

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

METODY SEPARACE FOSFOPEPTIDU
PRASEČÍHO PEPSINU A
S DETEKČÍ NA MALDI-TOF

Diplomová práce
studijního oboru Analytická chemie

Praha 2008

Bc. Šustrová Barbora

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory projektů MŠMT: No. 0021620806 a No. LC 06044.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Prof. RNDr. Věry Pacákové, CSc. a školitelky – konzultantky: Ing. Zdeny Kučerové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 5. května 2008.

OBSAH

1. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
1.1 Aspartátové proteinázy (EC 3.4.23).....	6
1.1.1 Lidské žaludeční aspartátové proteinázy.....	6
1.1.2 Prasečí pepsin A	7
1.1.3 Patologické změny fosforylace lidských aspartátových proteináz.....	8
1.2 Příprava peptidových směsí proteolytickým štěpením.....	9
1.2.1 Proteolytické enzymy - proteinázy.....	9
1.2.2 Chymotrypsin (EC 3.4.21.1).....	10
1.2.3 Měření proteolytické aktivity.....	11
1.2.4 Stabilizace enzymů.....	12
1.2.4.1 Modifikace α -chymotrypsinu glykosylací.....	12
1.2.4.2 Imobilizace α -chymotrypsinu.....	13
1.3 Identifikace fosforylovaných peptidů získaných štěpením pepsinu.....	14
1.3.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC).....	14
1.3.1.2 Afinitní chromatografie na imobilizovaných železitých iontech (Fe(III)-IMAC).....	16
1.3.2 Detekce fosforylovaných peptidů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.....	18
1.4 Cíl práce.....	20
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
2.1 Použité chemikálie a přístroje.....	21
2.1.1 Chemikálie.....	21
2.1.2 Laboratorní materiál.....	22
2.1.3 Přístroje.....	22
2.2 Pracovní postupy.....	23
2.2.1 Analytické metody.....	23
2.2.1.1 Stanovení koncentrace proteinu.....	23
2.2.1.2 Stanovení enzymové aktivity imobilizovaného α -chymotrypsinu.....	23
2.2.2 Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetických částicích.....	24
2.2.3 Štěpení prasečího pepsinu α -chymotrypsinem.....	25
2.2.3.1 Upravená metoda štěpení prasečího pepsinu A.....	25
2.2.4 Separace peptidů.....	26
2.2.4.1 RP-HPLC separace peptidových fragmentů.....	26
2.2.4.2 Separace fosforylovaných peptidů pomocí Fe(III)-IMAC.....	26

2.2.5 Přečištění vzorku před hmotnostní detekcí	27
2.2.6 Analýza vzorků pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.....	28
3. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
3.1 Optimalizace procesu štěpení prasečího pepsinu A volným α -chymotrypsinem.....	29
3.1.1 Vliv doby na štěpení prasečího pepsinu A.....	29
3.1.2 Vliv teploty na štěpení prasečího pepsinu A.....	31
3.2 Separace hydrolytických štěpů prasečího pepsinu A.....	32
3.2.1 Štěpení prasečího pepsinu A volným α -chymotrypsinem.....	32
3.2.1.1 RP-HPLC separace hydrolytických štěpů prasečího pepsinu A.....	32
3.2.1.2 Reprodukovenost metody štěpení volným α -chymotrypsinem s RP-HPLC separací..	36
3.2.2 Štěpení prasečího pepsinu A imobilizovaným α -chymotrypsinem.....	36
3.2.2.1 RP-HPLC separace hydrolytických štěpů prasečího pepsinu A.....	36
3.2.2.2 Reprodukovenost metody štěpení imobilizovaným α -chymotrypsinem s RP- HPLC separací.....	40
3.2.2.3 Stanovení enzymové aktivity imobilizovaného α -chymotrypsinu.....	44
3.3 Identifikace fosforylovaného peptidu prasečího pepsinu A v RP-HPLC chromatogramu.....	47
3.3.1 Předseparace fosforylovaného peptidu pomocí Fe(III)-IMAC.....	47
3.3.2 Spojení RP-HPLC předseparace se separací pomocí FE(III)-IMAC s hmotnostní detekcí... 49	49
4. ZÁVĚR.....	52

SEZNAM ZKRATEK

A	plocha píku [mV/s]
A ₂₂₀ ; A ₂₈₀ ; A ₄₀₅	absorbance měřená při určité vlnové délce
ACN	acetonitril
Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	asparagová kyselina
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
c	koncentrace [mg/ml], [(v/v) %]
CTSD	kathepsin D
CTSE	kathepsin E
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
Fe(III)-IMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných železitých iontech
GE	gelová elektroforéza
Glu	glutamin
h	výška píku [mV]
IAA	jodacetamid
IDA	iminodioctová kyselina
Ile	isoleucin
IMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech
Leu	leucin
Lys	lysin
m	hmotnost [mg; µg]
MALDI-TOF	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice ve spojení s průletovým analyzátozem
Met	methionin
MS	hmotnostní spektrometrie
MW	relativní molekulová hmotnost
NTA	nitriloctová kyselina
PGA	pepsinogen A
PGC	pepsinogen C
Phe	fenylalanin
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinná chromatografie na obrácených fázích
SDS-PAGE	zónová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu

Ser	serin
TCA	trichloroctová kyselina
TED	tris(karboxymethyl)ethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
Thr	threonin
t_R	retenční čas [min]
Trp	tryptofan
t_{st}	čas [min; hod]
t_{st}	teplota [°C]
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialové záření
V	objem [ml; μ l]
λ	vlnová délka [nm]

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Aspartátové proteinázy (EC 3.4.23)

Asparátové proteinázy patří do skupiny enzymů hydrolyzujících bílkoviny. Aktivní centrum těchto enzymů obsahuje dva zbytky kyseliny asparagové (Asp). Vzhledem ke své maximální aktivitě v rozmezí pH 1,5 až 5,0 byly dříve nazývány kyselé proteinázy, od roku 1981 se dle doporučení IUB pro ně používá označení aspartátové proteinázy.

Aspartátové proteinázy pepsinového typu jsou syntetizovány v podobě neaktivních proenzymů. V kyselém prostředí dochází k jejich aktivaci odštěpením aktivačního peptidu, který zakrývá aktivní centrum, a následnou změnou konformace molekuly.

Aktivní enzym je inhibován pepstatinem, methylesterem diazoacetyl-norleucinu nebo 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxy)propanem [1,2].

1.1.1 Lidské žaludeční aspartátové proteinázy

Název lidské žaludeční aspartátové proteinázy zahrnuje pět skupin strukturně velice podobných enzymů - pepsinů: pepsin A (pepsin), pepsin C (gastriksin), kathepsin D (CTSD), kathepsin E (CTSE, pepsin B) a chymosin [1].

Žaludeční proteinázy tvoří jeden polypeptidový řetězec propojený třemi intramolekulárními disulfidickými můstky. Obsahují velké množství dikarboxylových kyselin a β -hydroxyaminokyselin, naopak bazických aminokyselin je v jejich řetězci málo. Z toho vychází jejich vysoká aktivita a stabilita v kyselém prostředí. Molekulové hmotnosti se pohybují okolo 35 kDa pro aktivní formy enzymů, pro proenzymy - zymogeny okolo 40 kDa [1,3].

Pepsin A (EC 3.4.23.1)

Jedna ze dvou hlavních skupin žaludečních proteináz, pepsin A, je produkován hlavními a mukózními buňkami žlázatého epitelu těla a fundu žaludku ve formě zymogenu - pepsinogenu A (PGA). V malém množství se pepsin A vyskytuje též v krevním séru a v moči. Jeví vysokou afinitu k hemoglobinu a syntetickému substrátu

N-acetyl-L-fenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosinu. Optimální pH prostředí pro jeho maximální účinnost je v rozmezí 1,8 - 2,2. Relativní molekulová hmotnost aktivního enzymu je 34 000 [1,3].

Pepsin C (EC 3.4.23.3)

Druhý majoritní enzym lidské žaludeční šťávy, nazývaný též gastriksin, je produkován jako pepsinogen C (PGC, progastrin) hlavními a mukózními buňkami žlázatého epitelu těla, fundu, pyrolické části a antra žaludku. Dále je produkován též Brunnerovými žlázkami proximální části dvanáctníku a epitelovými buňkami prostaty a seminálních váčků. V malém množství se může nacházet i v krevním séru, v moči pouze při patologických stavech. Maximální aktivitu vykazuje při pH okolo 3,0, relativní molekulová hmotnost aktivního enzymu je 31 500 [1,2,3,]

Ostatní žaludeční proteinázy - kathepsin E, kathepsin D, chymozin

Kathepsin E (pepsin B; EC 3.4.23.34) je minoritní komponentou lidské žaludeční šťávy. Jako PGC je syntetizován povrchovými buňkami žaludeční sliznice těla a fundu. Byl nalezen též v lymfoidní tkáni, v neutrofilech a v močovém měchýři [1,2,3].

Kathepsin D (EC 3.4.23.5) je intracelulární proteinázou. Vyskytuje se v některých buňkách žaludeční sliznice, v mukózních krčkových buňkách, v krycích buňkách, v pyrolických žlázatých buňkách a v makrofázích [1,2,3].

Chymozin (EC 3.4.23.4) je neonatální žaludeční proteináza nacházející se v žaludeční šťávě novorozenců. Má schopnost srážet mléko (chymázová aktivita) [1]

1.1.2 Prasečí pepsin A

Prasečí pepsin A je z aspartátových proteináz nejlépe prostudován. Relativní molekulová hmotnost pepsinogenu je 40 000, aktivního enzymu kolem 35 000. Molekulu enzymu tvoří jeden polypeptidový řetězec propojený na třech místech disulfidickými -S-S- můstky. Ve své molekule má vázanou D-glukózu. Obsah bazických aminokyselin v molekule prasečího pepsinu A je velice malý, pouze jeden lysin a dva argininy [3,4].

