3,7; (c) 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 0 – 0,5 M NaCl; (d) 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 1 M NaCl; (e) 0,1 nebo 0,3% octová kyselina; **eluce** – (a) 100 mM octanový pufr pH 6,7; (b) 100 mM MES pH 6,7; (c) 100 mM fosforečnanový pufr pH 6,9; (d) 100 mM octanový nebo fosforečnanový pufr pH 5,4

obsahující 0 – 0,5 M NaCl; (e) 100 mM MES pH 5,5 obsahující 0,5 M NaCl; (f) 100 mM fosforečnanový pufr pH 6,9 obsahující 0,5 M NaCl; (g) 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 0,05 – 1,00 M NaCl; (h) lineární gradient 100 mM octanového pufru pH 3,7 – 6,0; (ch) lineární gradienty 0 – 1 M NaCl ve 100 mM octanovém pufru pH 3,7 (různé strmosti); (i) 100 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 0,5 M NaCl; (j) 100 mM fosforečnanový pufr pH 7,2 obsahující 1 M NaCl; (k) (1 mg N-acetyl-L-fenylananinu a 2 µl N,N-dimethylformamidu)/ml 100 mM octanového pufru pH 3,7.

3.6.3. Roztoky použité při afinitní chromatografii pepsinogenů

Roztoky použité při chromatografii prasečího pepsinogenu A na **jodované L-tyrosin-Sepharose: adsorpce** – (a) 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 a 6,5; (b) 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 nebo 6,5 obsahující 1 M NaCl; **eluce** – (a) 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,5 nebo 8,0; (b) 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,5 nebo 8,0 obsahující 1 M NaCl.

Roztoky použité při chromatografii prasečího pepsinogenu A na **3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharose: adsorpce** – 20 mM octanový pufr pH 5,2; **eluce** – 20 mM octanový pufr pH 5,6 obsahující 0,5 M NaCl.

Roztoky použité při chromatografii prasečího pepsinogenu A a lidských pepsinogenů na **N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose: adsorpce** – (a) 20 mM octanový pufr pH 5,5; (b) 25 mM Tris pufr pH 7,2; **eluce** – (a) 20 mM octanový pufr pH 5,5 obsahující 0,5 M nebo 1,0 M NaCl; (b) 25 mM Tris pufr pH 7,2 obsahující 0,5 M nebo 1,0 M NaCl; (c) lineární gradienty 0 – 1 M NaCl v 25 mM Tris pufru pH 7,2 (různé strmosti).

3.6.4. Stanovení kapacity afinitních sorbentů pro prasečí pepsin A

Stanovení kapacity afinitních sorbentů pro prasečí pepsin A bylo provedeno za nejvhodnějších podmínek pro prasečí pepsin A. Roztok prasečího pepsinu A (1 mg/ml adsorpční mobilní fáze) byl aplikován na kolonu tak dlouho, než bylo dosaženo jejího úplného nasycení (proteolytická aktivita a koncentrace prasečího pepsinu A v odebíraných frakcích vykazovala konstantní hodnotu). Poté byla kolona promyta příslušnou adsorpční mobilní fází. Adsorbovaný prasečí pepsin A byl desorbován příslušnou eluční mobilní fází. Množství prasečího pepsinu A v eluátu bylo stanoveno metodou BCA (viz kap. 3.12.1.). Kapacita byla vyjádřena v miligramech prasečího pepsinu A adsorbovaného na 1 ml sorbentu.

3.7. Štěpení proteinů α-chymotrypsinem

Roztoky: A – 1,6 M hydrogenuhličitan amonný obsahující 7 M močovinu; B – 450 mM dithiotreitol; C – 100 mM jodacetamid; D – 1 mg α-chymotrypsinu/ml vody.

Postup: ve frakcích po afinitní chromatografii bylo upraveno pH na 7,8 roztokem A a byl přidán roztok B (20 µl/mg proteinů). Směs byla inkubována 25 min při 50°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl ke směsi přidán roztok C (20 µl/mg proteinů) a směs byla inkubována 10 min za laboratorní teploty. Pak byl přidán roztok D (100 µl/mg proteinů). Reakční směs byla třepána 18 h při 37°C. Reakce byla ukončena úpravou pH trifluoroctovou kyselinou na pH 4,0.

3.8. Odsolení peptidů na C18 fázi naplněné ve špičkách (PerfectPure C18 Tip)

Roztoky: A – 50% acetonitril; B – 0,1% trifluoroctová kyselina; C – 0,1% trifluoroctová kyselina obsahující 50% acetonitril.

Postup: špička naplněná C18 fází byla postupně promyta vždy po 100 µl (10 × 10 µl) roztoku A, roztoku B, vzorku (příprava viz kap. 3.7.) a roztoku B. Eluce adsorbovaných peptidů byla provedena 4 µl roztoku C. Eluát byl analyzován pomocí MALDI-TOF/TOF MS.

3.9. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a MALDI-TOF/TOF

Na hmotnostním spektrometru Autoflex II TOF/TOF, který byl vybaven dusíkovým laserem (337 nm) a FlexControl softwarem, byla v pozitivním módu naměřena spektra MALDI-TOF a MALDI-TOF/TOF. Jako vzorek byla použita směs peptidů, která vznikla štěpením proteinů po separaci afinitní chromatografií α-chymotrypsinem (viz kap. 3.7.), po odsolení na C18 fázi naplněné ve špičkách (viz kap. 3.8.). Na standardní ocelový terčík „MTP 384 massive target T" s 384 pozicemi bylo napipetováno 0,5 µl vzorku (eluátu z C18 špiček) a 0,3 µl standardu. Po zaschnutí terčíku na vzduchu byl vzorek/standard převrstven 0,5 µl/0,3 µl roztoku matrice (acetonitril : 1% octové kyselině : (3 mg α-kyano-4-hydroxyskořicové kyselině/ml 2% trifluoroctové kyseliny obsahující 50% acetonitril) v poměru 1:1:1). Po zaschnutí na vzduchu byl terčík vložen do hmotnostního spektrometru a podroben MS a MS/MS analýze.

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

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

3.10. Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza lidských pepsinogenů

Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza byla provedena modifikovanou metodou podle Banka a spol. [81].

Separační gel: (T 8,3%; C 3,0%)**: 20 ml 35 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 ml akrylamidové směsi (T 41,5%; C 3,0%); 80 µl 10% persíranu amonného; 20 µl TEMED (N,N,N’,N’-tetramethylethylendiamin)

Zaostřovací gel (T 3,6%; C 20,0%): 4 ml 30 mM Tris-H_3PO_4 pH 5,0 obsahující 0,67 M sacharosu; 1 ml akrylamidové směsi (T 18,0%; C 20,0%); 25 µl 10% persíranu amonného; 5 µl TEMED

Vzorkový pufr: 30 mM Tris-H_3PO_4 pH 5,5 obsahující 40% sacharosu a 0,1% bromfenolovou modř

Elektrodový pufr: 2,2 mM Tris-HCl pH 7,5 obsahující 15 mM barbiturát sodný

Postup provedení elektroforézy: k separaci lidských pepsinogenů byla použita vertikální chlazená elektroforéza o rozměrech skel 16,5 × 19 cm a tloušťce gelu 0,75 mm. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 2:1 (v/v) a naneseny do jamky zaostřovacího gelu (25 µl vzorku/jamku). Preelektroforéza (30 min) a elektroforéza

* Adenokortikotropní hormon

** Parametry T a C udávají stupeň zesítění akrylamidu a N,N’-methylenbisakrylamidu

v zaostřovacím gelu probíhala za konstantního napětí 150 V, v separačním gelu za konstantního napětí 400 V při 7 °C.

Detekce pepsinogenů po elektroforéze: po skončení elektroforetické separace byl polyakrylamidový gel inkubován v roztoku 60 mM HCl obsahující 0,6% hemoglobin (3h), stabilizován v roztoku 10% sulfosalicylové kyseliny (30 min), obarven v 0,2% amidočerni 10 B rozpuštěné ve 40% metanolu a 10% octové kyselině, odbarven v 7% octové kyselině. Pepsinogeny se jevily jako bílé pruhy na modrém pozadí.

3.11. Inkubace lidských pepsinogenů s monoklonálními protilátkami

Inkubace s monoklonální protilátkou byla provedena modifikovanou metodou podle Majerčákové a kol.[73]. Do jamek mikrotitrační destičky s kulatým dnem byly napipetovány vzorky podle tabulky 3.1 a destička byla 5 min třepána. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 4°C. Druhý den byla směs odstřeďována 5 min při 300 g a teplotě 4°C. V části supernatantu byla po úpravě pH na hodnotu 3,0 stanovena proteolytická aktivita pepsinogenů (resp. pepsinů) modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.). Druhá část supernatantu byla analyzována pomocí nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy (viz kap. 3.10.).

Tab. 3.1 Příprava vzorků pro inkubaci s protilátkami proti lidským pepsinogenům

Jamka číslo	Antih(PG A)	Antih(PG C)	Fyziologický roztok	PV*
1	25 µl	–	75 µl	–
2	–	25 µl	75 µl	–
3	25 µl	–	25 µl	50 µl
4	–	25 µl	25 µl	50 µl
5	25 µl	25 µl	–	50 µl
6	–	–	50 µl	50 µl

* Filtrát homogenátu lidské žaludeční sliznice (0,1 mg proteinů/ml)

Antih(PG A) – protilátka proti lidskému pepsinogenu A; Antih(PG C) – protilátka proti lidskému pepsinogenu C

3.12. Analytické metody

3.12.1. Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou BCA (bicinchoninová kyselina) [93]. Toto stanovení je založeno na reakci peptidové vazby s Cu^{2+} ionty v alkalickém prostředí za vzniku Cu^{+} iontů, které poté vytváří s BCA purpurově zbarvené komplexy. K sestrojení kalibrační přímky byly použity roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) o známé koncentraci.

Roztoky: A – „BCA™ Protein Assay Reagent A"; B – 4% $CuSO_4$; reakční roztok AB – roztoky A a B smíchány v poměru 50:1; standardy – roztoky BSA o známé koncentraci (7,8 – 500 μg/ml).

Postup: do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 40 μl vzorku nebo standardu o známé koncentraci a 200 μl reakčního roztoku AB. Mikrotitrační destička byla 30 s třepána, a pak inkubována 30 min při 60°C. Absorbance byla změřena při vlnové délce 540 nm. Stanovení bylo prováděno v duplikátech.

3.12.2. Stanovení proteolytické aktivity modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského

Stanovení proteolytické aktivity bylo prováděno modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského [94]. Tato metoda je založena na štěpení hovězího hemoglobinu pepsinem za vzniku peptidů, jejichž množství je přímo úměrné aktivitě pepsinu. Množství vzniklých peptidů se stanovuje metodou BCA po vysrážení nerozštěpených proteinů trichloroctovou kyselinou.

Roztoky: 0,3 M HCl; 0,3 M trichloroctová kyselina; roztok hemoglobinu – roztok rozpuštěného hemoglobinu (1 g / 40 ml vody) a 10 ml 0,3 M HCl.

Postup: do mikrozkumavky bylo napipetováno 250 μl roztoku hemoglobinu, který byl temperován ve vodní lázni 10 min při teplotě 37°C. Bylo přidáno 50 μl vzorku. V případě pepsinů (pepsinogenů) byla reakce přesně po 10 min (30 min) ukončena přidáním 500 μl 0,3 M trichloroctové kyseliny. Mikrozkumavka byla odstřeďována v centrifuze po dobu 15 minut při 12 000 rpm a 8°C. V supernatantu byla stanovena koncentrace peptidů metodou BCA (viz kap. 3.12.1.). Jednotka PU je definována jako takové množství enzymu, které přemění za 1 minutu při 37°C a při pH 2 takové množství hemoglobinu, že vzniklé peptidy způsobí změnu absorbance o 0,001 při 540 nm měřenou metodou BCA.

3.12.3. Stanovení množství fosforu

V prasečím pepsinu A bylo množství fosforu stanoveno pomocí „Phosphoprotein Phosphate Estimation Assay Kit“. Stanovení je založeno na alkalické hydrolýze fosfátových skupin ze serinových a threoninových zbytků fosfoproteinů a na kvantifikaci uvolněného fosfátu pomocí malachitové zeleně a molybdenanu amonného. K sestrojení kalibrační přímky byly použity roztoky fosvitinu o známé koncentraci a o známém množství fosforu.

Roztoky: 2,0 M NaOH; 4,7 M HCl; fosfátový reagent – směs roztoku molybdenanu amonného a roztoku malachitové zeleně v poměru 1:3; standardy – roztoky fosvitinu o známé koncentraci (1,25 – 20 μg/ml) a o známém množství fosforu.

Postup: do jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μl vzorku nebo standardu o známé koncentraci. Po přidání 50 μl 2,0 M NaOH byla destička třepána po dobu 1 minuty a následně inkubována 30 min při 65°C. Poté bylo přidáno 50 μl 4,7 M HCl a destička byla třepána po dobu 1 minuty. Po přidání 50 μl fosfátového reagentu a po promíchání na třepačce po dobu 1 minuty byla destička inkubována 30 min za laboratorní teploty. Poté byla změřena absorbance při 650 nm. Stanovení bylo prováděno v triplikátu.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Příprava afinitních sorbentů

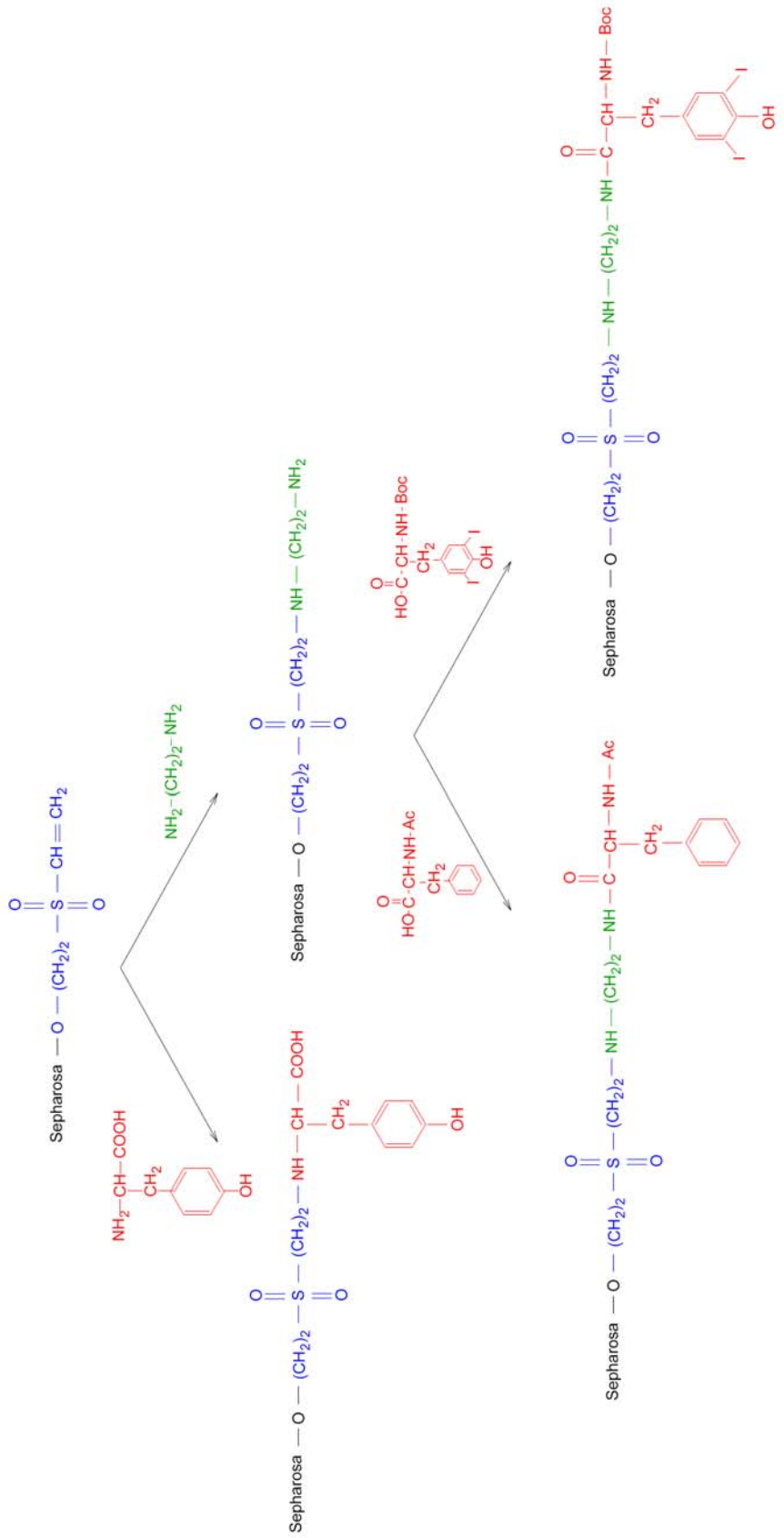
Pro purifikaci a separaci lidských žaludečních aspartátových proteas – pepsinů a pepsinogenů byly připraveny a testovány tři afinitní sorbenty. Ligandy použité v této práci byly imobilizovány na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B [95, 96]. Tento způsob aktivace Sepharosy umožňuje jednoduché navázání ligandů přes jejich volnou aminoskupinu nebo hydroxylovou skupinu. Navíc modifikace divinylsulfonem aktivované Sepharosy pomocí oddalovacího můstku umožňuje ligand imobilizovat také přes jeho volnou karboxylovou skupinu.

V literatuře je uveden jen omezený počet ligandů použitých k izolaci či separaci pepsinů a pepsinogenů z různých zdrojů, např. protilátky [75, 76], inhibitory [84 - 86] a deriváty substrátu [87 - 92]. Při výběru vhodného afinitního ligandu pro lidské pepsiny a pepsinogeny jsme vycházeli ze známého substrátu N-acetyl-L-fenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosinu, pomocí kterého lze stanovit aktivitu pepsinu A ve směsi s pepsinem C [18].

Byly připraveny tři afinitní sorbenty obsahující následující ligandy: 3,5-dijod-L-tyrosin, N-acetyl-L-fenylalanin nebo L-tyrosin (obr. 4.1). Afinitní sorbent obsahující imobilizovaný L-tyrosin byl ihned po navázání ligandu jodován. Struktura připravených afinitních sorbentů odpovídala obecnému vzorci sorbentu pro thiofilní chromatografii matrice-O-CH_2-CH_2-SO_2-CH_2-CH_2-X-Y [97 - 99], kde X může být kromě atomu síry také atom kyslíku či dusíku a Y je aromatická nebo heteroaromatická sloučenina.

L-tyrosin byl imobilizován přímo na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B přes svou volnou aminoskupinu (obr. 4.1). Po navázání ligandu byl sorbent jodován chloraminovou metodou [90].

Dalšími použitými ligandy byly N-acetyl-L-fenylalanin a 3,5-dijod-L-tyrosin, které byly na divinylsulfonem aktivovanou matrici imobilizovány přes své volné karboxylové skupiny (obr. 4.1). V těchto případech bylo nejdříve nutné na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B navázat ethylendiaminový oddalovací můstek, čímž byla na matrici zavedena aminoskupina. Karbodiimidovou reakcí byl poté na můstek imobilizován příslušný ligand: N-acetyl-L-fenylalanin nebo Boc-3,5-dijod-L-tyrosin prostřednictvím amidové vazby. Z imobilizovaného Boc-3,5-dijod-L-tyrosinu byla nakonec hydrolyticky odstraněna chránící skupina Boc trifluoroctovou kyselinou [91].



Obr. 4.1 Schéma imobilizace derivátů aromatických aminokyselin na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B

4.2. Afinitní chromatografie prasečího pepsinu A

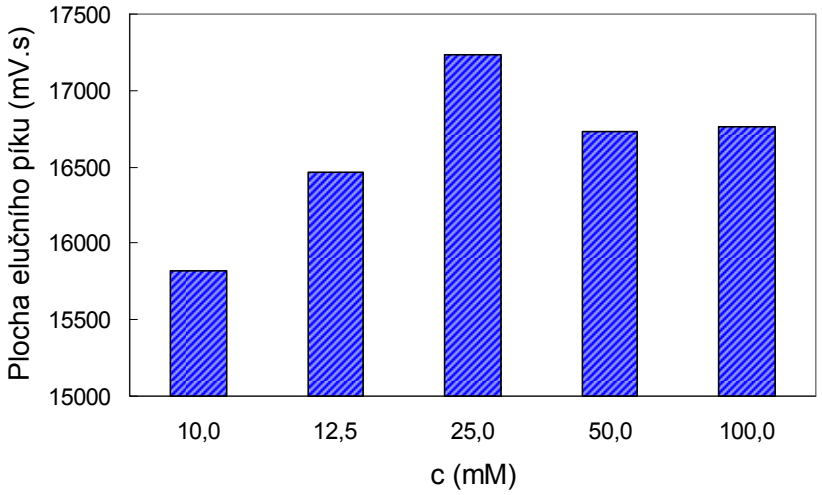
4.2.1. Optimalizace podmínek chromatografie prasečího pepsinu A na afinitních sorbentech

Nejdříve byly na připravených sorbentech určeny nejvhodnější adsorpční a eluční chromatografické podmínky pro modelovou aspartátovou proteasu prasečí pepsin A. Byl zkoumán vliv složení (fosforečnanový pufr, octanový pufr, MES), pH a iontové síly adsorpční i eluční mobilní fáze (obr. 4.2 – 4.6). Při výběru vhodného pufru se vycházelo ze stability molekuly prasečího pepsinu A. Molekula prasečího pepsinu A je proteolyticky aktivní do pH 6. Nad pH 7 dochází k její ireverzibilní inaktivaci [22].

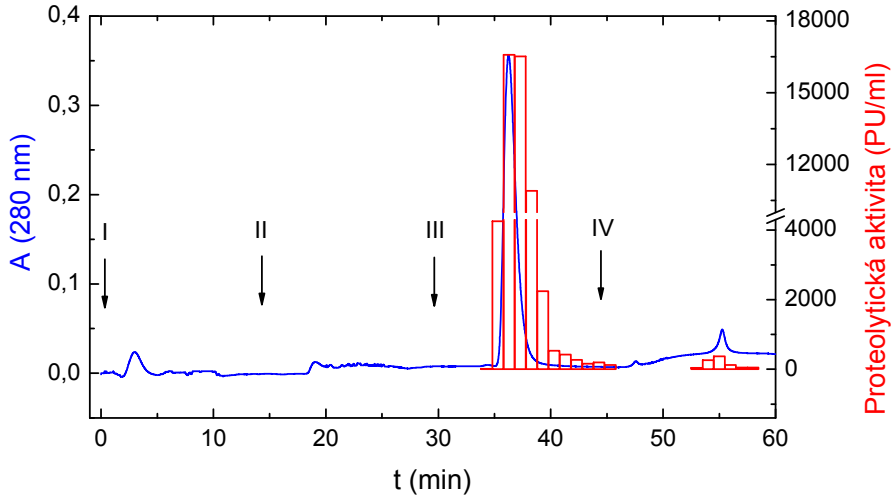
4.2.1.1. Ligand imobilizovaný na matrici přes svou aminoskupinu; optimalizace chromatografických podmínek pro prasečí pepsin A na jodované L-tyrosin-Sepharose

Při hledání vhodných adsorpčních podmínek pro prasečí pepsin A na jodované L-tyrosin-Sepharose byl nejdříve zjišťován vliv pH na adsorpci. Prasečí pepsin A byl na afinitní sorbent adsorbován v oblasti pH 3,5 – 5,0. Při zvýšení pH nad tuto oblast došlo k výraznému poklesu množství adsorbovaného enzymu. Snížení pH pod 3,5 nebylo možné kvůli stabilitě afinitního sorbentu. Množství adsorbovaného prasečího pepsinu A bylo jen nepatrně závislé na iontové síle adsorpční mobilní fáze (obr. 4.2). Při použití octanového pufru jako adsorpční mobilní fáze bylo dosaženo lepších výsledků než při použití fosforečnanového pufru, kdy byl získán nižší výtěžek prasečího pepsinu A.

Dále jsme se zabývali složením eluční mobilní fáze. Zjistili jsme, že v mobilní fázi obsažený 1 M NaCl nemá na desorpci prasečího pepsinu A žádný vliv (obr. 4.3). K desorpci 95% adsorbovaného prasečího pepsinu A došlo zvýšením pH z 3,7 na 6,0. Desorpce dalšího množství adsorbovaného enzymu bylo dosaženo 50 mM Tris pufrem pH 7,2 obsahujícím 1 M NaCl. Nevýhodou této desorpce bylo příliš vysoké pH, při kterém již dochází k ireverzibilní ztrátě proteolytické aktivity prasečího pepsinu A [22]. Nejvhodnější eluční mobilní fází byl 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 obsahující 0,3 M NaCl. Za těchto podmínek bylo dosaženo nejvyššího výtěžku pro prasečí pepsin A a nejostřejšího elučního píku. Chromatogram prasečího pepsinu A za nejvhodnějších podmínek je uveden na obr. 4.6c (viz str. 47).



Obr. 4.2 Vliv koncentrace adsorpční mobilní fáze na adsorpci prasečího pepsinu A na jodovanou L-tyrosin-Sepharosu
Chromatografické podmínky: adsorpce – 10 – 100 mM octanový pufr pH 4,0; eluce – 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 obsahující 0,3 M NaCl; vzorek – 1 ml roztoku prasečího pepsinu A (1mg/ml příslušné adsorpční mobilní fáze); průtoková rychlost – 1 ml/min; c – koncentrace octanového pufru pH 4,0.



Obr. 4.3 Chromatografie prasečího pepsinu A na jodované L-tyrosin-Sepharose
Chromatografické podmínky: I – 50 mM octanový pufr pH 3,7; II – 50 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 1 M NaCl; III – 50 mM octanový pufr pH 6,0; IV – 50 mM Tris pufr pH 7,2 obsahující 1 M NaCl; vzorek – 1 ml roztoku prasečího pepsinu A (2 mg/ml 50 mM octanového pufru pH 3,7); průtoková rychlost – 1 ml/min; pH odebíraných frakcí (1 ml) bylo upraveno 1 M HCl na hodnotu 2; sloupcový graf – proteolytická aktivita stanovená modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.).

Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze kolonou na výtěžek prasečího pepsinu A je uveden v tabulce 4.1. Je patrné, že při průtokové rychlosti 1 ml/min byl dosažen nejvyšší výtěžek (96%). Závislost plochy elučního píku na koncentraci aplikovaného roztoku prasečího pepsinu A byla lineární (R^2 = 0,999) v rozmezí koncentrací 0,125 – 2,000 mg/ml. Kapacita afinitního sorbentu pro prasečí pepsin A byla 41,5 mg enzymu na 1 ml sorbentu. Na koloně naplněné jodovanou L-tyrosin-Sepharosou bylo provedeno během jednoho měsíce 115 experimentů, aniž by na tomto sorbentu byly pozorovány změny v adsorpci či desorpci prasečího pepsinu A.

Tab. 4.1 Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze na výtěžek prasečího pepsinu A z jodované L-tyrosin-Sepharosy

Průtoková rychlost (ml/min)	Výtěžek (%)
0,3	85
0,5	81
1,0	96
1,3	79
1,5	76

Chromatografické podmínky: adsorpce – 25 mM octanový pufr pH 4,0; eluce – 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 obsahující 0,3 M NaCl; vzorek – 1 ml roztoku prasečího pepsinu A (1 mg/ml 25 mM octanového pufru pH 4,0); výtěžek – proteolytická aktivita desorbovaného enzymu vyjádřená v procentech proteolytické aktivity aplikovaného enzymu.