Od molekul pepsinů z jiných zdrojů se odlišuje počtem fosfátových skupin. Prasečí pepsin A má ve své molekule právě jednu fosfátovou skupinu navázanou na serin

v pozici 68. Tento fosfoserinový zbytek se nachází na povrchu molekuly. Lidské pepsiny A i C mohou obsahovat 0 až 3 fosfátové skupiny vázané na hydroxylové skupiny serinových zbytků [3,5].

Terciární struktura molekuly prasečího pepsinu má doménový charakter, molekula obsahuje dvě podobné domény spojené krátkými hydrofobními interakcemi. Celková struktura molekuly tvoří beta-řetězec s malými helikálními úseky.

Aktivní místo se nachází v štěrbině mezi doménami. Aminokyseliny, nacházející se ve štěrbině proteinázy, silně ovlivňují její interakci se substrátem. Nepatrná změna aminokyselinového složení v této oblasti ovlivní substrátovou specifitu enzymu.

Pro aktivaci pepsinogenu je nezbytná přítomnost vodíkových iontů. Při pH kolem 4 nastává autolýza a její rychlost narůstá s dalším poklesem pH. V neutrálním prostředí jsou proenzymy stabilizovány v inaktivní formě elektrostatickými interakcemi mezi bazickými aminokyselinami aktivačního peptidu a zápornými náboji dikarboxylových kyselin enzymu. Poklesem pH jsou karboxylové skupiny protonizovány. Dochází ke konformačním změnám, které způsobují odsunutí aktivačního peptidu ze štěrbině a tím se odkryje aktivní centrum enzymu. Nakonec je aktivační peptid o délce 40-50 aminokyselinových zbytků úplně odštěpen [3,4].

1.1.3 Patologické změny fosforylace lidských aspartátových proteináz

Důležitým ukazatelem karcinogeneze žaludku se v posledních letech stává stupeň fosforylace bílkovin. Bylo nalezeno několik prací, zabývajících se fosforylací pepsinogenů. Jensen a spol. [6] prokázali u zdravých jedinců přítomnost jednoho fosfoserinového zbytku v molekule PGA, zatímco molekula PGC neobsahovala žádný. Hynek a spol. [7] se zabývali výskytem fosfátových skupin u pacientů trpících rakovinou žaludku, pomocí RP-HPLC a CZE (kapilární zónová elektroforéza) prokázali jednu fosfátovou skupinu v molekule PGA a dvě fosfátové skupiny v molekule PGC. Další výzkum byl proveden Majerčákovou a spol. [8] pomocí protilátek vůči fosfoproteinům. U pacientů trpících žaludečními vředy a rakovinou žaludku potvrdili přítomnost jedné fosfátové skupiny v molekule PGC a nejméně jedné v molekule PGA. K podobným výsledkům došla i Vaňková [3], potvrdila vyšší stupeň fosforylace lidského PGA u pacientů s nádorem žaludku.

1.2 Příprava peptidových směsí proteolytickým štěpením

Nejběžnější strategie pro identifikaci proteinu vychází z počátečního štěpení na peptidy buď enzymovou nebo chemickou cestou. S rostoucí délkou peptidových fragmentů roste pravděpodobnost jejich překrytí a zvyšuje se obtížnost jejich identifikace.

Proteolýza se již v rámci proteomiky stala rutinní záležitostí, neboť je komerčně dostupná celá řada enzymů, které lze volit a aplikovat na základě požadavků kladených na výslednou peptidovou směs. Nabízí několik praktických výhod: vysokou specifitu, minimalizované vedlejší reakce a dobrou účinnost štěpení. Důležitá je při tom optimalizace složení a pH reakčního pufru, poměru enzym/substrát, teploty a doby inkubace.

Chemické metody štěpení proteinů se používají pouze jako doplňkové. Nacházejí uplatnění zejména tam, kde není možné ve specifickém případě provádět proteolýzu. Poměrně šetrná je hydrolýza proteinů zředěnou kyselinou mravenčí, která působí v místě zbytků kyseliny asparagové a zároveň je dobrým rozpouštědlem pro řadu proteinů. Nejčastěji používaným chemickým činidlem je kyanobromid, který štěpí v kyselém prostředí methioninylové vazby na povrchu molekuly [3,9].

Pro dostatečně reprodukovatelné štěpení je nutné, aby analyzovaná bílkovina byla nejprve denaturována, nejčastěji rozpuštěním bílkoviny v denaturujícím roztoku (např. 6M HCl, 8M močovíně, merkaptoetanolu). Některé vysoce stabilní bílkoviny je nutno před denurací vhodně modifikovat, např. redukcí disulfidových vazeb dithiothreitem (DTT) a následnou alkylací reaktivních cysteinů jodacetamidem (IAA) [3,9].

Při enzymatickém štěpení je nutné zvolit vhodný poměr enzymu k substrátu. Větší množství proteinázy může vést k problémům, jako jsou nespecifické štěpení nebo autolytické štěpení samotné proteinázy. Důsledkem autolýzy je výskyt peptidových fragmentů štěpící proteinázy ve výsledné směsi peptidů. Vzniká tím rušivé pozadí v MS detekci analyzované směsi peptidů a způsobuje horší interpretaci.

1.2.1 Proteolytické enzymy - proteinázy

Proteolytické enzymy katalyzují exergonní hydrolýzu peptidových vazeb

v proteinech a peptidech.

Specifita enzymu je dána vlastnostmi vazebných míst, tvořících aktivní místo enzymu. Na základě poznatků o aktivním místě enzymů se nakonec ustálily čtyři charakteristické skupiny proteináz: serinové, cysteinové (thiolové), aspartátové a proteinázy obsahující kovový ion jako kofaktor. K nim pak přibyla ještě skupina threoninových proteináz. Tato klasifikace se objevuje i v tzv. systému EC, na němž je založeno názvosloví enzymů. Proteolytické enzymy jsou klasifikovány jako součást třídy 3-hydrolázy, z šesti enzymových tříd. Proteinázy tvoří podtřídu 3.4-hydrolázy. V rámci této podtřídy je pak rozlišována celá řada podpodtříd [9].

V peptidovém mapování se nejvíce využívá trypsin. Dále se využívají chymotrypsin, který ve svém řetězci obsahuje 101 aminokyselin stejných jako jsou v řetězci trypsinu, rostlinné endopeptidázy papain, bromelain, či enzymy získané z kultur mikroorganismů thermolysin nebo subtilisin.

Tabulka 1.1: Přehled používaných proteináz [3,9]:

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

1.2.2 Chymotrypsin (EC 3.4.21.1)

Chymotrypsin patří mezi serinové proteinázy, které mají v aktivním místě jeden funkčně významný zbytek serinu (Ser) a jejichž enzymová aktivita je inhibována diisopropylfluorofosfátem. Jsou syntetizovány v podobě neaktivních zymogenů. Získávají se z trávicího traktu obratlovců, účastní se trávení potravy. Serinové proteinázy se vyskytují ve všech vývojových stupních živočichů a též u některých

bakterií [3].

Hovězí chymotrypsin je syntetizován ve formě neaktivního chymotrypsinogenu (MW 25 000), který obsahuje 249 aminokyselin a 5 disulfidových vazeb [10,11]. Extrakt z hovězího pankreatu obsahuje dvě formy zymogenu: chymotrypsinogen A (245 aminokyselin; MW 25 700; pI 9,1) a chymotrypsinogen B (248 aminokyselin; MW 25 800; pI 5,2) [9].

K aktivaci dochází v duodenu působením trypsinu, který z chymotrypsinogenu odštěpí dipeptidy Ser14-Arg15 a Thr147-Asn148. Z původně jednoho peptidového řetězce se vytvoří tři, vzájemně spojené disulfidovými -S-S- vazbami, změní se terciální struktura molekuly a zpřístupní se aktivní místo enzymu. Vzniklé aktivní enzymy se značí řeckou abecedou (chymotrypsin A: α -, π -, δ -, τ -, chymotrypsin B: α -, π -) [12].

Chymotrypsin štěpí peptidové vazby specificky (ve srovnání s trypsinem je však specifita nižší) za aromatickými zbytky (Tyr, Phe, Trp) a rozměrnými alifatickými nepolárními zbytky aminokyselin (Met, Leu). Štěpení nastává, je-li následující aminokyselinový zbytek prolin. Následuje-li bazický aminokyselinový zbytek, dochází ke zvýšení rychlosti štěpení, v případě kyselého zbytku se rychlost snižuje [3].

Chemismus štěpení je popisován jako dvoustupňová reakce. Nukleofilní hydroxylová skupina serinového zbytku napadne vazbu -CO-NH- a za vytvoření esteru se uvolní první štěp s novým aminokyselinovým koncem. Hydrolýzou se uvolní druhý štěp a regeneruje se aktivní enzym [3].

1.2.3 Měření proteolytické aktivity

Měřítkem aktivity endopeptidáz je množství štěpných peptidů uvolněných za určitý časový interval.

Nejstarší metody měření aktivity jsou založeny na spektrofotometrickém stanovení peptidů v reakční směsi po vysrážení a odstranění nezreagovaného proteinového substrátu. Např. Ansonova metoda využívá hemoglobinu jako substrátu a štěpné peptidy (obsahující Tyr) se stanovují fenolovým činidlem [9].

S rozvojem chemie peptidů se začaly více uplatňovat syntetické substráty. Jejich štěpení endo- či exopeptidázou má nejčastěji za následek uvolnění chromoforu (existují i rozmanité fluorogenní substráty), který se měří spektrofotometricky při odpovídající

vlnové délce [9].

Jako substrát pro chymotrypsin se používá N-sukcinyl-L-fenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA) a sleduje se absorbance při 405 nm nebo ester N-benzoyl-L-tyrosinu (BTEE) a měří se absorbance při 256 nm [9,13].