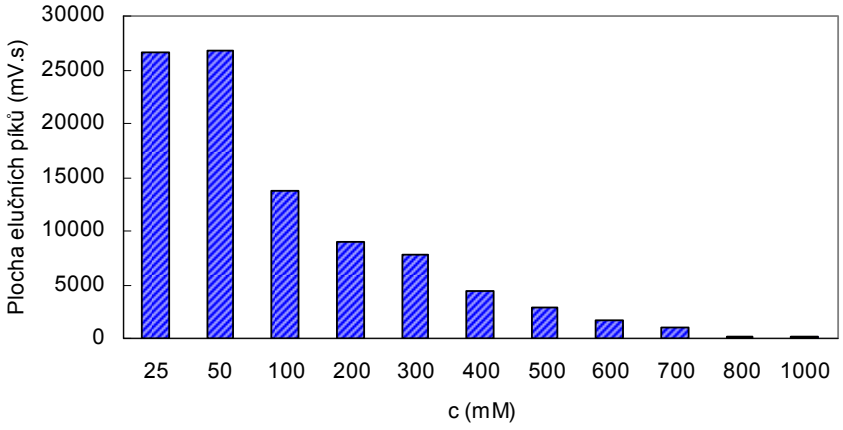
4.2.1.2. Ligand imobilizovaný na matrici přes svou karboxylovou skupinu

4.2.1.2.1. Optimalizace chromatografických podmínek pro prasečí pepsin A na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharose

Prasečí pepsin A byl na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosu adsorbován v oblasti pH 3,5 až 6,0. Při použití adsorpční mobilní fáze o pH 6,0 byla adsorbovaná proteasa eluována ve formě dvou částečně separovaných píků, které byly proteolyticky aktivní. Obdobný jev, tzn. desorpci adsorbovaného prasečího pepsinu A ve formě dvou částečně separovaných píků s proteolytickou aktivitou popsali už Arnoštová a spol.[89], avšak při použití jodované L-tyrosin-Sepharosy. Arnoštová a spol. dále zjistili, že se proteiny odpovídající těmto píkům nelišily stupněm fosforylace.

Dále byl zkoumán vliv iontové síly na vazbu prasečího pepsinu A se sorbentem. Nejvyšší adsorpce prasečího pepsinu A bylo dosaženo v 25 až 50 mM octanovém pufru pH 6,0 (obr. 4.4). Se zvyšující se koncentrací tohoto pufru docházelo ke snižování množství adsorbovaného enzymu. Obdobný vliv na adsorpci měla i mobilní fáze obsahující NaCl. Na adsorpci prasečího pepsinu A se pravděpodobně nepodílejí hydrofobní interakce, neboť na interakci enzymu s imobilizovaným ligandem měla iontová síla mobilní fáze negativní vliv.

Desorpce prasečího pepsinu A změnou pH na hodnotu 6,7 či změnou pH se současnou změnou složení mobilní fáze (MES, fosforečnanový pufr) neproběhla. Na rozdíl od dříve zmíněného sorbentu jodované L-tyrosin-Sepharosy neměla hodnota pH eluční mobilní fáze vliv na množství desorbovaného prasečího pepsinu A. Kompletní desorpce enzymu bylo dosaženo pouhým zvýšením iontové síly adsorpční mobilní fáze (1 M NaCl). Byl testován izokratický způsob eluce a lineární gradienty různé strmosti. Nejúčinnější separace elučních píků bylo dosaženo izokratickým způsobem eluce.

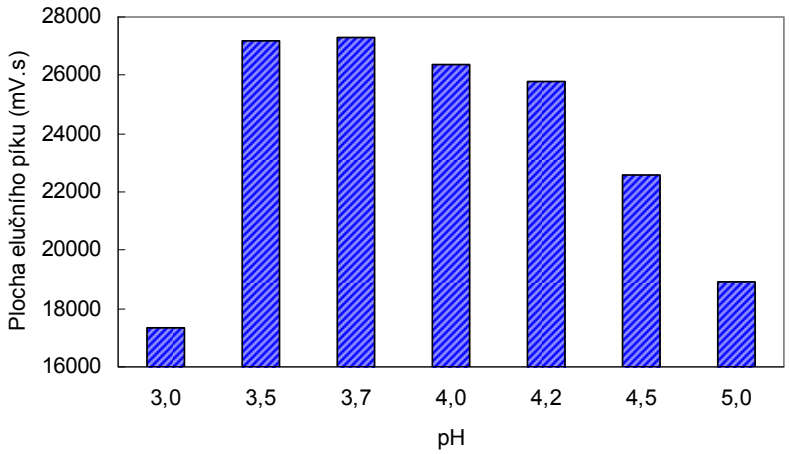


Obr. 4.4 Vliv koncentrace adsorpční mobilní fáze na adsorpci prasečího pepsinu A na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosu
Chromatografické podmínky: adsorpce – 25 – 1 000 mM octanový pufr pH 6,0; eluce – 100 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 1 M NaCl; vzorek – 1 ml roztoku prasečího pepsinu A (3 mg/ml příslušné adsorpční mobilní fáze); průtoková rychlost – 1 ml/min; c – koncentrace octanového pufru pH 6,0.

Závislost plochy elučních píků na koncentraci aplikovaného roztoku prasečího pepsinu A byla lineární (R^2 = 0,998) v rozmezí koncentrací 1 – 5 mg/ml. Kapacita afinitního sorbentu pro prasečí pepsin A byla 49,7 mg enzymu na 1 ml sorbentu a výtěžek pro prasečí pepsin A byl 88%. Na obrázku 4.6b (viz. str. 47) je uveden chromatogram prasečího pepsinu A za nejvhodnějších podmínek. Na koloně naplněné 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosou bylo provedeno během jednoho měsíce 110 experimentů, aniž by na tomto sorbentu byly pozorovány změny v adsorpci či desorpci prasečího pepsinu A.

4.2.1.2.2. Optimalizace chromatografických podmínek pro prasečí pepsin A na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose

Prasečí pepsin A byl na afinitní sorbent adsorbován v oblasti pH 3,5 – 3,7 (obr. 4.5). Při snížení/zvýšení pH pod/nad tuto oblast se část enzymu neadsorbovala. Množství adsorbovaného prasečího pepsinu A bylo také závislé na koncentraci adsorpční mobilní fáze (25 – 1 000 mM) a na obsahu NaCl v adsorpční mobilní fázi. K úplné adsorpci prasečího pepsinu A docházelo ve 25 – 100 mM octanovém pufru pH 3,7, který neobsahoval NaCl. Jako adsorpční mobilní fáze pro další pokusy byl zvolen 100 mM octanový pufr pH 3,7.



Obr. 4.5 Vliv pH adsorpční mobilní fáze na adsorpci prasečího pepsinu A na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosu
Chromatografické podmínky: adsorpce – 100 mM octanový pufr pH (3,0 – 5,0); eluce – 100 mM octanový pufr pH 5,4 obsahující 0,5 M NaCl; vzorek – 1 ml roztoku prasečího pepsinu A (3 mg/ml příslušné adsorpční mobilní fáze); průtoková rychlost – 1 ml/min; pH – 100 mM octanového pufru.

Kompletní desorpce prasečího pepsinu A z afinitního sorbentu neproběhla změnou pH na hodnotu 6,7. Při použití 100 mM fosforečnanového pufru pH 6,9 se prasečí pepsin A desorboval, ale eluční pík byl značně rozmytý. Navíc takto vysoké pH již není vhodné pro zachování proteolytické aktivity prasečího pepsinu A [22], a proto nebyla tato eluční mobilní fáze dále používána. Kompletní desorpce prasečího pepsinu A bylo dosaženo 100 mM octanovým pufrem pH 3,7 obsahujícím 0,5 M NaCl.

Závislost plochy elučního píku na koncentraci aplikovaného roztoku prasečího pepsinu A byla lineární (R^2 = 0,993) v rozmezí koncentrací 0,125 – 5,000 mg/ml. Kapacita afinitního sorbentu pro prasečí pepsin A byla 76,5 mg enzymu na 1 ml sorbentu a výtěžek prasečího pepsinu A byl 96%. Na obrázku 4.6a (viz str. 47) je uveden chromatogram prasečího pepsinu A za nejvhodnějších podmínek. Na koloně naplněné N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosou bylo provedeno během 1 roku a 3 měsíců 106 experimentů, aniž by

byly pozorovány na tomto sorbentu změny v adsorpci nebo desorpci prasečího pepsinu A. Porovnání charakteristik všech připravených afinitních sorbentů je uvedeno v tabulce 4.2.

Tab. 4.2 Porovnání charakteristik připravených afinitních sorbentů

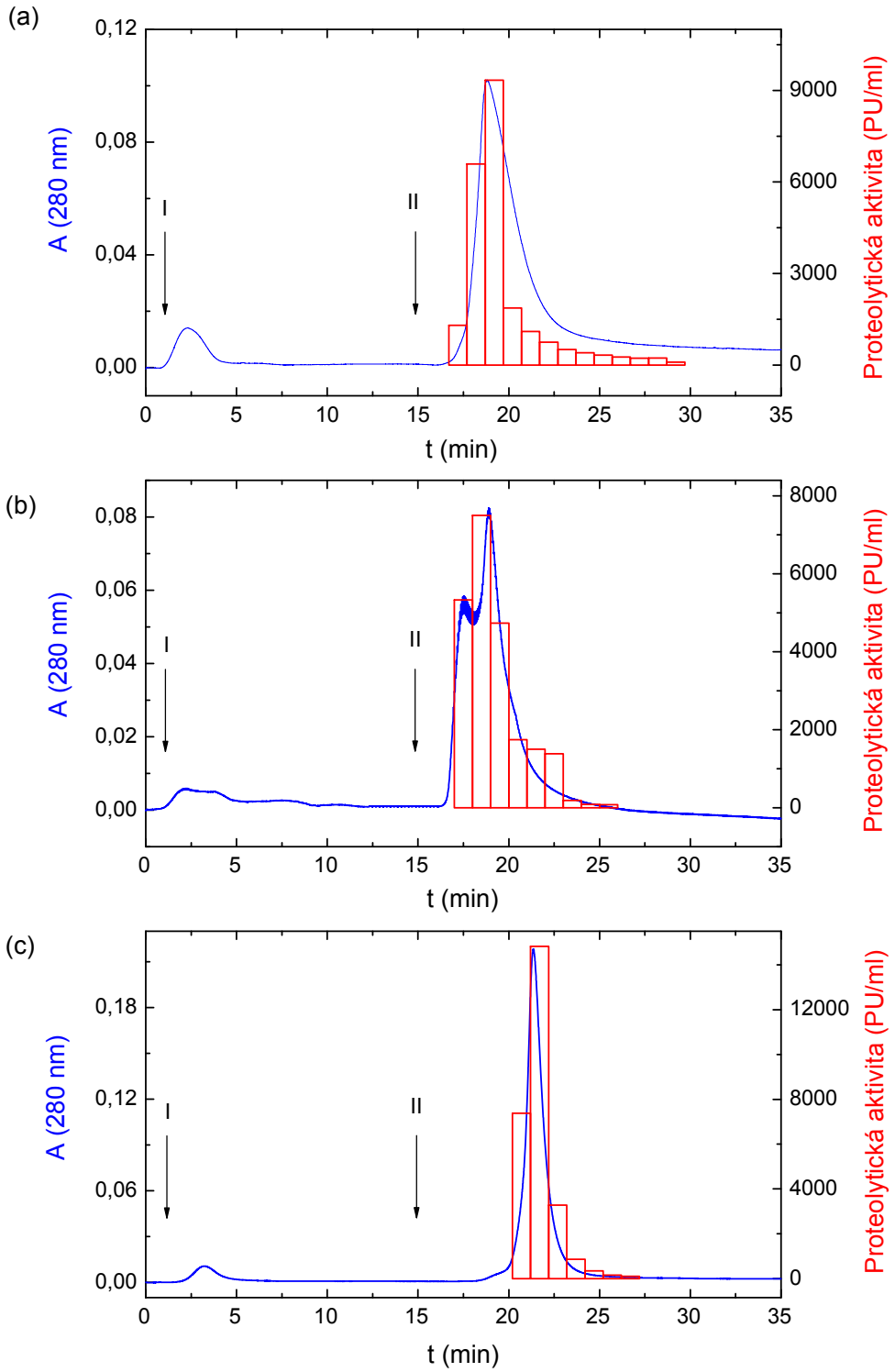
Charakteristika	N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa	3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa	Jodovaná L-tyrosin-Sepharosa
Opakovatelnost RSD (%)	2	4	5
Kapacita (mg/ml)	76,5	49,7	41,5
R^2	0,993	0,998	0,999
Výtěžek (%)	96	88	96
Adsorpční mobilní fáze (nejvhodnější)	100 mM octanový pufr pH 3,7	50 mM octanový pufr pH 6,0	25 mM octanový pufr pH 4,0
Eluční mobilní fáze (nejvhodnější)	100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 0,5 M NaCl	50 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 1 M NaCl	50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 obsahující 0,3 M NaCl

Opakovatelnost – vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD; v procentech) plochy elučního píku pro deset analýz provedených za nejvhodnějších podmínek pro prasečí pepsin A; kapacita – vyjádřena v mg prasečího pepsinu A adsorbovaného na 1 ml sorbentu; R^2 – regresní koeficient lineární závislosti plochy elučního píku na aplikovaném množství prasečího pepsinu A; výtěžek – proteolytická aktivita desorbovaného prasečího pepsinu A vyjádřená v procentech proteolytické aktivity aplikovaného enzymu.

4.2.2. Nespecifické sorpce na afinitních sorbentech

Při afinitní chromatografii dochází ke specifické a reverzibilní interakci mezi sledovanou látkou a ligandem. Jakékoli interakce jiných proteinů přítomných v separované směsi (např. s matricí nebo s oddalovacím můstkem) jsou považovány za nežádoucí. Proto jednou z požadovaných vlastností afinitních sorbentů jsou právě jejich nízké nespecifické interakce.