1.2.4 Stabilizace enzymů

Využití katalytických vlastností enzymů v biochemii, průmyslu, medicíně a dalších oborech je běžná záležitost. Určitým omezením při výběru proteináz k hydrolytickému štěpení bílkovin je nejenom jejich specifita štěpení ve vztahu ke studované bílkovině, ale také jejich stabilita za daných podmínek a dále schopnost autolytického štěpení, které má za následek horší interpretaci výsledků analýzy vzniklých peptidů. Pro zlepšení výsledků štěpení proteinů a zvýšení stability proteinázy, byly použity dva přístupy: jednak různý způsob imobilizace proteináz [14] na různé typy sorbentů (chromatografické sorbenty [15], magnetické částice [20,21]) a jednak modifikace molekul proteináz, jako glykosylace (např. glykosylace trypsinu [15, 51] nebo redukivní methylace [52] nebo acylace [54].

K získání dostatečně účinné a stabilní formy imobilizovaného enzymu je rozhodující výběr vhodných podmínek imobilizační reakce. Podmínky imobilizace mohou příznivě ovlivnit reakci nosič-enzym. Největší vliv mají reakční čas, pH reakčního prostředí, teplota, pufrční prostředí a přítomnost inhibujících látek [14].

1.2.4.1 Modifikace α -chymotrypsinu glykosylací

Při stabilizaci α -chymotrypsinu glykosylací dochází k strukturní modifikaci aminoskupiny enzymu redukivní alkylací.

Jako modifikátory se využívají prosté alifatické aldehydy nebo ketony, v případě glykosylace je to aldehydová skupina sacharidu (D-galaktóza, laktóza). V případě α -chymotrypsinu poskytují aminoskupinu zbytky lysinu nacházející se na povrchu molekuly. Reakcí jsou aminoskupiny převedeny na příslušný mono- nebo dialkylamino derivát. Modifikace probíhá za mírných podmínek (37 °C, pH 7,5) [15].

Vaňková [3] sledováním termostability prokázala, že glykosylace stabilizuje α -chymotrypsin. Přítomnost sacharidu chrání enzym proti autolyzačnímu štěpení a stabilizuje proteinovou strukturu (zmenšení nepolárních ploch na povrchu). Stabilnější preparát získala při glykosylaci α -chymotrypsinu laktózou.

Také Solá a spol. [17,18,19] se ve svých několika studiích zabývali glykosylací α -chymotrypsinu. Jako sacharid použili disacharid laktózu a polysacharid dextran a sledovali změny termodynamické a kinetické stability v závislosti na změnách stupně glykosylace a velikosti sacharidu. Zatímco kinetická stabilita záležela převážně na velikosti použitého sacharidu, větší termostability bylo dosaženo vzrůstající glykosylací enzymu.

1.2.4.2 Imobilizace α -chymotrypsinu

Sacharidy se mohou uplatnit i v imobilizaci bílkovin. Pro vazbu lze použít buď sacharidové části bílkoviny nebo sacharidových zbytků nosiče. Oba přístupy jsou založeny na selektivní oxidaci sacharidových zbytků jodistanem, vytvořené aldehydové skupiny jsou pak využity pro imobilizaci. Vzniklá vazba je typu Schiffovy báze, vazba musí být stabilizována redukcí borhydridem [3].

Vaňková [3] ve své studii zjistila, že imobilizace glykosylovaného enzymu není vhodná pro další využití, neboť α -chymotrypsin vázaný tímto způsobem na hydrazidovou celulózu má nízkou specifickou aktivitu. Nejlepších výsledků dosáhla imobilizací α -chymotrypsinu na glykosylovaný polyakrylamid: vysoké množství navázaného enzymu, vysoká aktivita i účinnost imobilizace. Avšak optimalizací podmínek vazby enzymu na nosič zjistila, že vysoké množství navázaného α -chymotrypsinu vede k poklesu relativní specifické aktivity, což přisoudila sterickeému bránění navázaných molekul.

Hong a spol. [20,21] se zabývali navázáním α -chymotrypsinu na magnetických gelových nanočásticích. V první studii imobilizovali enzym na připravené nanočástice kovalentní vazbou s reakčními aminoskupinami pomocí karbodiimidové aktivace. Došli k závěrům, že nižší pH pufrčního prostředí zajišťuje lepší imobilizaci enzymu, avšak pozorovali větší ztrátu aktivity imobilizovaného enzymu. Také zvýšením množství enzymu v reakční směsi dospěli ke zvýšení vazebné kapacity. Imobilizací

α -chymotrypsinu docílili větší termostability, opakované použitelnosti (během dvouhodinového intervalu po šestkráté použitím imobilizovaném enzymu jeho aktivita významně nepoklesla) a prodloužili stabilitu enzymu během uskladnění.

Ve druhé studii použili pro imobilizaci na magnetické gelové nanočástice karboxylových reakčních skupin, čímž dosáhli vysoké, dlouhotrvající rezistence proti změnám pH a tepelné denaturaci [21].

1.3 Identifikace fosforylovaných peptidů získaných štěpením pepsinu

Reverzibilní fosforylace proteinů katalyzovaná kinázami a fosfatázami je obecným mechanismem konečné úpravy proteinové struktury a funkce. Fosforylace proteinů hraje klíčovou roli v regulaci důležitých funkcí buňky jako je buněčný růst, diferenciaci a metabolismus [23].

K rozlišení fosforylovaných pepsinů a pepsinogenů od nefosforylovaných forem již byly použity následující metody separace:

- 1) Afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC), kde byla využita interakce fosfátových skupin fosforylovaných peptidů s imobilizovanými kovovými ionty (viz kap.1.3.1.2).
- 2) Spojení RP-HPLC a CZE: RP-HPLC byla využita pro předseparaci a CZE k separaci peptidových fragmentů pepsinů a pepsinogenů vzniklých štěpením α -chymotrypsinem [7,22].; popř. samotnou CZE s následnou MS detekcí [43]. Identifikace fosforylovaných fragmentů byla provedena porovnáním peptidových map fosforylovaných a defosforylovaných forem [7,22,43].
- 3) Separace fosfopeptidů pomocí specifických anti-P-Ser/anti-P-Thr/ anti-P-Tyr protilátek [8, 45].

1.3.1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC)

Pro dělení komplikovaných směsí látek, jako jsou např. látky biologického původu, je dnes nejvyužívanější metodou vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vysokou účinnost metody zajišťuje využití stacionárních fází, tvořených malými

částicemi pravidelného tvaru o jednotné velikosti a vysoké pórovitosti, případně tvořených monolitickou vrstvou polymeru o definované pórovitosti, které homogenně vyplňují chromatografickou kolonu.

Použití obrácených (reverzních) fází (RP-HPLC) rozšiřuje oblast využití na polární, ionizovatelné i nepolární analyty.

Stacionární fázi v RP-HPLC tvoří nejčastěji silikagel modifikovaný nepolárními funkčními skupinami (oktadecyl, butyl, oktyl, a další). Mobilní fázi tvoří voda nebo pufr s přídavkem organického modifikátoru [24].

Rozhodujícím procesem pro separaci analytu jsou hydrofobní interakce s mobilní fází. Jejich velikost závisí na polaritě analytu, na relativní permitivitě a na povrchovém napětí mobilní fáze (s klesajícím povrchovým napětím klesá retence analytu). Retence analytu klesá s rostoucí koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi [25].

Eluce bývá často provedena lineárním gradientem - kontinuálním zvyšováním koncentrace silnějšího eluentu, organického modifikátoru B (acetonitril, ethanol, tetrahydrofuran) v organickém rozpouštědle A (kyselina trifluoroctová, kyselina trichloroctová).

Volba mobilní fáze je pro průběh analýzy velice důležitá. Přítomnost komplexačních látek nebo nevhodné pH může vést k abnormalitám retence, rozštěpení píků nebo k denuraci separovaných bílkovin. Použití silikagelového nosiče je také omezeno hodnotou pH mobilní fáze (pH 2,5 až 8,0) [25].

Separace je v první řadě ovlivněna samotnou strukturou analyzovaných látek. Směsi látek s rozvětvenými řetězci jsou stacionární fází zadržovány méně než analogické látky s jednoduchými nevětvenými řetězci. Nenasycené látky eluují také dříve než zcela nasycené analogy. Separace biopolymerních látek je ovlivněna vícenásobnými interakcemi se stacionární fází. Ustavování rovnováhy u biopolymerů probíhá proto pomaleji [25].

Literatura zabývající se využitím RP-HPLC při studiu proteinů a jiných biomolekul je velice obsáhlá. Jako příklad je možné uvést následující práce: Qian a kol. [26] vyhodnotili výhody spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí v proteomice a využití této metody v klinické praxi. Pomocí RP-HPLC byly ve studii Krabba a kol. [27] separovány a identifikovány fosforylované peptidy. Vzorky obsahující fosforylované i nefosforylované peptidy byly separovány na reverzní fázi,

eluent byl následně rozdělen na dvě části. Jedna byla vedena do iontově výměnné reakční cívky, pracující na principu Fe(III)-IMAC (viz kapitola 1.3.1.2) ve spojení s fluorescenční detekcí. Druhá část byla vedena přímo do hmotnostního detektoru, kde byly zpracovány pouze píky, odpovídající signálu z iontově výměnného separačního systému s UV detekcí. Linearitu metody testovali v rozsahu 0,5-80,0 μM fosforylovaných peptidů, přičemž dosáhli pro monofosforylované peptidy limitu detekce 0,5 μM .

1.3.1.2 Afinitní chromatografie na imobilizovaných železitých iontech (Fe(III)-IMAC)

Jednou z dalších specifických metod, používaných k separaci peptidů, případě celých bílkovinných molekul, nebo k jejich purifikaci, je afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC). Principem metody je rozdílná afinita separovaných bílkovin ke kovovým iontům, která je odvozena od koordinačních vazeb mezi kovovými ionty a určitými postranními řetězci aminokyselin na povrchu bílkoviny [28].

Klasifikační systém používaný mnoha autory vychází od Pearsona [29], který rozdělil kovové ionty do tří kategorií (silné, středně silné, slabé) na základě preferenční reaktivity kovů vůči nukleofilům. Skupina silných kovových iontů zahrnuje Fe^{3+} , Ca^{2+} a Al^{3+} , které upřednostňují kyslík. Slabé kovové ionty, jako Cu^+ , Hg^{2+} , Ag^+ , reagují převážně se sírou. Středně silné kovové ionty (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) vytváří koordinační vazbu s dusíkem, kyslíkem a sírou.

Chelátové ligandy jsou založené na bázi iminodioctové struktury. Nejčastěji je to iminodioctová kyselina (IDA), tvořící tři vazby s kovovým iontem a tris(karboxymethyl)ethylendiamin (TED), který tvoří pět vazeb s kovovým iontem. Dalším používaným chelátovým ligandem je nitriltrioctová kyselina (NTA), jenž váže kovový kationt čtyřmi vazbami [30].

Matrice pro navázání chelátových ligandů musí být mechanicky a chemicky stabilní, hydrofobní s hydratovaným „měkkým“ povrchem, inertním vůči biomakromolekulám a musí mít makroporézní strukturu [31,32].

Pro klasickou IMAC (nízkotlakou) se používají některé anorganické matrice – oxidy, sulfidy, karbonáty, silikáty a fosfáty, a častěji organické polymery – agarózové gely, Sephadexy, Trisakryly a Spherony [32].

K separaci fosfopeptidů ze směsí se nejčastěji využívá Fe(III) iontů. Specifickou separaci fosfopeptidů lze provést i pomocí Ga(III) iontů nebo dioxidu titanu [45].

Základním principem metody Fe(III)-IMAC, je silná afinita Fe(III) iontů, považovaných za silnou Lewisovu kyselinu, ke kyslíku, vázanému ve fosfátových, sulfátových, karboxylových nebo fenolových funkčních skupinách, vystupujícímu jako silná база [33].

Toomik a spol. [34] zjistili, že síla vazby nukleotidů není ovlivněna počtem fosfátů v molekule. Vysokou afinitu k Fe(III) částečně vysvětluje způsob vazby, fosfát se váže dvěma koordinačními vazbami, vzniká čtyřčlenný kruh, oproti karboxylové skupině, která tvoří pouze jednu vazbu.

Interakci železitých iontů s fosfátem studovali Chung a spol. [35] v PEG/dextranovém dvoufázovém systému. S rostoucím pH se afinita fosfátu k Fe³⁺ iontům snižovala. Nárůst afinity v rozmezí pH 3 - 5 byl připsán ionizaci druhého kyselého kyslíku fosfátové skupiny. Nad pH 5 afinita poklesla následkem kompetitivní vazby železitých iontů s hydroxylovými ionty.

Eluce analytů vázaných přes fosfátové skupiny může být provedena gradientem pH nebo přidavkem kompetitivních látek do mobilní fáze (např. fosfátových iontů, imidazolu nebo organických kyselin) [28,30,36]. Ve studii Muszynské a spol. [37] se základní peptidy v IMAC koloně nesorbovaly. Kyselé peptidy byly zadrženy a následně eluovány v širokém píku v rozmezí pH 5,5 – 6,2. Fosfopeptidy byly eluovány v rozmezí pH 6,9 - 7,5.

Separaci analytu, kapacitu a selektivitu ovlivňuje několik faktorů. Je to především hustota imobilizovaných kovových iontů [38], iontová síla pufru, přítomnost povrchově přístupných fosfátových skupin proteinu a izoelektrický bod separovaného proteinu.

Bylo zjištěno, že peptidy obsahující aminokyseliny s větším množstvím karboxylových skupin jsou také slabě zadržovány Fe(III)-IDA-agarózovým gelem. Slabé komplexy tvoří Fe(III) ionty také s ligandy obsahujícími dusík a síru [27,39, 45]. Problém nespecifické vazby kyselých aminokyselinových zbytků může být řešen jejich blokací pomocí o-methyl esterifikace [49].

Ve studii Li a spol. [23] byla k separaci fosfopeptidů využita jednodílná vrstva oxidu hlinitého pokrývající povrch superparamagnetických částic oxidu železitého. Navázané fosfopeptidy detegovali pomocí MALDI-MS, přímým umístěním mikročástic na MALDI terčík. Podobná metoda byla použita i ve studii Hana a spol. [47], kde autoři připravili polymerizací Fe_2O_3 mikročástice pro separaci fosfopeptidů.

1.3.2 Detekce fosforylovaných peptidů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Vysokou účinnou detekční metodou, používanou při identifikaci bílkovin, je MALDI-TOF (laserová desorpce a ionizace za účasti matrice ve spojení s průletovým analyzátozem).

Tandemové spojení MALDI-TOF-TOF může poskytnout strukturní informace o analyzované bílkovině s dostatečnou citlivostí pro její identifikaci a analýzu postranslačních modifikací [42], jako jsou fosforylace, deamidace nebo glykosylace [43].

Fragmentované ionty peptidů, získané z MALDI zdroje, jsou směsí y-, b- a a-iontů, doprovázených ionty, které pochází z neutrální ztráty amoniaku nebo vody. Poměr a intenzita fragmentovaných iontů velice závisí na sérii iontů, produkovaných MALDI zdrojem. Peptidy s jedním nábojem vznikají přednostně následkem štěpení C-terminální vazby kyselých zbytků asparagové a glutámové kyseliny a N-terminální vazby prolinu [44].

Detekce fosfopeptidů často vychází z fragmentace fosfoesterové vazby v P-Ser, P-Tyr a P-Thr. Zejména β -eliminace fosforové kyseliny z P-Ser nebo P-Thr vede k identifikaci fosfopeptidů v hmotnostní spektrometrii. Peptidy obsahující P-Tyr mohou být specificky detegovány produkcí imoniového iontu z P-Tyr zbytků.

Při analýze fosforylovaných peptidů dochází při MALDI-TOF MS detekci k několika problémům. Ve směsi peptidů dochází k potlačení signálu fosfopeptidů následkem přítomnosti nefosforylovaných analogů. A pokud je protein fosforylovaný v malém množství, detekce fosfopeptidu je obtížná. Navíc fosforylace může inhibovat štěpení pomocí trypsinu, pozicí fosfátové skupiny v místě štěpení [45, 46, 47, 48]. Dalším obecným problémem může být efekt matrice [42].

K řešení těchto problémů se využívá separačních metod: např. IMAC, CZE, GE (gelové elektroforézy) [43, 45, 46, 47], radioaktivního značení pomocí ^{32}P [45, 46], enzymové defosforylace [45, 46, 48] nebo imunochemických metod [45], jako nástrojů k izolaci a odlišení fosfopeptidů od rušících nefosforylovaných forem.

1.4 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo vypracovat spolehlivou metodu pro separaci a identifikaci fosfopetidů, která by mohla být využita pro studium lidských pepsinů a pepsinogenů. Téma diplomové práce navazuje na dlouholetý výzkum zaměřený na oblast aspartátových proteináz a jejich změn v postranlačních modifikacích, které doprovázejí některá onemocnění žaludku.

Ke splnění vytčeného cíle diplomové práce je nutné řešení následujících dílčích kroků při použití prasečího pepsinu A jako modelového proteinu:

- nalézt vhodné podmínky pro štěpení pepsinu α -chymotrypsinem;
- imobilizace α -chymotrypsinu na magnetické částice a jejich využití pro přípravu směsi peptidů pepsinu;
- separace vzniklých peptidů pomocí RP-HPLC a IMAC s imobilizovanými Fe(III) ionty;
- identifikace fosfopeptidů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie a přístroje

2.1.1 Chemikálie

Acetonitril (Labskan, Irsko)

BSA (Sigma-Aldrich, USA)

Dekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Sigma-Aldrich, USA)

Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)

EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

Hovězí α -chymotrypsin (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenuhlíčitan amonný (Sigma-Aldrich, USA)

Chlorid železitý (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká Republika)

IDA (Sigma-Aldrich, USA)

Jodacetamid (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina fosforečná (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká Republika)

Kyselina chlorovodíková (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká Republika)

Kyselina octová (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká Republika)

Kyselina trifluoroctová (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina trichloroctová (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká Republika)

Močovina (Sigma-Aldrich, USA)

N,N-dimetylformamid (Sigma-Aldrich, USA)

N-sukcinyl-L-fenylalanin-p-nitroanilid (Sigma-Aldrich, USA)

Octan sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Prasečí pepsin A (Sigma-Aldrich, USA)

Reagent A: 1% bicinchoninát sodný, 2% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,16% vinan sodný, 0,4% NaOH, 0,95% NaHCO_3 , (pH=11,25) (Pierce, USA)

Reagent B: 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, USA) v deionizované vodě

2.1.2 Laboratorní materiál

Perfect Pure C-18 Tip (Eppendorf, Německo)

Magnetické agarosové mikročástice - Magnetic Glyoxal 4% Agarose Beads 20-75 μm (BioScience, USA)

Mikrotitrační destička P (Gama Group, Česká republika)

Syringe Filter 0,45 μl , PTFE Filter Media (Whatman, USA)

Bio-Spin Disposable Chromatography Columns - 1,0 \times 10,0 cm (Bio-Rad, USA)

10 ml chromatografická kolona – 0,8 \times 4,0 cm (Sigma-Aldrich, USA)

2.1.3 Přístroje

Accublock Digital Dry Bath (Labnet International Inc., USA)

Analytické váhy Mettler Toledo AB 104 (Váhy a vážící systémy – Petr Hepnar, Česká Republika)

Chromatografická kolona ZOBRA XDB – C18 (Agilent, USA)

MALDI TOF/TOF MS (Bruker Daltonics, Německo)

Multiscan MCC/340 (Labsystem, Finsko)