Pro zjišťování nespecifických sorpcí proteinů na afinitní sorbenty za nejvhodnějších podmínek pro prasečí pepsin A byly zvoleny následující proteiny: hovězí sérový albumin (BSA), kuřecí ovalbumin, trypsin a α-chymotrypsin z hovězího pankreatu. Z obrázku 4.7 je patrné, že všechno aplikované množství BSA se adsorbovalo na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosu a jodovanou L-tyrosin-Sepharosu. I zbylé testované proteiny se na oba tyto

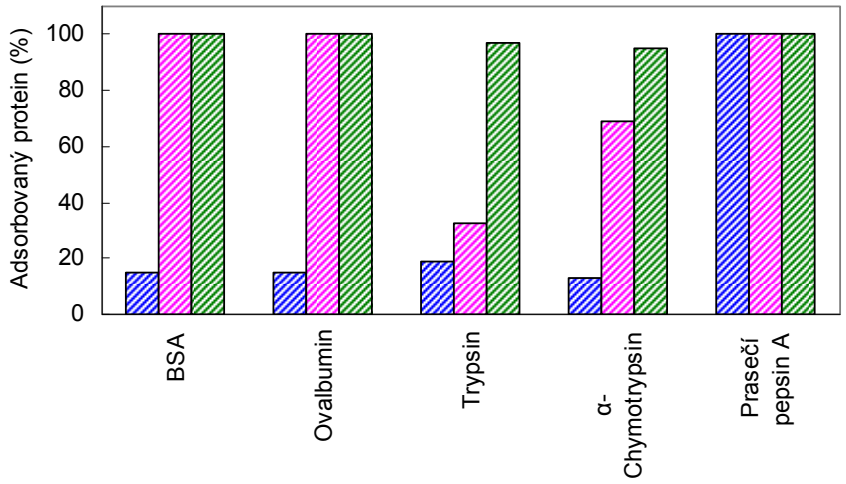


Obr. 4.6 Chromatografie prasečího pepsinu A na afinitních sorbentech za nejvhodnějších podmínek (**a**) N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa: I – 100 mM octanový pufr pH 3,7; II – 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 0,5 M NaCl; (**b**) 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa: I – 50 mM octanový pufr pH 6,0; II – 50 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 1,0 M NaCl; (**c**) jodovaná L-tyrosin-Sepharosa: I – 25 mM octanový pufr pH 4,0; II – 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 obsahující 0,3 M NaCl; vzorek – 1 ml roztoku prasečího pepsinu A (1 mg/ml příslušné adsorpční mobilní fáze); průtoková rychlost – 1 ml/min; sloupcový graf – proteolytická aktivita stanovená modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.).

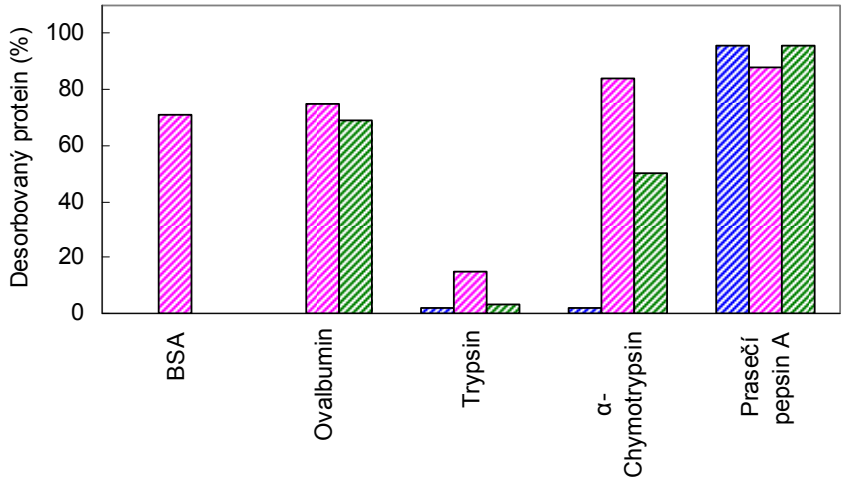
sorbenty adsorbovaly ve velkém množství (minimálně z 33%). Ani jeden z těchto testovaných adsorbovaných proteinů není ze sorbentů kompletně desorbován za nejvhodnějších elučních podmínek pro prasečí pepsin A (obr. 4.8). Naproti tomu N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa vykazuje v případě všech uvedených testovaných proteinů nespecifické interakce pouze do 19% (obr. 4.7). Za použitých nejvhodnějších elučních podmínek pro prasečí pepsin A bylo desorbováno z tohoto sorbentu jen nepatrné či žádné množství z nespecificky adsorbovaných proteinů (obr. 4.8).

Afinitní sorbenty používané v této práci jsou strukturně podobné thiofilním sorbentům, tzv. T-gelům (viz kap. 4.1.) [97, 98]. Bylo zjištěno, že při thiofilní chromatografii proteinů krevního séra jsou na T-gely přednostně adsorbovány imunoglobuliny, ale v případě o imunoglobuliny ochuzeného séra je hlavním adsorbovaným proteinem albumin [100].

Dále byly sledovány nespecifické interakce afinitních sorbentů v oblasti pH stability pepsinogenů (pH 5,0 – 8,5) [11, 16, 22]. Bylo zjištěno, že při pH 7,2 dochází ke kompletní adsorpci prasečího PG A na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosu, ale zároveň při daném pH tento sorbent vykazoval vysoké nespecifické interakce. Za daných podmínek se adsorbovalo kompletní množství aplikovaného BSA i ovalbuminu. Trypsin a α-chymotrypsin se adsorboval z 32% a 44%. Také 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa vykazovala za podmínek pH stability pepsinogenů (pH 6,0) velmi vysoké nespecifické interakce (viz obr. 4.7).



Obr. 4.7 Adsorpce proteinů na afinitní sorbenty za nejvhodnějších adsorpčních podmínek pro prasečí pepsin A
Chromatografické podmínky viz obr. 4.6; vzorek – 1 ml roztoku proteinu (1 mg/ml příslušné adsorpční mobilní fáze); adsorbovaný protein – množství adsorbovaného proteinu vyjádřené v procentech aplikovaného proteinu (100%); modře – N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa; růžově – 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa; zeleně – jodovaná L-tyrosin-Sepharosa.



Obr. 4.8 Desorpce proteinů z afinitních sorbentů za nejvhodnějších elučních podmínek pro prasečí pepsin A Chromatografické podmínky viz obr. 4.6; vzorek – 1 ml roztoku proteinu (1 mg/ml příslušné adsorpční mobilní fáze); desorbovaný protein – množství desorbovaného proteinu vyjádřené v procentech adsorbovaného proteinu (100%); modře – N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa; růžově – 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa; zeleně – jodovaná L-tyrosin-Sepharosa.

4.2.3. Studium interakce prasečího pepsinu A s afinitními sorbenty

4.2.3.1. Úloha aktivního místa při interakci enzymu se sorbentem

K ověření hypotézy, že se na interakci prasečího pepsinu A s připravenými afinitními sorbenty podílí aktivní místo enzymu, byl použit prasečí pepsinogen A a komplex prasečího pepsinu A s přirozeným inhibitorem – pepstatinem A. Po inkubaci prasečího pepsinu A s pepstatinem A byl roztok komplexu aplikován na kolonu. Z porovnání (obr. 4.9, str. 51) chování komplexu prasečího pepsinu A s pepstatinem A s chováním samotného prasečího pepsinu A na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose bylo zjištěno, že přítomnost inhibitoru nemá žádný vliv na interakci prasečího pepsinu A s imobilizovaným ligandem. Prasečí pepsin A byl v obou případech adsorbován a desorbován za stejných podmínek. V přítomnosti pepstatinu A byl prasečí pepsin A desorbován ve formě inaktivního komplexu, což bylo potvrzeno stanovením proteolytické aktivity. Shodné výsledky byly získány i v případě 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosy a jodované L-tyrosin-Sepharosy (výsledky nejsou zobrazeny). Pepstatin A se váže prostřednictvím nekovalentních interakcí s aktivním místem enzymu [33, 34], čímž zamezuje přístupu substrátu do aktivního místa. Proto můžeme z pozorování vyvozovat, že se aktivní místo prasečího pepsinu A nepodílí na interakci s ligandem ani jednoho z testovaných sorbentů. Chování prasečího pepsinu A a jeho komplexu s pepstatinem A s použitými deriváty aromatických aminokyselin imobilizovanými na Sepharose, se lišilo od chování

stejného enzymu a jeho komplexu s inhibitorem na Phenyl-Sepharose (tab. 4.3) [101]. Komplex prasečího pepsinu A s pepstatinem A se ve srovnání s enzymem bez přítomného inhibitoru adsorboval na Phenyl-Sepharosu o 34% méně [101].

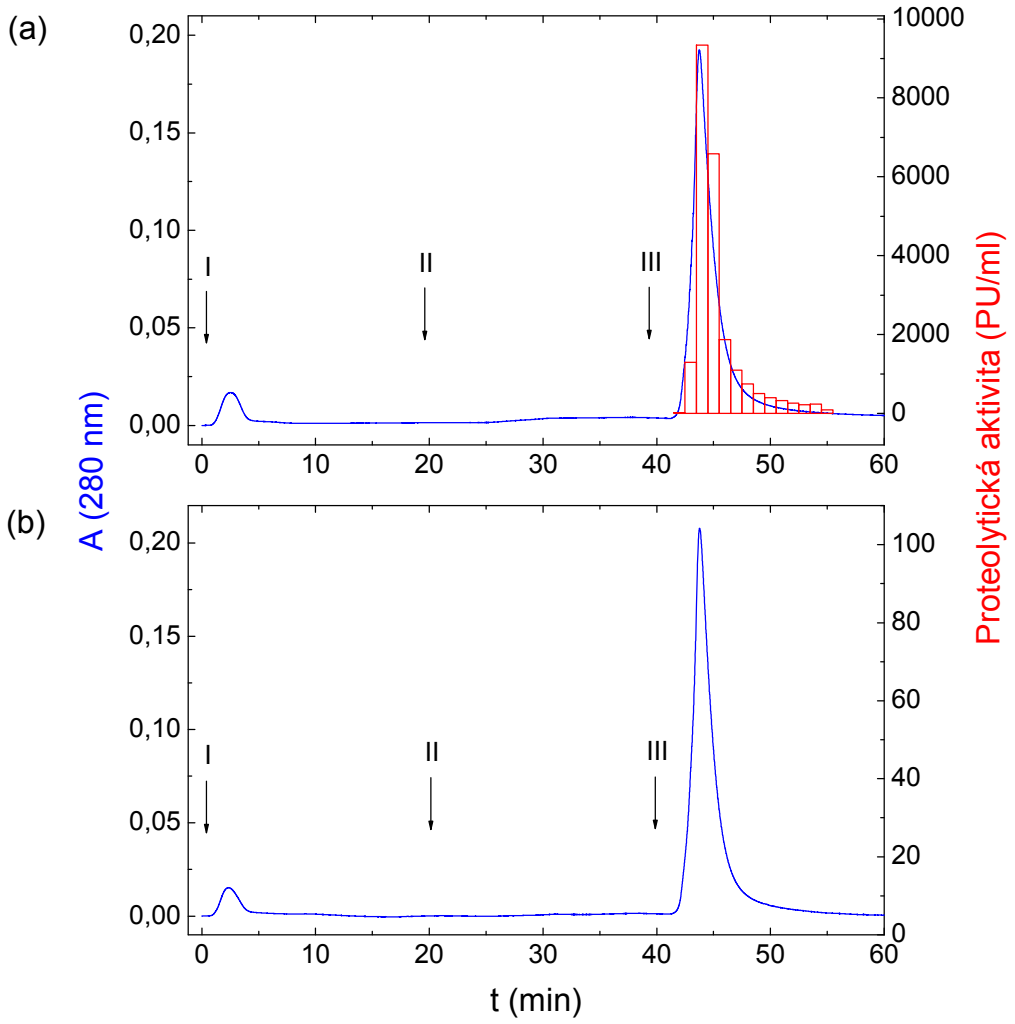
K dalšímu potvrzení, že dochází k interakci enzymu se sorbentem přes jiné než jeho aktivní místo, byl použit prasečí pepsinogen A. N-koncovou část polypeptidového řetězce prasečího pepsinogenu A tvoří aktivační peptid, který překrývá aktivní místo enzymu a tím zamezuje přístupu substrátu do tohoto místa [11, 22]. Na rozdíl od Phenyl-Sepharosy, kde s imobilizovaným ligandem prasečí pepsinogen A vůbec neinteragoval a kde pepstatin A částečně inhiboval interakci proteasy s tímto ligandem [101], byl prasečí pepsinogen A na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosu a 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosu kompletně adsorbován (tab. 4.3). Tím bylo opět potvrzeno, že se aktivní místo proteasy na vazbě s těmito sorbenty nepodílí. V případě jodované L-tyrosin-Sepharosy se prasečí pepsinogen A za použitých podmínek (pH 6,5 a pH 6,0) prakticky vůbec neadsorboval.

Na desorpci prasečího pepsinu A ze sorbentů s imobilizovanými deriváty aminokyselin neměla vliv přítomnost příslušného volného ligandu v mobilní fázi. Z N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosy nebyl adsorbovaný prasečí pepsin A desorbován mobilní fází obsahující N-acetyl-L-fenylalanin (obr. 4.9). Ani u jodované L-tyrosin-Sepharosy a 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosy neměla mobilní fáze obsahující 3,5-dijod-L-tyrosin žádný vliv na desorpci vázaného prasečího pepsinu A (výsledky nejsou zobrazeny).