Orbital Incubator SI 50 (Barloworld-Scientific, Velká Británie)

pH metr 3305 (Jenway, Velká Británie)

Skleněná elektroda HC 143 (Theta'90, Česká Republika)

Software CSW dodaný firmou Ecom (Česká Republika)

Spektrofotometrický detektor OPAL (Ecom, Praha, Česká Republika)

Termostatová lázeň (Julabo, USA)

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf, který se skládá z následujících částí:

Beta gradientová pumpa (Ecom, Česká Republika)

Dávkovač D (Ecom, Česká Republika)

Dynamická směšovací komora (Knauer, Německo)

Kolektor frakcí 2110 (Bio-Rad, USA)

Odvzdušňovač mobilní fáze Degasser Dg 3014 (Ecom, Česká Republika)

Termostat kolony (Ecom, Česká Republika)

UV / VIS spektrofotometrický detektor LCD 2084 (Ecom, Česká Republika)

2.2 Pracovní postupy

2.2.1 Analytické metody

2.2.1.1 Stanovení koncentrace proteinu

Pro zjištění koncentrace bílkoviny ve vzorku byla použita BCA metoda (viz. Kap.1.2.3), poprvé popsaná Smithem a spol. [40]. Principem stanovení je redukce Cu^{2+} iontů na Cu^+ ionty v alkalickém prostředí. Produkce Cu^+ iontů je funkcí koncentrace proteinu ve vzorku a závisí též na době inkubace. Reakcí Cu^+ iontů s bicinchoninovou kyselinou (BCA) vzniká fialově zbarvený komplex, měřitelný spektrofotometricky [41].

Postup

Stanovení koncentrace proteinu bylo provedeno v mikrotitrační destičce. K 40 μl vzorku bylo přidáno 200 μl směsi A + B (směs A: 1 % bicinchoninát sodný, 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,16 % vinan sodný, 0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO_3 , (pH 11,25); směs B: 4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v deionizované vodě) v poměru 49:1. Stanovení bylo prováděno ve dvou paralelních vzorcích.

Destička byla 5 minut třepána a poté umístěna do termobloku předehřátého na teplotu 60 °C. Po 30 minutách byla změřena absorbance při 540 nm na přístroji Multiscan MCC/340. Koncentrace proteinu byla určena z kalibrační závislosti absorbance standardního roztoku BSA na jeho známé koncentraci. Kalibrační závislost standardu byla vždy nově měřena spolu s měřenými vzorky.

2.2.1.2 Stanovení enzymové aktivity imobilizovaného α -chymotrypsinu

Enzymová aktivita α -chymotrypsinu imobilizovaného na magnetických agarózových mikročasticích byla stanovena metodou podle Nagela a spol. [13]. Pro stanovení byl použit nízkomolekulární substrát N-sukcinyl-L-fenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA).

Postup

K 2,4 ml 0,1 M Tris-HCl pufru (pH 7,8), který obsahoval 0,025 M chlorid vápenatý,

bylo přidáno 200 μl suspenze magnetických částic s imobilizovaným enzymem a 100 μl substrátu (100 mg SUPHEPA v 10 ml N,N-dimetylformamidu). Směs byla inkubována 10 minut při teplotě 37 °C. Přidáním 0,5 ml 30 % kyseliny octové byla reakce zastavena, poté byla měřena absorbance při 405 nm.

Pro sestrojení kalibrační závislosti bylo použito místo suspenze magnetických částic s navázaným enzymem 200 μl roztoku α -chymotrypsinu o vzrůstajícím množství enzymu - 150, 200, 250, 300, 350 a 400 μg , ostatní činidla byla přidána ve stejném množství.

Enzymová aktivita α -chymotrypsinu imobilizovaného na magnetické částice byla stanovena ze závislosti aktivity volného α -chymotrypsinu na množství volné proteinázy. Bylo určeno, jakému množství volné formy enzymu v 200 μl roztoku proteinázy odpovídá aktivita enzymu imobilizovaného na 200 μl magnetických částic.

Pro zvýšení citlivosti spektrofotometrické detekce byla alternativně stanovení provedena s nižšími objemy reakčních činidel. Do 1,0 ml 0,1 M Tris-HCl pufru (pH 7,8), obsahující 0,025 M chlorid vápenatý, bylo přidáno 200 μl suspenze magnetických částic s imobilizovaným α -chymotrypsinem (200 μl volného α -chymotrypsinu) a 100 μl substrátu (100 mg SUPHEPA v 10,0 ml N,N-dimetylformamidu). Další kroky stanovení zůstaly stejné.

2.2.2 Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetických částicích

Imobilizace α -chymotrypsinu na magnetických částicích byla provedena na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Karlovy Univerzity v Praze následujícím postupem.

Postup

1,0 ml komerčně dodaných agarosových magnetických částic byl promyt 0,1 M roztokem NaHCO_3 , smíchán s 2,0 ml roztoku α -chymotrypsinu (11,5 mg v 1,0 ml 0,1 M NaHCO_3) a za stálého třepání byla směs inkubována při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin.

Poté byly částice s navázaným α -chymotrypsinem třikrát promyty 2,0 ml 0,1 M NaHCO_3 a neobsazené $-\text{CHO}$ skupiny byly deaktivovány 2,0 ml roztoku glycinu (10 mg v 1,0 ml 0,1 M NaHCO_3) po dobu 60 minut. Po promytí destilovanou vodou a 0,1 M NaHCO_3 byly magnetické částice redukovány 30 minut 2,0 ml roztokem kyanoborhydridu sodného (7,5 mg v 1,0 ml 0,1 M NaHCO_3) a konečně promyty

0,1 M NaHCO₃, destilovanou vodou a fosforečnanovým pufrem.

2.2.3 Štěpení prasečího pepsinu α -chymotrypsinem

Prasečí pepsin byl štěpen upravenou modifikovanou metodou podle Stone a spol [50].

Postup

8 mg prasečího pepsinu A bylo rozpuštěno v 2,0 ml roztoku 0,4 M NH₄HCO₃ obsahujícího 8 M močovinu. Bylo přidáno 200 μ l 0,045 M DTT a směs byla inkubována za stálého míchání 15 minut při 50 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 200 μ l 0,01 M IAA a směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Poté bylo přidáno 5,4 ml redestilované vody a 200 μ l roztoku α -chymotrypsinu (1 mg/ml) nebo 200 μ l suspenze magnetických částic s imobilizovaným α -chymotrypsinem. Reakční směs byla inkubována při teplotě 37 °C za stálého míchání po dobu 24 hodin. Reakce byla ukončena okyselením reakčního roztoku 30 % kyselinou octovou na pH 4, v případě imobilizovaného α -chymotrypsinu odstraněním magnetických částic z reakčního roztoku.

Při optimalizaci procesu štěpení byly teplota a doba inkubace vzorku se štěpící proteinázou α -chymotrypsinem měněny. Vzorek byl inkubován po dobu: 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 hodin. Po zjištění optimální doby inkubace bylo provedeno štěpení prasečího pepsinu α -chymotrypsinem po tuto dobu při teplotách: 8 °C, laboratorní teplotě (28 °C), standardní teplotě 37 °C a při teplotě 50 °C.

2.2.3.1 Upravená metoda štěpení prasečího pepsinu A

1 mg prasečího pepsinu A byl rozpuštěn v 1,0 ml 0,10 M octanového pufru s 1,00 M NaCl (pH 3,7) a pH reakční směsi bylo upraveno 1,60 M NH₄HCO₃ s obsahem 7,00 M močoviny na hodnotu 7,5 - 8,0. Po přidání 20 μ l 0,45 M DTT byla směs inkubována za stálého míchání po dobu 15 minut při 50 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 20 μ l 0,10 M IAA a směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Následně bylo přidáno 100 μ l roztoku α -chymotrypsinu (1 mg/ml) nebo 100 μ l suspenze magnetických částic s imobilizovaným α -chymotrypsinem. Reakční

směs byla inkubována při teplotě 37 °C za stálého míchání po dobu 24 hodin. Reakce byla ukončena okyselením reakčního roztoku koncentrovanou kyselinou trifluoroctovou na (TFA) pH 4,0, v případě imobilizovaného α -chymotrypsinu odstraněním magnetických částic z reakčního roztoku.

2.2.4 Separace peptidů

2.2.4.1 RP-HPLC separace peptidových fragmentů

Peptidy prasečího pepsinu A, vzniklé štěpením pomocí α -chymotrypsinu, byly separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s reverzní fází.

Postup

Vzorek peptidů byl nanesen na kolonu ZOBRA X Eclipse XDB-C18 (4,6 × 150 mm, 3,5 μ m) pomocí šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou. Objem nástřiku byl 200 μ l, průtoková rychlost 0,5 ml/min a teplota kolony 40 °C. Byla použita následující eluce: 5 min izokraticky eluentem A (0,1 % TCA), pak lineárním gradientem eluentu B (60 % ACN v 0,1 % roztoku TCA) od 0 % do 75 % B během 60 min, nakonec izokraticky 10 min 100 % eluentem B. Separované peptidy byly detegovány spektrofotometricky při vlnové délce 220 nm.

2.2.4.2 Separace fosforylovaných peptidů pomocí Fe(III)-IMAC

Separace fosfopeptidů vzniklých chymotryptickým štěpením prasečího pepsinu A byla provedena pomocí nízkotlaké afinitní chromatografie na imobilizovaných železitých iontech.

Postup

Na chromatografickou kolonu (1,0 × 10,0 cm), která byla naplněna 3,0 ml Sepharosy obsahující vázanou IDA, byly naneseny 2,0 ml 0,05 M roztoku FeCl₃. Nezachycené Fe³⁺ ionty byly odstraněny promytím kolony 30,0 ml deionizované vody. Poté byla kolona promyta 30,0 ml equilibračního 0,10 M octanového pufru (pH 5,6). Na připravenou kolonu byl nanesen vzorek peptidů a provedena equilibrace 30,0 ml 0,10 M octanového

pufri (pH 5,6). Adsorbované peptidy byly eluovány izokraticky 30,0 ml 0,05 M fosforečnanového pufri (pH 6,0), průtokovou rychlostí 0,33 ml/min a detegovány spektrofotometricky UV detektorem při 280 nm.

Po každé analýze byly navázané Fe^{3+} ionty z kolony odstraněny 3,0 - 5,0 ml 0,20 M roztoku EDTA.

Z důvodů snížení objemů roztoků a zamezení nežádoucímu ředění vzorku bylo použito pro separaci 1,0 ml chromatografické kolony ($0,8 \times 4,0$ cm). Ta byla naplněna 1,0 ml Sepharosy s navázanou IDA a promyta 20,0 ml deionizované vody. Poté bylo na kolonu nanášeno 10,0 ml 0,1 M roztoku FeCl_3 a kolona byla postupně promyta 20,0 ml deionizované vody, 20,0 ml 0,05 M octanového pufri (pH 4,0), 20,0 ml 0,05 M fosforečnanového pufri (pH 7,2), opět 20,0 ml octanového pufri, 20,0 ml eluční fáze RP-HPLC systému (60 % ACN v 0,1 % TCA) a znovu 20,0 ml octanového pufri. Na takto připravenou kolonu byl nanášen vzorek a kolona byla equilibrována 20,0 ml 0,05 M octanového pufri (pH 4,0). Eluce byla provedena izokraticky, 2,0 ml 0,05 M fosforečnanového pufri (pH 7,2). První dvě 0,5 ml eluční frakce byly zachyceny a analyzovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

2.2.5 Přečištění vzorku před hmotnostní detekcí

Pro snížení šumu v záznamu MS detektoru byl vzorek po separaci pomocí Fe(III)-IMAC zbaven elučního fosforečnanového pufri přečištěním extrakcí tuhou fází (SPE; Perfect Pure C-18 Tip, Eppendorf)

Postup

SPE kolonka s C-18 fází byla $10 \times$ promyta 10 μl 50 % roztoku ACN a následně $10 \times 10 \mu\text{l}$ 0,1 % TFA. Poté byl na kolonku pomalu nanášen vzorek, $10 \times 10 \mu\text{l}$, přičemž při vypouštění vzorku byla vznikající kapka několikrát opětovně nasávána pipetou zpět. Po nanášení vzorku byla kolonka znovu promyta $10 \times 10 \mu\text{l}$ 0,1 % roztoku TFA, druhá a třetí frakce byla zachycena. Vzorek byl eluován $2 \times 2 \mu\text{l}$ roztoku 0,1 % TFA v 50 % ACN. Eluát byl sbírán a zamražen pro pozdější identifikaci peptidů metodou MALDI-TOF.

2.2.6 Analýza vzorků pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Analýzu provedl Mgr. Petr Příkryl z Ústavu patologické fyziologie 1. Lékařské fakulty na přístroji MALDI TOF/TOF MS (Bruker Daltonics, Německo).

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

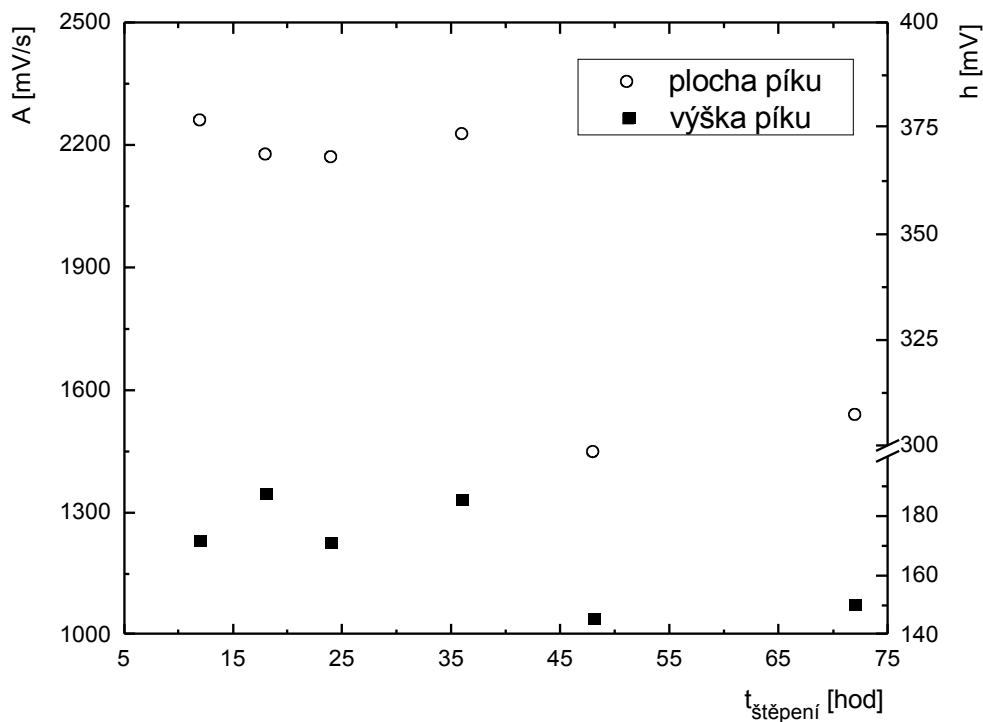
3.1 Optimalizace procesu štěpení prasečího pepsinu A volným α -chymotrypsinem

3.1.1 Vliv doby na štěpení prasečího pepsinu A

Štěpení prasečího pepsinu A bylo provedeno za konstantních podmínek (viz. Kap. 2.2.3.1). Analyzovaná bílkovina byla inkubována s roztokem volného α -chymotrypsinu po dobu 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 hodin. Vyhodnocení bylo provedeno na základě chromatografického záznamu separace vzniklých peptidů pomocí RP-HPLC s UV detekcí. Byl vybrán nejvyšší pík s t_R v rozmezí 20 - 35 min (předpokládaný výskyt fosforylovaného peptidu [3,4]). U tohoto píku ($t_R = 32,41$ min) byly porovnány změny plochy a výšky během měnící se reakční doby.

Výsledky proteolytického štěpení prasečího pepsinu A po třech a šesti hodinách byly nereprodukovatelné. To mohlo být způsobeno autolytickým štěpením pepsinu. Po zastavení reakce okyselením reakční směsi došlo sice k inaktivaci α -chymotrypsinu, ale nerozštěpený pepsin mohl být tímto krokem aktivován (největší aktivitu vykazuje v kyselém prostředí), což mohlo způsobit jeho autolytické štěpení.

Po 12 hodinách štěpení měly porovnávané chromatogramy stejný charakter. Lišily se pouze ve velikostech ploch a výšek píků. Na Obr. 3.1 jsou porovnány změny plochy a výšky píku $t_R = 32,41$ min v závislosti na délce štěpení. Jako optimální byla stanovena doba štěpení 24 hodin, plocha a výška píku je dostatečně veliká. Štěpením po dobu 36 hod bylo dosaženo vyšších hodnot plochy a výšky tohoto píku v porovnání s dobou štěpení 24 hod, avšak změna nebyla veliká a z důvodu zbytečného prodloužení doby analýzy bylo zvoleno 24 hod jako optimální.

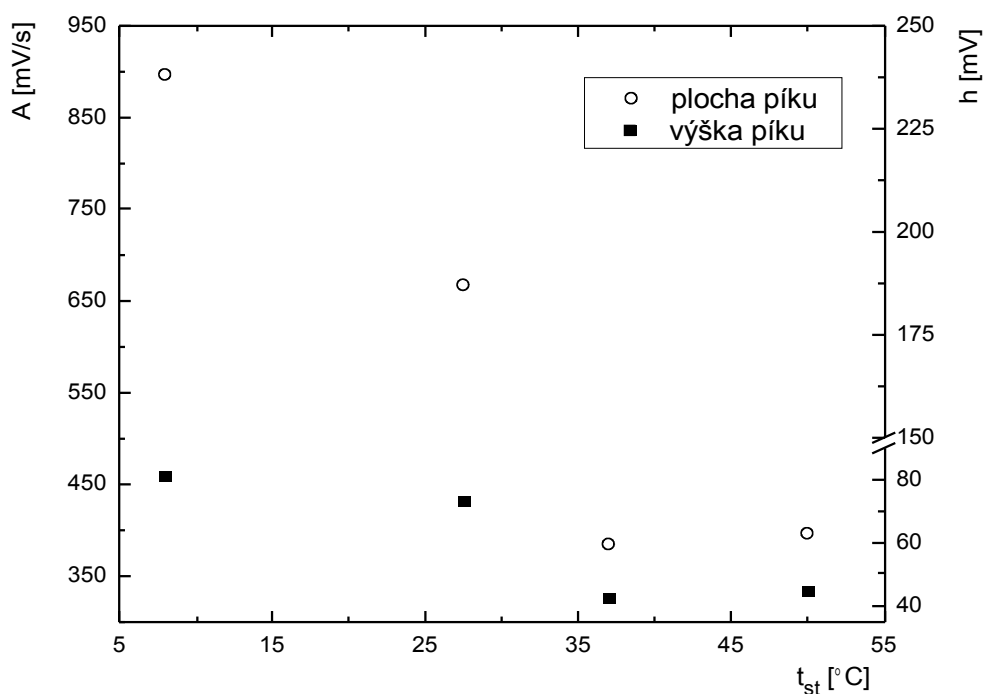


Obrázek 3.1: Změny plochy a výšky píku $t_R = 32,41$ min v závislosti na době štěpení prasečího pepsinu A α -chymotrypsinem.