Tab. 4.3 Porovnání chromatografického chování prasečího pepsinu A a pepsinogenu A na připravených afinitních sorbentech a Phenyl-Sepharose [101]

Sorbent	Adsorbovaný protein (%)			Cit.
	Pepsin A	Pepsin A + pepstatin A	Pepsinogen A	
Phenyl-Sepharosa	95	61	0	[101]
N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa	100	100	100	*
3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa	100	100	100	*
Jodovaná L-tyrosin-Sepharosa	100	100	0	*

* Tato práce

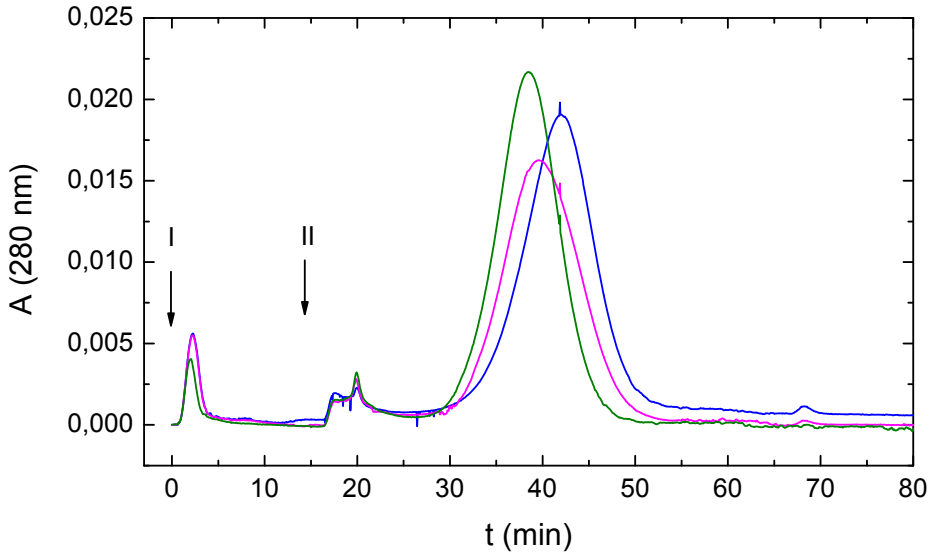


Obr. 4.9 Vliv absence (**a**) a přítomnosti (**b**) pepstatinu A na interakci prasečího pepsinu A s N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosou
Chromatografické podmínky: I – 100 mM octanový pufr pH 3,7; II – 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující N-acetyl-L-fenylalanin ((1 mg + 2 µl N,N-dimethylformamidu)/ml); III – 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 0,5 M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min; (**a**) vzorek – 1 ml roztoku prasečího pepsinu A (1 mg/ml 100 mM octanového pufru pH 3,7); (**b**) vzorek – 1 ml roztoku směsi ((1 mg prasečího pepsinu A a 1 mg pepstatinu A)/ml 100 mM octanového pufru pH 3,7); sloupcový graf – proteolytická aktivita stanovená modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.).

4.2.3.2. Vliv přítomnosti fosfátové skupiny v molekule prasečího pepsinu A na jeho interakci s N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosou

Prasečí pepsin A je tvořen jediným polypeptidovým řetězcem o délce 327 aminokyselinových zbytků, který obsahuje jednu fosfátovou skupinu vázanou na serinovém zbytku v pozici 68 polypeptidového řetězce [12, 13, 102]. Pro studium vlivu přítomnosti fosfátové skupiny v molekule prasečího pepsinu A na jeho interakci s N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosou, byl studovaný enzym defosforylován.

Pro defosforylaci prasečího pepsinu A byla použita kyselá fosfatasa z brambor (EC 3.1.3.2), která byla imobilizována na magnetické částice. Na obrázku 4.10 je porovnáno chování prasečího pepsinu A ($2{,}8.10^{-5}$ mol fosforu na 1 g proteinu), jeho částečně defosforylované formy ($0{,}2.10^{-5}$ mol fosforu na 1 g proteinu) a směsi obou forem v poměru 1:1 na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose. Z obrázku je patrné, že retenci prasečího pepsinu A částečně ovlivňuje i přítomnost fosfátové skupiny v molekule enzymu, protože jeho defosforylovaná forma měla na rozdíl od nativní kratší retenční čas.



Obr. 4.10 Vliv přítomnosti fosfátové skupiny v molekule prasečího pepsinu A na jeho interakci s N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosou
Chromatografické podmínky: I – 100 mM octanový pufr pH 3,7; II – 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 0,5 M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min; vzorek – 1 ml roztoku proteinu (1mg/ml 100 mM octanového pufru pH 3,7): prasečího pepsinu A (modrý chromatogram); částečně defosforylované formy prasečího pepsinu A (zelený chromatogram); směsi obou forem v poměru 1:1 (růžový chromatogram).

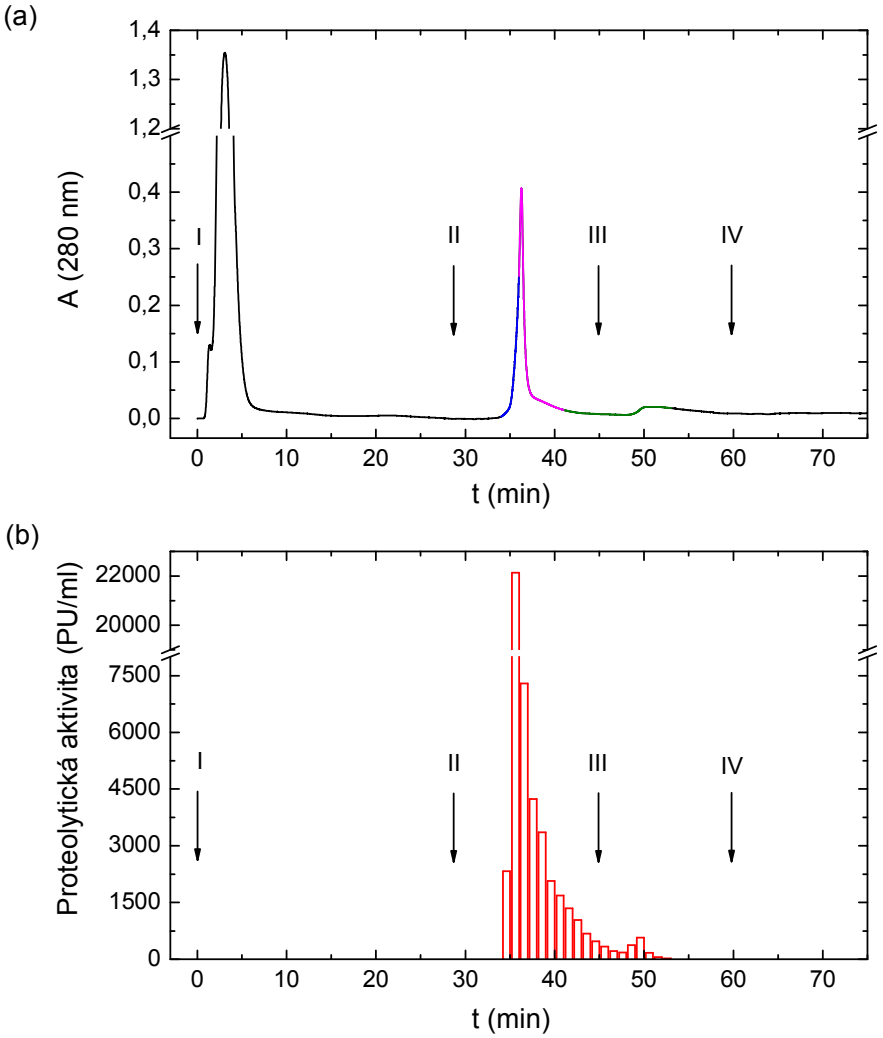
4.3. Separace pepsinu A a pepsinu C

Většina dosud popsaných postupů pro izolaci a separaci lidských pepsinů a pepsinogenů zahrnuje kombinaci chromatografických metod na různém principu (např. iontově-výměnnou a afinitní chromatografii [75, 76, 86]) nebo opakované použití iontově-výměnné chromatografie [68, 70, 71, 77, 82]. V této práci byla pro izolaci a separaci lidských pepsinů použita pouze afinitní chromatografie na připravených sorbentech. Nejdříve byly separovány proteiny a peptidy z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice za nejvhodnějších podmínek určených pro prasečí pepsin A. Větší pozornost byla věnována izolaci a separaci lidských pepsinů na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose.

4.3.1. Separace lidských pepsinů na jodované L-tyrosin-Sepharose

Na jodované L-tyrosin-Sepharose byly separovány pepsiny z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice (obr. 4.11) za podmínek vycházejících z nejvhodnějších podmínek pro separaci prasečího pepsinu A. Prasečí pepsin A, lidský pepsin A i lidský pepsin C vykazovaly na tomto sorbentu podobné chování. Adsorpce všech zmíněných pepsinů probíhala za shodných podmínek. Oba lidské pepsiny (obr. 4.11) byly na sorbent kompletně adsorbovány v 25 mM octanovém pufru pH 4,0. Žádný z pepsinů nebyl desorbován zvýšením iontové síly (1M NaCl, výsledky nejsou zobrazeny). Kompletní desorpce pepsinu A a neúplná desorpce pepsinu C byla dosažena zvýšením pH na hodnotu 6,0 (obr. 4.11). K dosažení kompletní desorpce pepsinu C bylo nutné ještě další zvýšení pH eluční mobilní fáze na hodnotu 8,0. Za těchto podmínek byl výtěžek 91%, což mohlo být způsobeno i použitím příliš vysokého pH (pH 8,0). Při tomto pH již dochází k denaturaci lidských pepsinů [10, 17].

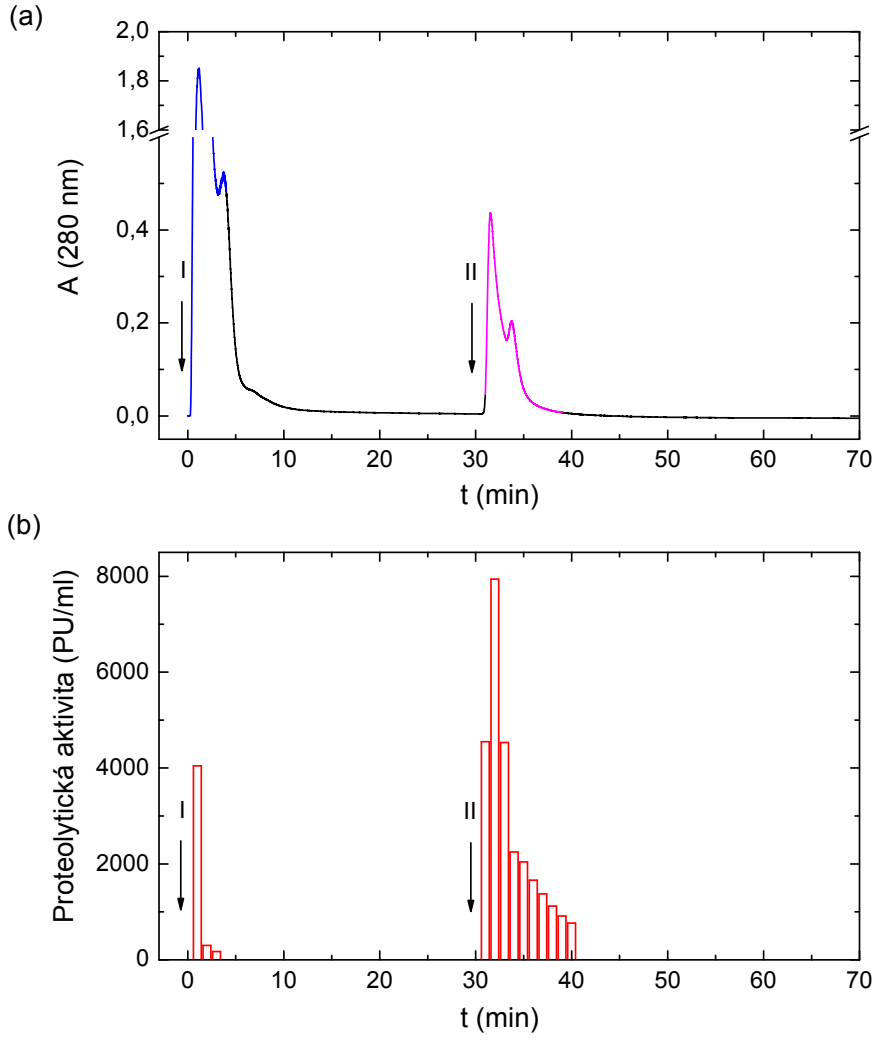
Identifikace pepsinů v odebraných frakcích byla provedena hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF. Z obrázku 4.11a je patrné, že nejdříve byl z jodované L-tyrosin-Sepharosy desorbován pepsin A (35. až 36. min; vyznačeno modře), poté směs pepsinu A a pepsinu C (37. až 41. min; vyznačeno růžově) a jako poslední pepsin C (42. až 53. min; vyznačeno zeleně). Pepsiny z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice byly purifikovány 5,8-násobně.



Obr. 4.11 Separace lidských pepsinů z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice na jodované L-tyrosin-Sepharose
Chromatografické podmínky: I – 25 mM octanový pufr pH 4,0; II – 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0; III – 50 mM fosforečnanový pufr pH 8,0; IV – 50 mM fosforečnanový pufr pH 8,0 obsahující 1M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min; vzorek – 1 ml okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice; (**a**) chromatogram s vyznačenými lidskými pepsiny: modrá část – pepsin A; růžová část – směs pepsinu A a pepsinu C; zelená část – pepsin C; (**b**) proteolytická aktivita stanovená modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.); pH frakcí upraveno 1 M HCl na hodnotu 2.

4.3.2. Separace lidských pepsinů na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharose

Okyselený homogenát lidské žaludeční sliznice byl podroben chromatografii na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharose. Za podmínek nejvhodnějších pro separaci prasečího pepsinu A nebyly lidské pepsiny kompletně adsorbovány (obr. 4.12). Ve frakcích, které se na afinitní sorbent neadsorbovaly, byla detegována proteolytická aktivita. Adsorbované lidské pepsiny byly stejně jako prasečí pepsin A desorbovány pouhým zvýšením iontové síly (1 M NaCl). Identifikace lidských pepsinů ve frakcích po afinitní chromatografii byla provedena hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF. Bylo zjištěno, že se na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosu adsorboval kompletně lidský pepsin C a jen část pepsinu A (obr. 4.12a).



Obr. 4.12 Chromatografie lidských pepsinů z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice na 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharose
Chromatografické podmínky: I – 50 mM octanový pufr pH 6,0; II – 50 mM octanový pufr pH 6,0 obsahující 1 M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min; vzorek – 1 ml okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice; (**a**) chromatogram s vyznačenými lidskými pepsiny: modrá část – pepsin A; růžová část – směs pepsinu A a pepsinu C; (**b**) proteolytická aktivita stanovená modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.).

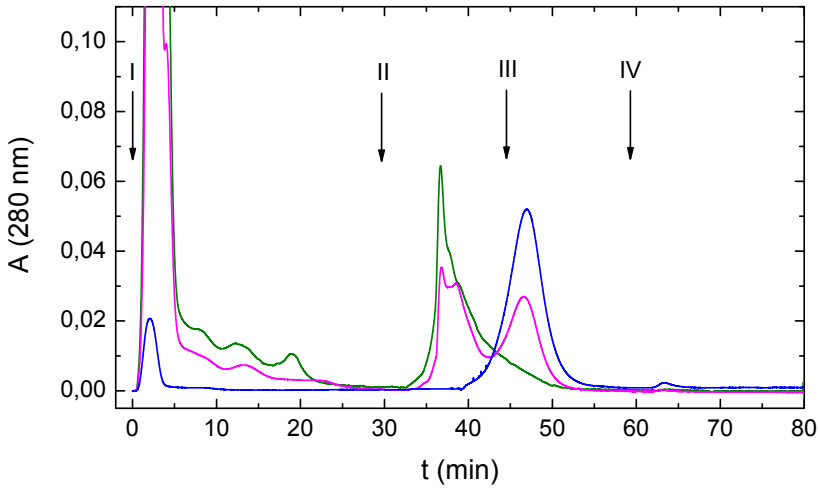
4.3.3. Izolace a separace pepsinu A a pepsinu C na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose

N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa byla nejdříve použita k separaci modelové směsi pepsinů (prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C). Poté byla studována možnost využití tohoto sorbentu pro separaci a izolaci lidských pepsinů.

4.3.3.1. Separace prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C

K ověření možnosti separovat pepsiny na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose sloužila modelová směs pepsinů (směs potkaního pepsinu C a komerčně dodávaného prasečího pepsinu A). Žaludeční sliznice dospělého potkana produkuje pouze pepsinogen C [4]. K aktivaci pepsinogenu na aktivní pepsin dochází při pH nižším než 5,0 (cit. [11]). Proto bylo pH homogenátu žaludeční sliznice potkana upraveno 1 M kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 3. Filtrát takto upraveného homogenátu byl aplikován na kolonu. Průběh chromatografií jednotlivých pepsinů a jejich směsi je uveden na obrázku 4.13. Ve frakcích, které se na afinitní sorbent neadsorbovaly, nebyla detegována žádná proteolytická aktivita. Z obrázku 4.13 je patrné, že k separaci obou adsorbovaných pepsinů docházelo zvyšováním iontové síly (NaCl) v mobilní fázi.

Jednotlivé pepsiny ze směsi byly identifikovány porovnáním chromatogramů samotných pepsinů s chromatogramem směsi obou pepsinů. Navíc proteiny z frakcí odpovídajících 39. a 47. minutě byly podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru. Ve frakci ze 39. minuty byl identifikován potkaní pepsin C a ve frakci ze 47. minuty prasečí pepsin A. Nejdříve byl z N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosy desorbován potkaní pepsin C a následně prasečí pepsin A. Získané výsledky ukázaly, že afinitní chromatografie na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose umožňuje separovat pepsin A a pepsin C.

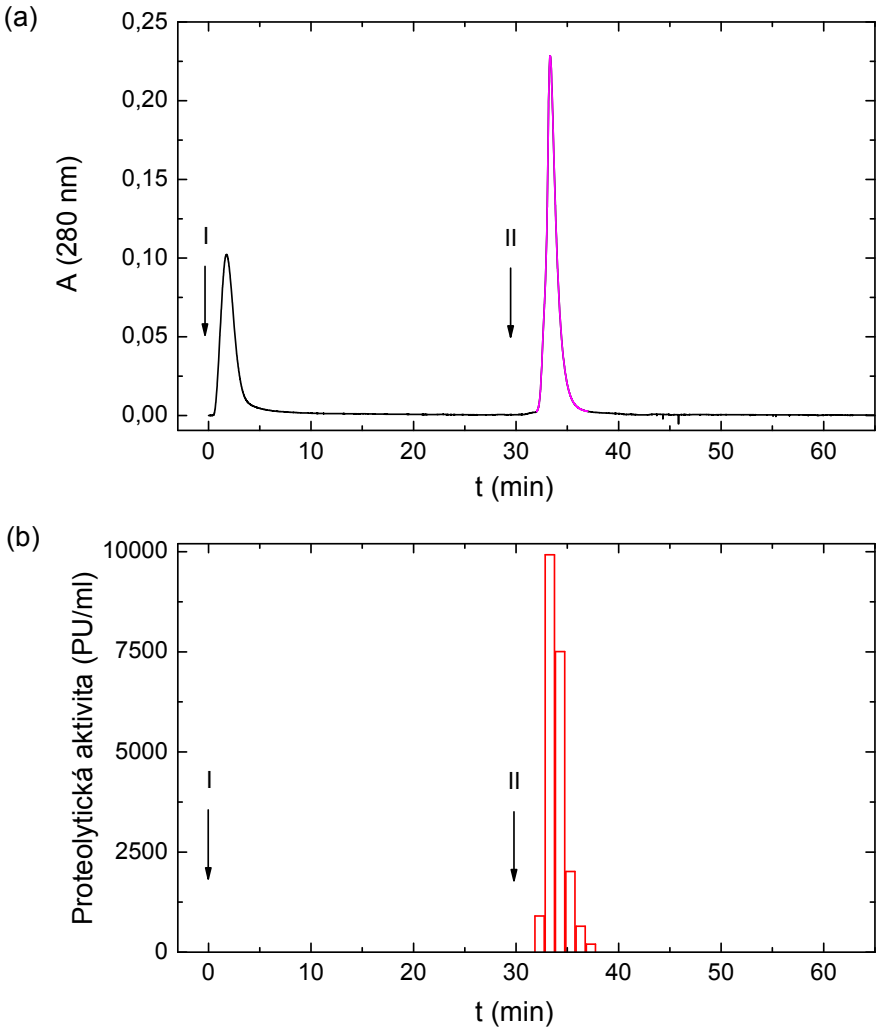


Obr. 4.13 Chromatografie prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose Chromatografické podmínky: I – 100 mM octanový pufr pH 3,7; II – lineární gradient 0 – 0,5 M NaCl ve 100 mM octanovém pufru pH 3,7 (15 minut); III – 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 0,5 M NaCl; IV – 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 1 M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min; vzorek – 1 ml roztoku vzorku: okyseleného homogenátu žaludeční sliznice potkana (1,3 mg proteinů/ml; zelený chromatogram); směsi prasečího pepsinu A a okyseleného homogenátu žaludeční sliznice potkana v poměru 1:1 (0,99 mg/ml; růžový chromatogram); prasečího pepsinu A (0,89 mg/ml; modrý chromatogram).

4.3.3.2. Separace a izolace lidského pepsinu A a pepsinu C

Při hledání podmínek separace lidských pepsinů na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose byla použita lyofilizovaná lidská žaludeční šťáva nebo okyselený homogenát lidské žaludeční sliznice. Pepsinogeny z homogenátu žaludeční sliznice byly před analýzou nejdříve aktivovány na pepsiny okyselením homogenátu 1 M kyselinou chlorovodíkovou na pH 3,0. Při aplikaci filtrátu takto upraveného homogenátu žaludeční sliznice na afinitní sorbent, nedošlo k adsorpci cca 66% pepsinů. To bylo pravděpodobně způsobeno příliš vysokou iontovou silou roztoku vzorku. Proto byl filtrát před aplikací na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosu dialyzován proti adsorpční mobilní fázi. Potom již bylo dosaženo kompletní adsorpce obou lidských pepsinů. Stejně jako prasečí pepsin A se i oba lidské pepsiny na afinitní sorbent kompletně adsorbovaly ve 100 mM octanovém pufru pH 3,7. Při použití 0,1% nebo 0,3% octové kyseliny jako adsorpční mobilní fáze nebyly adsorbovány 3%, respektive 32% proteolyticky aktivních složek vzorku. Stejně jako v případě prasečího pepsinu A se prakticky žádné množství lidských pepsinů nedesorbovalo změnou pH. Oba lidské pepsiny byly kompletně desorbovány pouhým zvýšením iontové síly (1 M NaCl) (obr. 4.14). Průběh purifikace pepsinů z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice je shrnut

v tabulce 4.4. Dialýzou okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice bylo dosaženo 2,7-násobné purifikace. Během dialýzy pravděpodobně došlo k odstranění peptidů ze vzorku, které pravděpodobně vznikly při aktivaci pepsinogenů na pepsiny a jejich následnou proteolytickou aktivitou.



Obr. 4.14 Purifikace pepsinů z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose
Chromatografické podmínky: I – 100 mM octanový pufr pH 3,7; II – 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 1 M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min; vzorek – 1 ml okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice po dialýze proti 100 mM octanovému pufru pH 3,7 (koncentrace proteinů 0,927 mg/ml); (**a**) růžová část chromatogramu – směs lidského pepsinu A a pepsinu C; (**b**) proteolytická aktivita stanovená modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.).

Tab. 4.4 Průběh purifikace pepsinů z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice

	Množství proteinů (mg)	Specifická aktivita (PU/mg)	Stupeň purifikace (-krát)
Okyselený homogenát lidské žaludeční sliznice	3,086	10 400	1
Dialýza*	0,927	28 300	2,7
N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa**	0,427	49 200	4,7

* dialýza proti 100 mM octanovému pufru pH 3,7 (2 × 2 h a 1 × 16 h při teplotě 4°C)

**chromatografické podmínky viz obr. 4.14

Při hledání nejvhodnějších podmínek separace lidského pepsinu A a pepsinu C byly testovány lineární gradienty různé strmosti. Na obrázku 4.15a je uveden chromatogram separace lidských pepsinů z žaludeční šťávy na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose za nejvhodnějších podmínek. Oba pepsiny byly za těchto podmínek na sorbent kompletně adsorbovány. Neadsorbované proteiny nebyly proteolyticky aktivní (obr. 4.15b) a pravděpodobně se tedy nejednalo o pepsiny. Identifikace pepsinů po afinitní chromatografii byla provedena hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF/TOF. Nejdříve byl z N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosy desorbován pepsin C (19. až 21. min; vyznačeno zeleně na obr. 4.15a), poté směs pepsinu A a pepsinu C (22. až 24. min; vyznačeno růžově na obr. 4.15a) a nakonec pepsin A (25. až 36. min; vyznačeno modře na obr. 4.15a). Lidské pepsiny z žaludeční šťávy byly purifikovány afinitní chromatografií 1,3-násobně a výtěžek byl 96%.

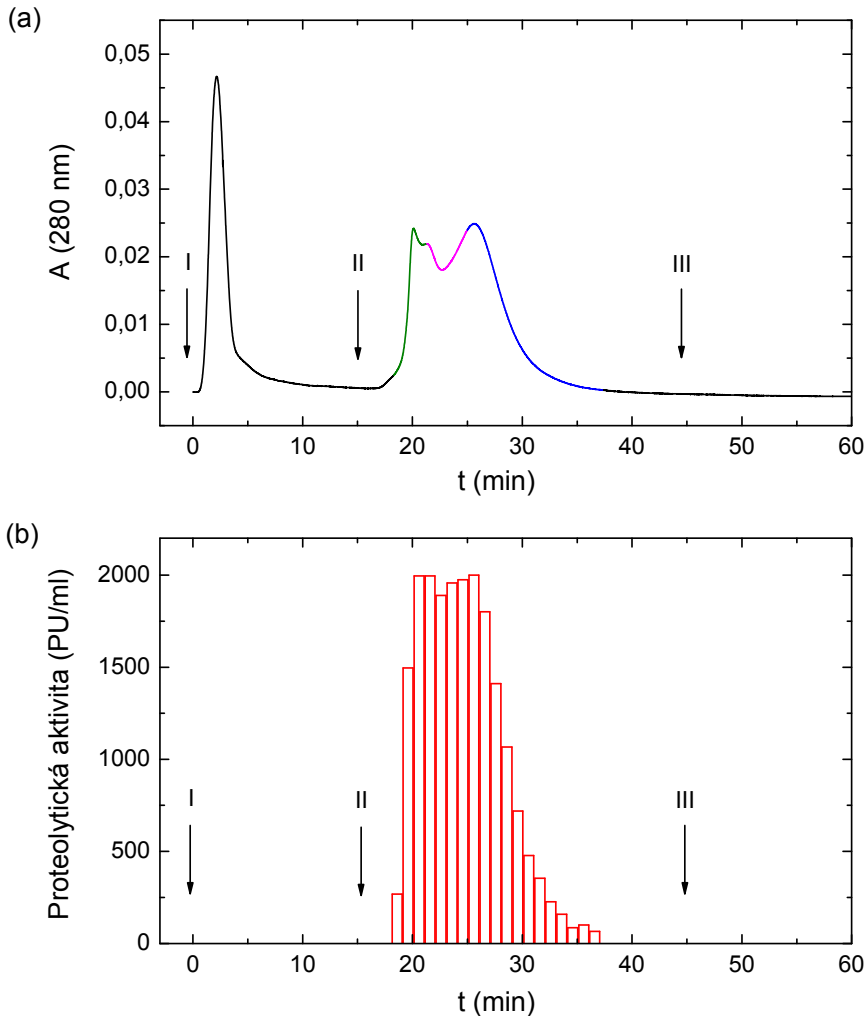
Bylo zjištěno, že afinitní chromatografií na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose je možné izolovat a částečně i separovat lidský pepsin A a pepsin C. Jednou z nevýhod použití okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice, oproti použití lyofilizované lidské žaludeční šťávy, byla nutnost aktivace pepsinogenů na pepsiny a následná dialýza vzorku.