8 mg prasečího pepsinu A; 200 μ l roztoku volného α -chymotrypsinu (1mg/ml); štěpení: 12, 18, 24, 36, 48, 72 hod. při 37 °C; RP-HPLC separace: dávkování: 200 μ l; F = 0.5 ml/min; eluce: 5 min equilibrační fáze A: 0,1/99,9 (v/v) TCA/deionizovaná H₂O, 60 min gradient 0 – 75 % eluční fáze B: 40/60 (v/v) A/ACN, 10 min 100 % B; detekce: 220 nm. A je plocha píku [mV/s], h výška píku [mV] a t_{st} doba štěpení [hod] volným α -chymotrypsinem.

3.1.2 Vliv teploty na štěpení prasečího pepsinu A

Po určení optimální doby štěpení bylo nutné určit optimální teplotu štěpení. Postup při přípravě štěpů byl stejný jako při optimalizaci reakční doby, po přidání volného α -chymotrypsinu byla reakční směs inkubována po dobu 24 hodin při teplotě 8 °C, laboratorní teplotě (28 °C), standardní teplotě 37 °C a při teplotě 50 °C. Vyhodnocení bylo provedeno porovnáním změn plochy a výšky píku $t_R = 33,35$ min chromatografického záznamu separace pomocí RP-HPLC, během měnící se teploty štěpení (viz.Obr.3.2).



Obrázek 3.2: Změny plochy a výšky píku $t_R = 33,35$ min v závislosti na měnící se teplotě štěpení.

8 mg prasečího pepsinu A; 200 μ l roztoku volného α -chymotrypsinu (1mg/ml); štěpení: 24 hod. při 8, 28, 37, 50 °C; RP-HPLC separace: dávkování: 200 μ l; F = 0.5 ml/min; eluce: 5 min equilibrační fáze A: 0,1/99,9 (v/v) TCA/deionizovaná H_2O , 60 min gradient 0 – 75 % eluční fáze B: 40/60 (v/v) A/ACN, 10 min 100 % B; detekce: 220 nm. A je plocha píku [mV/s], h výška píku [mV] a t_{st} teplota štěpení [°C] volným α -chymotrypsinem.

Třebaže byl signál UV detektoru při teplotách 8 a 27 °C vyšší než při teplotě 37 °C, byla měření při těchto teplotách nereprodukovatelná.

37 °C bylo podle předpokladu pro aktivitu α -chymotrypsinu ideální. Při teplotě 50 °C bylo dosaženo podobného charakteru chromatogramu. Odlišnosti ve velikosti plochy a výšky píku $t_R = 33,35$ min byly v porovnání s teplotou štěpení 37 °C malé.

3.2 Separace hydrolytických štěpů prasečího pepsinu A

Vzhledem k obtížné dostupnosti vzorků lidských pepsinogenů a pepsinů bylo pro studium peptidů použito modelové bílkoviny, prasečího pepsinu A.

Prasečí pepsin A má podobné aminokyselinové složení a vlastnosti jako lidský pepsin A. Navíc ve své molekule obsahuje jednu fosfátovou skupinu, čímž je vhodným modelem i pro studium fosforylace pepsinů.

V primární struktuře molekuly prasečího pepsinu A je obsaženo malé množství bazických aminokyselin, dva argininylové a jeden lisylový zbytek v C-koncové části peptidového řetězce. Z toho důvodu je použití trypsinu pro hydrolytické štěpení molekuly nevhodné. Ke štěpení byl použit α -chymotrypsin.

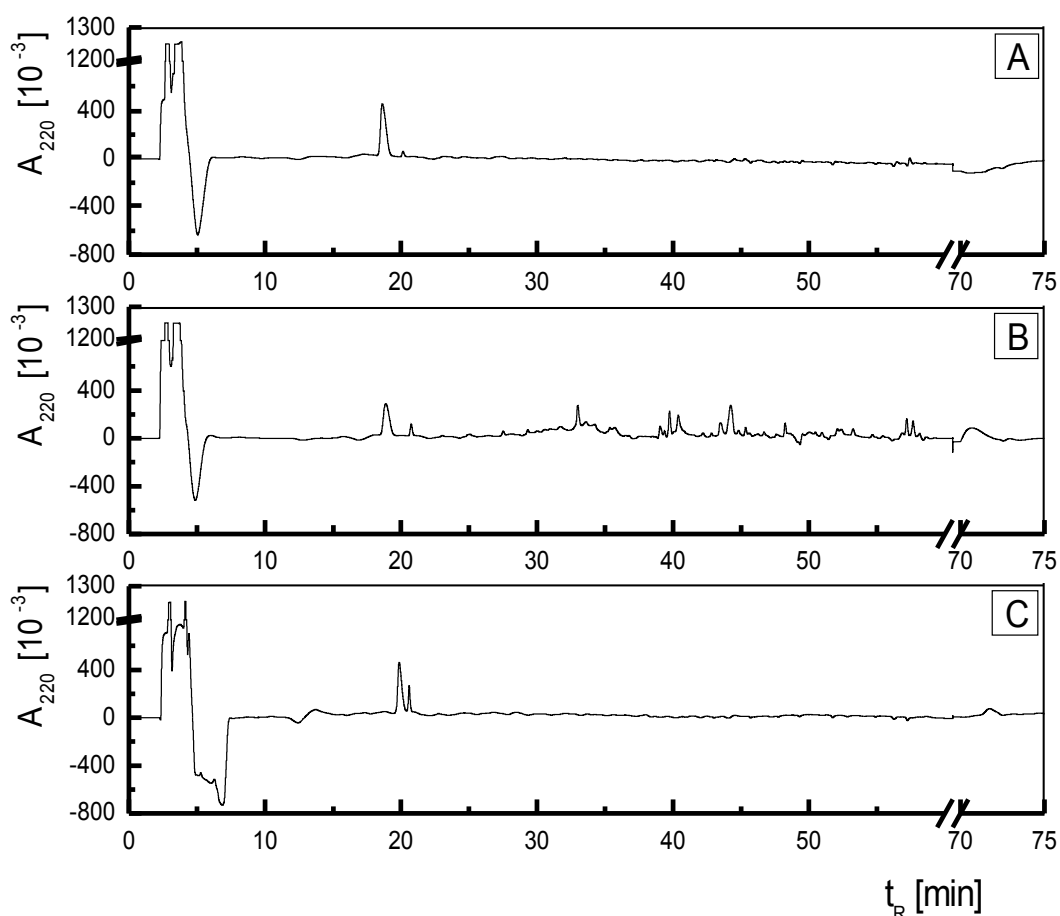
3.2.1 Štěpení prasečího pepsinu A volným α -chymotrypsinem

3.2.1.1 RP-HPLC separace hydrolytických štěpů prasečího pepsinu A

Chromatografický záznam peptidů získaných štěpením prasečího pepsinu A volným α -chymotrypsinem je na Obr. 3.3. Štěpení probíhalo za optimálních podmínek, separace byla provedena lineárním gradientem eluentu B – 60 % ACN v rozpouštědle A - 0,1% TCA (0 až 75 %) po dobu 60 min. Zároveň byla provedena slepá analýza bez přítomnosti prasečího pepsinu A za stejných podmínek štěpení.

Pro identifikaci píků chromatogramu, které přísluší složkám reakční směsi, byla za stejných podmínek provedena analýza směsi močoviny, NH_4HCO_3 , DTT a IAA. Koncentrace všech složek směsi byla stejná jako ve finálním hydrolyzovaném vzorku prasečího pepsinu A. Srovnání chromatogramů slepého vzorku a vzorku obsahující

hydrolyzát je uvedeno na Obr. 3.3.



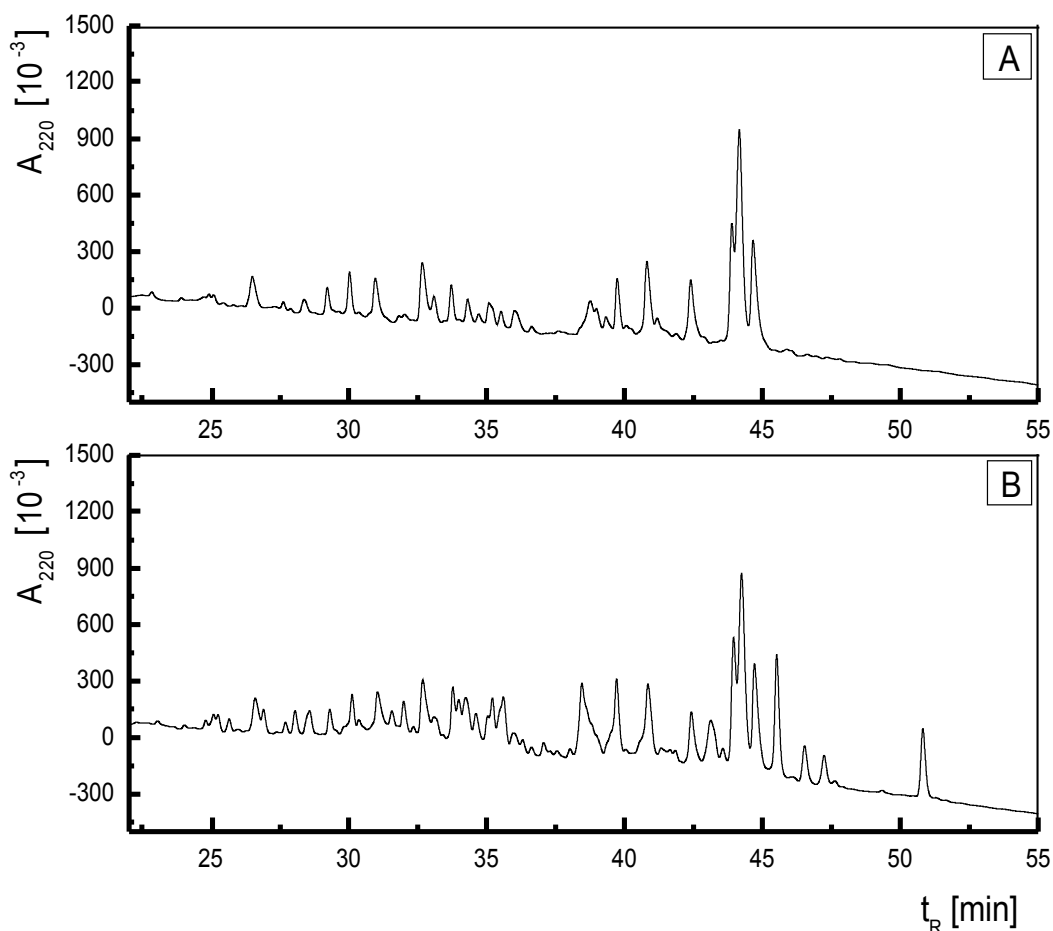
Obrázek 3.3: Porovnání chromatogramů A) slepého vzorku α -chymotrypsinu, B) vzorku hydrolytických štěpů prasečího pepsinu A v kompletní reakční směsi, C) slepého vzorku složek reakční směsi.