4.4. Separace lidských pepsinogenů na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose

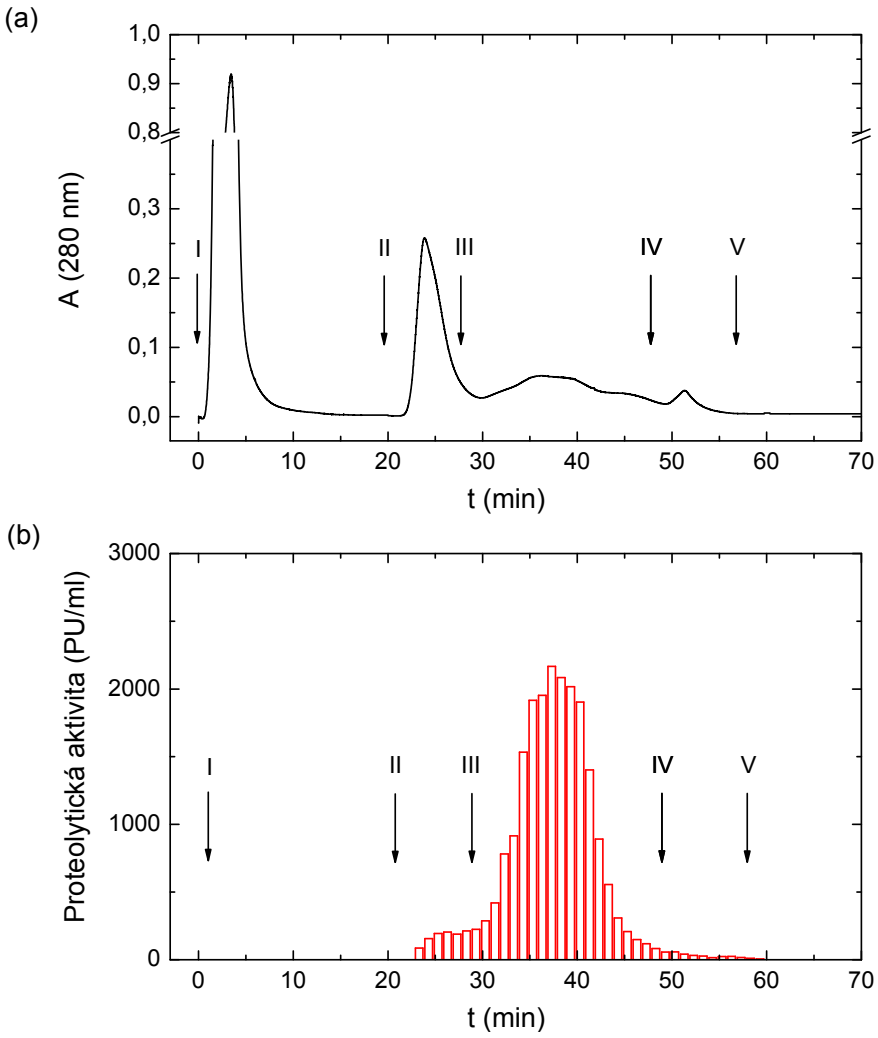
Pepsinogen A a pepsinogen C z homogenátu lidské žaludeční sliznice byly separovány na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose (obr. 4.16). Chování obou lidských pepsinogenů a modelového proteinu (prasečího pepsinogenu A) bylo na tomto afinitním sorbentu velmi podobné. Všechny zmíněné pepsinogeny byly na sorbent adsorbovány v 25 mM Tris pufru pH 7,2. Neadsorbované frakce nebyly proteolyticky aktivní (aktivita byla stanovena po úpravě pH na 3). Adsorbované pepsinogeny byly desorbovány pouhým zvýšením iontové síly (NaCl,

obr. 4.16) a výtěžek byl 91%. I přes vysoké nespecifické interakce tohoto sorbentu (viz kap. 4.2.2.) se podařilo lidské pepsinogeny z homogenátu žaludeční sliznice purifikovat na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose 3-násobně.

Identifikace lidských pepsinogenů separovaných na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose byla provedena nativní polyakrylamidovou gelovou elektroforézou s vizualizací jednotlivých pepsinogenů na základě proteolytické aktivity po jejich aktivaci (obr. 4.17). Pepsinogeny se v gelu jevily jako bílé pruhy na modrém pozadí.

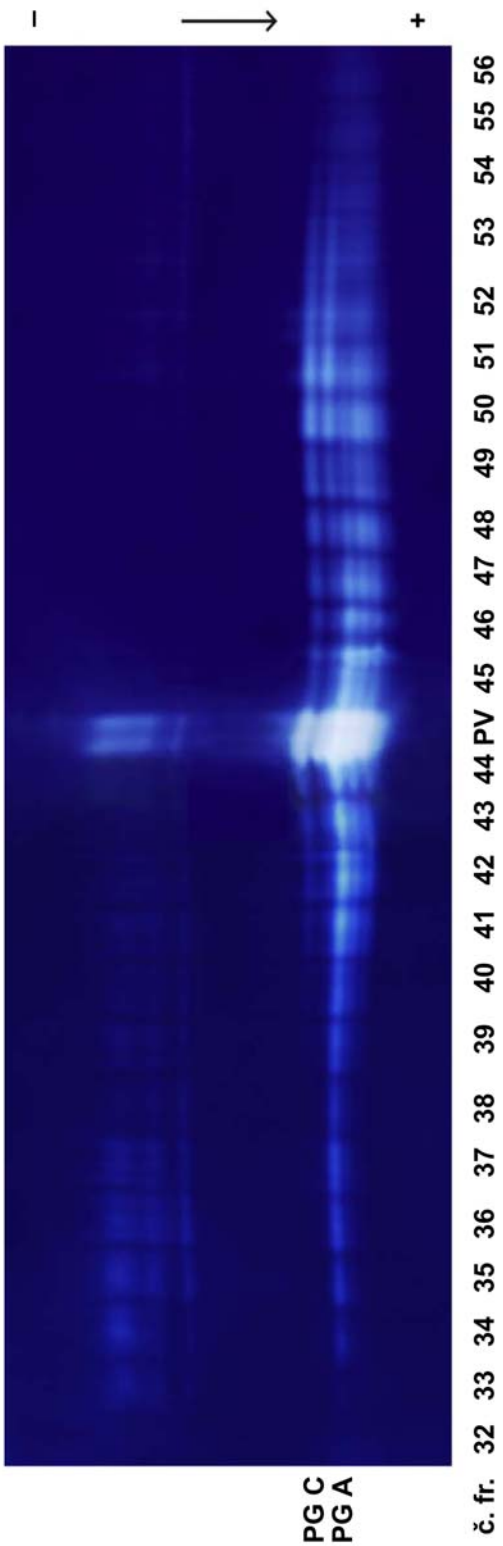


Obr. 4.15 Separace lidských pepsinů z žaludeční šťávy na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose
Chromatografické podmínky: I – 100 mM octanový pufr pH 3,7; II – lineární gradient 0,1 – 0,5 M NaCl ve 100 mM octanovém pufru pH 3,7 (30 minut); III – 100 mM octanový pufr pH 3,7 obsahující 0,5 M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min; vzorek – 1 ml roztoku lyofilizované lidské žaludeční šťávy (0,679 mg proteinů/ml 100 mM octanového pufru pH 3,7); (**a**) chromatogram s vyznačenými lidskými pepsiny: modrá část - pepsin A; růžová část – směs pepsinu A a pepsinu C; zelená část – pepsin C; (**b**) proteolytická aktivita stanovená modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.).



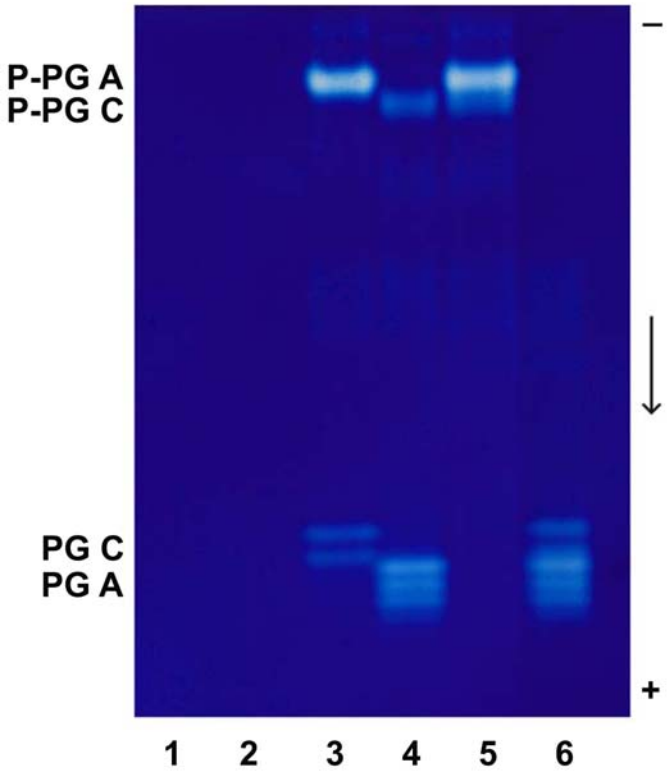
Obr. 4.16 Separace lidských pepsinogenů z homogenátu lidské žaludeční sliznice na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose
Chromatografické podmínky: I – 25 mM Tris pufr pH 7,2; II – 25 mM Tris pufr pH 7,2 obsahující 0,18 M NaCl; III – lineární gradient 0,18 - 0,50 M NaCl v 25 mM Tris pufru pH 7,2 (20 ml); IV – lineární gradient 0,5 – 1,0 M NaCl v 25 mM Tris pufru pH 7,2 (10 ml); V – 25 mM Tris pufr pH 7,2 obsahující 1 M NaCl; průtoková rychlost – 1 ml/min; vzorek – 1 ml homogenátu lidské žaludeční sliznice; (**a**) chromatogram separace lidských pepsinogenů z homogenátu žaludeční sliznice; (**b**) proteolytická aktivita stanovená modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského (viz kap. 3.12.2.) po předchozí aktivaci pepsinogenů na pepsiny.

Pro identifikaci jednotlivých pepsinogenů z homogenátu lidské žaludeční sliznice byly použity protilátky (viz kap. 3.11. a obr. 4.18). Přítomnost protilátek neměla vliv na proteolytickou aktivitu vzorků. Proužky s vyšší mobilitou odpovídaly izozymogenům PG A (obr. 4.18, vzorek číslo 4) a proužky s nižší mobilitou odpovídaly izozymogenům PG C (obr. 4.18, vzorek číslo 3). Proužky s nejnižší mobilitou odpovídaly komplexům pepsinogenů s příslušnou protilátkou (obr. 4.18, vzorek číslo 3 až 5). Z obrázku 4.17 je patrné, že na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose došlo k částečné separaci jednoho z izozymogenů PG A. Ostatní izozymogeny obou pepsinogenů se separovat nepodařilo.



Obr. 4.17 Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza lidských pepsinogenů po jejich separaci na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose

Podmínky elektroforézy a detekce: viz kap. 3.10.; č. fr. – číslice udávají čísla frakcí po separaci pepsinogenů na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharose, a odpovídají číselným hodnotám času (v minutách) na obr. 4.16; PV – roztok vzorku aplikovaný na N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosu; pepsinogeny byly v gelu vizualizovány jako bílé pruhy na modrém pozadí.



Obr. 4.18 Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza lidských pepsinogenů po jejich inkubaci s protilátkami Podmínky elektroforézy a detekce: viz kap. 3.10; pepsinogeny byly v gelu vizualizovány jako bílé pruhy na modrém pozadí. Vzorky (příprava viz kap. 3.11.): 1 – protilátka proti lidskému PG A; 2 – protilátka proti lidskému PG C; 3 – homogenát lidské žaludeční sliznice po inkubaci s protilátkou proti lidskému PG A; 4 - homogenát lidské žaludeční sliznice po inkubaci s protilátkou proti lidskému PG C; 5 – homogenát lidské žaludeční sliznice po inkubaci s protilátkami proti lidskému PG A i PG C; 6 – homogenát lidské žaludeční sliznice ve fyziologickém roztoku; P-PG A – komplex protilátky proti lidskému PG A a lidského PG A; P -PG C – komplex protilátky proti lidskému PG C a lidského PG C.

5. Závěr

- Pro separaci pepsinů a pepsinogenů byly připraveny následující afinitní sorbenty: jodovaná L-tyrosin-Sepharosa; 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa a N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa. Ligandy byly imobilizovány na divinylsulfonem aktivovanou Sepharosu 4B buď přes jejich volnou aminoskupinu nebo volnou karboxylovou skupinu. V případě imobilizace ligandů N-acetyl-L-fenylalaninu nebo 3,5-dijod-L-tyrosinu přes jejich volné karboxylové skupiny byl nejprve na aktivovanou matrici zaveden ethylendiaminový oddalovací můstek a následně byly karbodiimidovou reakcí imobilizovány ligandy. L-tyrosin byl přímo navázán na aktivovanou matrici a následně jodován chloraminovou metodou.

- Byla studována interakce prasečího pepsinu A s imobilizovanými deriváty aromatických aminokyselin a byly určeny nejvhodnější podmínky pro separaci této proteasy na připravených afinitních sorbentech. Afinitní sorbenty byly charakterizovány následujícími parametry: opakovatelností analýz, kapacitou a závislostí plochy elučního píku na množství aplikovaného enzymu.

- Byla studována schopnost připravených afinitních sorbentů nespecificky adsorbovat další proteiny (hovězí sérový albumin, kuřecí ovalbumin, trypsin a α-chymotrypsin z hovězího pankreatu). 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosa a jodovaná L-tyrosin-Sepharosa vykazovala velmi vysoké nespecifické interakce. Relativně nízké nespecifické interakce byly zjištěny v případě N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosy.

.

- Bylo prokázáno, že na interakci prasečího pepsinu A s imobilizovanými ligandy se nepodíli aktivní místo proteasy. Bylo zjištěno, že interakce komplexu prasečího pepsinu A a pepstatinu A s připravenými afinitními sorbenty se neliší od interakcí samotné proteasy. Dále bylo ukázáno, že přítomost fosfátové skupiny v molekule prasečího pepsinu A ovlivňuje jeho interakci s N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosou.

- Připravené afinitní sorbenty byly dále použity pro izolaci a separaci pepsinu A a pepsinu C. Bylo zjištěno, že nejvhodnějším sorbentem k tomuto účelu je N-acetyl-L-

fenylalanin-Sepharosa. Pomocí tohoto sorbentu byla separována modelová směs prasečího pepsinu A a potkaního pepsinu C a pepsiny z lidské žaludeční šťávy a z okyseleného homogenátu lidské žaludeční sliznice.

.

- Byla studována schopnost imobilizovaných ligandů interagovat s prasečím pepsinogenem A. Interakce tohoto zymogenu s afinitním sorbentem byla prokázána pouze v případě N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosy a 3,5-dijod-L-tyrosin-Sepharosy.

- Pro izolaci lidského pepsinogenu A a pepsinogenu C z homogenátu žaludeční sliznice byla použita N-acetyl-L-fenylalanin-Sepharosa. Na tomto sorbentu byl také částečně separován jeden z izozymogenů pepsinogenu A.

Některé výsledky této dizertační práce jsou součástí následujicích článků v odborném tisku:

- **Frýdlová J.**, Tichá M., Kučerová Z.: Chromatographia 67 (2008) S41-S45.
- **Frýdlová J.**, Kučerová Z., Tichá M: J. Chromatogr. B 863 (2008) 135-140.
- **Frýdlová J**., Kučerová Z., Tichá M.: J. Chromatogr. B 800 (2004) 109-114.

Seznam použité literatury

1. Fusek M., Vetvicka V.: *Aspartic Proteinases*. CRC Press, Houston 1995.
2. Gritti I., Banfi G., Roi G.S.: Pharmacol. Res. 41 (2000) 265-281.
3. Samloff I.M.: Gastroenterology 57 (1969) 659-669.
4. Kageyama T.: Cell. Mol. Life Sci. 59 (2002) 288-306.
5. Korbova L., Kohout J.: *Gastric Acid Proteinases and Their Zymogens*.Univerzita Karlova, Praha 1981.
6. Etherington D.J., Taylor W.H.: Nature 216 (1967) 279-280.
7. Szecsi P.B., Koch C., Foltmann B.: FEBS Lett. 238 (1988) 101-104.
8. Aydemir S., Borazan A., Acikgoz S., Ustundag Y., Yilmaz A.: Tohoku J. Exp. Med. 205 (2005) 263-268.
9. Samloff I.M.: Gastroenterology 96 (1989) 586-595.
10. Athauda S.B., Tanji M., Kageyama T., Takahashi K.: J. Biochem. 106 (1989) 920-927.
11. Richter C., Tanaka T., Yada R.Y.: Biochem. J. 335 (1998) 481-490.
12. Tang J., Sepulveda P., Marciniszyn J. Jr., Chen K.C., Huang W.-Y., Tao N., Liu D., Lanier J.P.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 (1973) 3437-3439.
13. Tang J., Hartley B. S.: Biochem. J. 118 (1970) 611-623.
14. Jensen A.L., Foltmann B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 56 (1996) 69-74.
15. Muto N., Murayama K., Akahane K, Tani S..: J. Biochem. 87 (1980) 717-723.
16. Foltmann B., v knize *Pepsinogens in Man: Clinical and Genetic Advances.* (Kreuning J., Samloff I.M., Rotter J.I., Eriksson A.W., eds.), str. 1-13. Alan R. Liss, Inc., New York 1985.
17. Piper D.W., Fenton B.H.: Gut 6 (1965) 506-508.
18. Tang J., Mills J., Chiang L., de Chiang L.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 140 (1967) 688-696.
19. Bohak Z.: J. Biol. Chem. 244 (1969) 4638-4648.
20. Muto N., Tani S.: J. Biochem. 85 (1979) 1143-1149.
21. Tang J.: *Acid Proteases, Structure, Function and Biology.* Plenum Press, New York 1977.
22. Tang J., v knize: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. (Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., eds.), kap. 272. Academic Press, San Diego 1998.
23. Jackson W.T., Schlamowitz M., Shaw A.: Biochemistry 4 (1965) 1537-1543.

24. Jackson W.T., Schlamowitz M., Shaw A.: Biochemistry 5 (1966) 4105-4110.
25. Auffret C.A., Ryle A.P.: Biochem. J. 179 (1979) 239-246.
26. Ryle A.P., Auffret C.A.: Biochem. J. 179 (1979) 247-249.
27. Tang J.: J. Biol. Chem. 246 (1971) 4510-4517.
28. Aoyagi T., Kunimoto S., Morishima H., Takeuchi T., Umezawa H.: J. Antibiot. 24 (1971) 687-694.
29. Morishima H., Takita T., Aoyagi T., Takeuchi T., Umezawa H.: J. Antibiot. 23 (1970) 263-265.
30. Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H., Matsuzaki M., Hamada M., Takeuchi T.: J. Antibiot. 23 (1970) 259-262.
31. Marciniszyn J. Jr., Hartsuck J.A., Tang J.: J. Biol. Chem. 251 (1976) 7088-7094.
32. Aoyagi T., Morishima H., Nishizawa R., Kunimoto S., Takeuchi T., Umezawa H., Ikezawa H.: J. Antibiot. 25 (1972) 689-694.
33. Kunimoto S., Aoyagi T., Morishima H., Takeuchi T., Umezawa H.: J. Antibiot. 25 (1972) 251-255.
34. Kunimoto S., Aoyagi T., Nishizawa R., Komai T., Takeuchi T., Umezawa H.: J. Antibiot. 27 (1974) 413-418.
35. Roberts N.B., Taylor W.H.: J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 18 (2003) 209-217.
36. Mukoubayashi C., Yanaoka K., Ohata H., Arii K., Tamai H., Oka M., Ichinose M.: Intern. Med. 46 (2007) 261-266.
37. Sanduleanu S., Bruine A.D., Biemond I., Stridsberg M., Jonkers D., Lundqvist G., Hameeteman W., Stockbrugger R.W.: Eur. J. Clin. Invest. 33 (2003) 147-154.
38. Huang S.C. Miki K., Furihata C. Ichinose M., Shimizu A., Oka H.: Clin. Chim. Acta 175 (1988) 37-50.
39. Sun L.-P., Gong Y.-H., Wang L., Yuan Y.: World. J. Gastroenterol. 13 (2007) 6562-6567.
40. Kang J.M., Kim N., Yoo J.Y. Park Y.S., Lee D.H., Kim H.Y., Lee H.S., Choe G., Kim J.S., Jung H.C., Song I.S.: Helicobacter 13 (2008) 146-156.
41. Cao Q., Ran Z.H., Xiao S.D.: J. Dig. Dis. 8 (2007) 15-22.
42. Hallissey M.T., Dunn J.A., Fielding J.W.: Scand. J. Gastroenterol. 29 (1994) 1129-1134.

43. Kawai T., Kawakami K., Kudo T., Takei K., Moriyasu F., Takagi Y., Aoki T., Koyanagi Y., Serizawa H., Rinbara E., Noguchi M., Sasatsu M.: Digestive Endoscopy 16 (2004) 122-128.
44. Stemmermann G.N., Nomura A.M.: Histopathology 49 (2006) 45-51.
45. Urita Y., Hike K., Torii N., Kikuchi Y., Kanda E., Sasajima M., Miki K.: Digest. Dis. Sci. 49 (2004) 795-801.
46. Broutet N., Plebani M., Sakarovitch C., Sipponen P., Mégraud F. and the Eurohepygast Study Group: British Journal of Cancer 88 (2003) 1239-1247.
47. Miki K., Urita Y.: Journal of Digestive Diseases 8 (2007) 8-14.
48. Miki K.: Gastric Cancer 9 (2006) 245-253.
49. So J.B., Yeoh K.-G., Moochala S., Chachlani N., Ho J., Wong W.-K., Mack P., Goh P. M.: Gastric cancer 5 (2002) 228-232.
50. Araki H., Miyazaki R., Matsuda T., Gejyo F., Koni I.: Nephrol. Dial. Transplant. 14 (1999) 2669-2675.
51. Kitahara F., Kobayashi K., Sato T., Kojima Y., Araki T., Fujino M.A.: Gut 44 (1999) 693-697.
52. Tatemichi M., Kabuto M., Tsugane S.: Jpn. J. Cancer Res. 92 (2001) 243-248.
53. Parente F., Lazzaroni M., Sangaletti O., Baroni S., Bianchi Porro G.: Gut 26 (1985) 1327-1332.
54. Vizoso F., Sánchez L.M., Diez-Itza I., Merino A.M., López-Otin C.: J. Clin. Oncol. 13 (1995) 54-61.
55. Scorilas A., Diamandis E.P., Levesque M.A., Papanastasiou-Diamandi A., Khosravi M.J., Giai M., Ponzone R., Roagna R., Sismondi P., López-Otin C.: Clin. Cancer.Res. 5 (1999) 1778-1785.
56. Díaz C.S., Vizoso F., Rodríguez J.C., Merino A.M., González L.O., Baltasar A., Pérez-Vázquez M.T., Medrano J.: World J. Surg. 23 (1999) 439-445.
57. Rojo J.V., Merino A.M., González L.O., Vizoso F.: Eur. J. Obstet. Gyn. R. B. 104 (2002) 58-63.
58. Konishi N., Nakaoka S., Matsumoto K., Nakamura M., Kuwashima S., Hiasa Y., Cho M., Uemura H., Hirao Y.: Pathol. Int. 49 (1999) 203-207.
59. Hassan M.I., Kumar V., Kashav T., Alam N., Singh T.P., Yadav S.: j. Sep. Sci. 30 (2007) 1979-1988.

60. Šulc K., Vokurka M., v knize *Patologická fyziologie orgánových systémů, Část II* (Klener P. ed..), kap. 5., Karolinum Praha 2003.
61. Genta R.M.: Aliment. Pharmacol. Ther. 20 (2004) 42-47.
62. Correa P., Piazuelo M.B., Camargo M.C.:Gastric Cancer 7 (2004) 9-16.
63. Venkateshwari A., Vidyasagar A., Prasad R., Pratap B., Pratibha N.: Hum. Genet. 101 (1997) 201-204.
64. Fernandez R., Vizoso F., Rodriguez J.C., Merino A.M., Gonzales L.O., Quintela I., Andicoechea A., Truan N., Diez M.C.: Ann. Surg. Oncol. 7 (2000) 508-514.
65. Kucerova Z., Korbova L., Kohout J., Peskova M., Svab J.: Sb. Lek. 94 (1993) 163-168.
66. Pagáčová L.: Ces.a Slov. Gastroent. 49 (1995) 50-55.
67. Sun L.P., Gong Y.H., Wang L., Gong W., Yuan Y.: Journal of Digestive Diseases 9 (2008) 20-26.
68. Hynek R., Sajdok J., Kučerová Z., Káš J.: Sb. Lek. 97 (1996) 135-142.
69. Etherington D.J., Taylor W.H.: Biochem. J. 118 (1970) 587-594.
70. Roberts N.B., Taylor W.H.: Biochem. J. 169 (1978) 607-615.
71. Peek K., Roberts N.B., Taylor W.H.: J. Chromatogr. 476 (1989) 291-297.
72. Newton C.J., Roberts N.B., Taylor W.H.: J. Chromatogr. 417 (1987) 391-396.
73. Majerčáková P., Kučerová Z., Sajdok J.: Sb. Lek. 100 (1999) 101-108.
74. Szecsi P.B. Halgreen H., Poulsen S.S., Axelsson C.K., Damkjaer-Nielsen M., Kjaer T., Foltmann B.: Gut 28 (1987) 1208-1214.
75. Zöller M., Matzku S., Rapp W.: Biochim. Biophys. Acta 427 (1976) 708-718.
76. Matzku S., Rapp W.: Biochim. Biophys. Acta 446 (1976) 30-40.
77. Majerčáková P., Kučerová Z.: Sb. Lek. 102 (2001) 105-113.
78. Vesterberg O.: Acta. Chem. Scand. 27 (1973) 2415-2420.
79. Whitecross D.P., Armstrong C., Clarke A.D., Piper D.W.: Gut 14 (1973) 850-855.
80. Foltmann B., Jensen A.L.: Eur. J. Biochem. 128 (1982) 63-70.
81. Bank R.A., Eriksson A.W., Pals G.: J. Chromatogr. 571 (1991) 47-59.
82. Peek K., Roberts N.B., Taylor W.H.: J. Chromatogr. 476 (1989) 491-498.
83. Jones A.T., Balan K.K., Jenkins S.A., Sutton R., Critchley M., Roberts N.B.: J. Clin. Pathol. 46 (1993) 254-258.
84. Nevaldine B., Kassell B.: Biochim. Biophys. Acta 250 (1971) 207-209.
85. Fox P.F., Whitaker J.R., O'Leary P.A.: Biochem. J. 161 (1977) 389-398.

86. Kucerova Z., Pohl J., Korbova L.: J. Chromatogr. 376 (1986) 409-412.
87. Kucerova Z., Benes M.J., Lenfeld J.: Int. J. Bio-Chromatogr. 3 (1997) 177-182.
88. Tonkova E., Ticha M., Kucerova Z.: Int. J. Bio-Chromatogr. 4 (1998) 35-41.
89. Arnostova H., Kucerova Z., Tislerova I., Trnka T., Ticha M.: J. Chromatogr. A 911 (2001) 211-216.
90. Kucerova Z., Ticha M.: J. Chromatogr. B 770 (2002) 121-128.
91. Kucerova Z., Ticha M.: J. Sep. Sci. 26 (2003) 669-673.
92. Varilova T., Vrankova A., Pacakova V., Ticha M., Stulik K.: J. Chromatogr. A 1084 (2005) 207-213.
93. Walker J. M., v knize: The Protein Protocols Handbook, Second Edition (Walker J. M., ed.), kap. 3. Humana Press, Totowa 2002.
94. Anson M. L., Mirsky A. E.: J. Gen. Physiol. 16 (1932) 59-63.
95. Porath J., Laas T., Janson J.C: J. Chromatogr. 103 (1975) 49-62.
96. Lowe C.R., Dean P.D.G.: *Afinitní chromatografie*. SNTL, Praha 1979.
97. Konecny P., Brown R.J., Scouten W.H.: J. Chromatogr. A 673 (1994) 45-53.
98. Porath J., Maisano F., Belew M.: FEBS Lett. 185 (1985) 306-310.
99. Boschetti E.: J. Biochem. Biophys. Methods 49 (2001) 361-389.
100. Hardouin J., Duchateau M., Canelle L., Vlieghe C., Joubert-Caron R., Caron M.: J. Chromatogr. B 845 (2007) 226-231.
101. Prescott M., Peek K., Veitch D.P., Daniel R.M.: J. Biochem. Bioph. Methods 26 (1993) 51-60.
102. Moravek L., Kostka V.: FEBS Lett. 43 (1974) 207-211.