Vzorek A: 200 μ l roztoku volného α -chymotrypsinu (1 mg/ml) v reakční směsi; vzorek B: 8 mg prasečího pepsinu A, 200 μ l volného α -chymotrypsinu (1 mg/ml) v reakční směsi; vzorek C: reakční směs DTT, IAA, močovina, NH_4HCO_3 ; štěpení: 24 hod. při 37 °C; RP-HPLC separace: dávkování: 200 μ l; $F = 0.5$ ml/min; eluce: 5 min equilibrační fáze A: 0,1/99,9 (v/v) TCA/deionizovaná H_2O , 60 min gradient 0 – 75 % eluční fáze B: 40/60 (v/v) A/ACN, 10 min 100 % B; detekce: 220 nm. A_{220} je absorbance při 220 nm, t_R retenční čas [min].

Z Obr. 3.3 vyplývá, že píky v časovém rozmezí 0-22 minut odpovídají složkám reakční směsi, dále pak eluují štěpné produkty prasečího pepsinu A.

Dále z Obr. 3.3 vyplývá, že při použití UV detekce nebyly prokázány žádné autolytické štěpy α -chymotrypsinu. Pomocí citlivější detekce hmotnostním detektorem MALDI-TOF/TOF však v roztoku volného α -chymotrypsinu jeho autolytické štěpy prokázány byly.

K prokázání autolytických štěpů enzymu metodou RP-HPLC s UV detekcí bylo použito vyšších koncentrací reakčních složek, postup štěpení viz. Kap. 2.2.3.1. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 3.4.



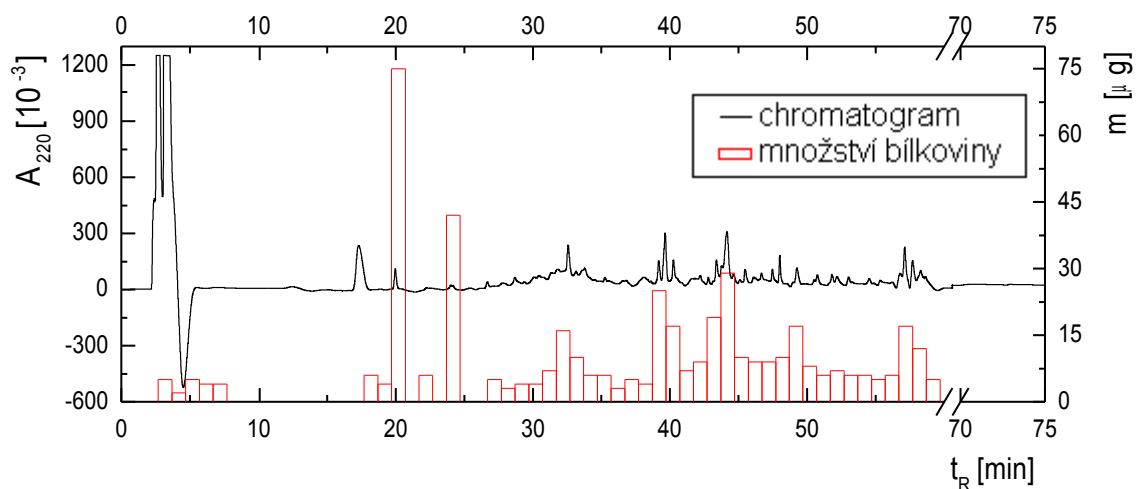
Obrázek 3.4: Porovnání separovaných autolytických štěpů volného α -chymotrypsinu A) a α -chymotryptických štěpů prasečího pepsinu A v kompletní reakční směsi B) pomocí RP-HPLC s UV detekcí.

200 μ l roztoku volného α -chymotrypsinu (1 mg/ml) (vz. A,B); 8 mg prasečího pepsinu A (vz. B); štěpení: 24 hod. při 37°C; RP-HPLC separace: dávkování: 200 μ l; F = 0.5 ml/min; eluce: 5 min equilibrační fáze

A: 0,1/99,9 (v/v) TCA/deionizovaná H₂O, 60 min gradient 0 – 75 % eluční fáze B: 40/60 (v/v) A/ACN, 10 min 100 % B; detekce: 220 nm. A₂₂₀ je absorbance při 220 nm, t_R retenční čas [min].

Z předešlého Obr. 3.4 vyplývá, že při analýze koncentrovanějšího roztoku α -chymotrypsinu pomocí RP-HPLC s UV detekcí byly v roztoku prokázány autolytické štěpy enzymu odpovídající píkům v oblasti 26–45 minuty, které v analýze (za stejných podmínek) méně koncentrovaného vzorku prokázány nebyly. Nepřítomnost autolytických štěpů v chromatografickém záznamu analýzy méně koncentrovaného vzorku je dána nižší citlivostí UV detekce.

V jednotlivých 0,5 ml frakcích získaných pomocí RP-HPLC bylo stanoveno množství bílkoviny metodou BCA. Jako standardu pro sestavení kalibrační závislosti bylo využito známých koncentrací hovězího sérového albuminu. Porovnání chromatografického záznamu separovaných peptidů a odpovídajícího množství bílkoviny v jednotlivých frakcích je uvedeno na Obr. 3.5.



Obrázek 3.5: Chromatografický záznam RP-HPLC separace směsi peptidů prasečího pepsinu A a množství bílkoviny v jednotlivých frakcích.

8 mg prasečího pepsinu A; 200 μ l roztoku volného α -chymotrypsinu (1mg/ml); štěpení: 24 hod. při 37 °C; RP-HPLC separace: dávkování: 200 μ l; F = 0.5 ml/min; eluce: 5 min equilibrační fáze A: 0,1/99,9 (v/v) TCA/deionizovaná H₂O, 60 min gradient 0 – 75 % eluční fáze B: 40/60 (v/v) A/ACN, 10 min 100 % B; detekce: 220 nm; stanovení bílkoviny: BCA metodou; standard BSA. A₂₂₀ je absorbance při 220

nm, t_R retenční čas [min], m hmotnost bílkoviny [μg] v 0,5 ml frakci.

Množství bílkoviny v jednotlivých frakcích BCA metodou odpovídá charakteru získaného chromatogramu štěpů prasečího pepsinu A. Ve frakcích získaných v 0 - 22 minutě byla reakce na bílkovinu také pozitivní. Jedná se o falešně pozitivní reakci, neboť v tomto časovém rozmezí, jak bylo prokázáno viz. výše Obr. 3.3, eluují složky reakční směsi. Bylo potvrzeno, že močovina dává falešně pozitivní reakci při této metodě [41].

3.2.1.2 Reprodukovenost metody štěpení volným α -chymotrypsinem s RP-HPLC separací

K vyhodnocení reprodukovatelnosti metody štěpení a následné separace fragmentů prasečího pepsinu A RP-HPLC bylo použito pěti nezávislých měření. Z chromatogramů bylo vybráno pět píků, u kterých byly následně porovnány výšky a plochy. Výsledky statistického vyhodnocení jsou uvedeny v Tabulce 3.1 A) (str.41).

Absolutní rozdíly v hodnotách retenčních časů nepřesahují 0,65 minut. Z vypočtených relativních směrodatných odchylek je zřejmé, že metoda je poměrně přesná. Větší chybou je zatíženo stanovení výšky píku, než plochy píku. Ve dvou případech vyhodnocení výšky píku z pěti nezávislých měření překročila hodnota relativní směrodatné odchylky 10 %, u vyhodnocení ploch píků byla nejvyšší hodnota směrodatné odchylky 8 %. Intervaly spolehlivosti byly vyjádřeny s pravděpodobností 95 %.

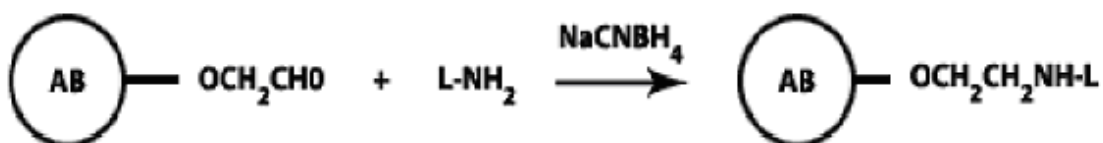
3.2.2 Štěpení prasečího pepsinu A imobilizovaným α -chymotrypsinem

3.2.2.1 RP-HPLC separace hydrolytických štěpů prasečího pepsinu A

Vzhledem k tomu, že při štěpení prasečího pepsinu roztokem volného α -chymotrypsinu byla ve směsi vzniklých peptidů dokázána přítomnost autolytických

štěpů proteinázy (viz. Kap. 3.2.1.1 Obr. 3.4), byla v dalších experimentech použita imobilizovaná forma enzymu. Pracovní postup imobilizace enzymu na magnetických mikročásticích je uveden v Kap 2.2.2.

Enzym byl vázán přes $-NH_2$ skupiny lysinových zbytků na $-CHO$ aktivované skupiny nosiče, agarózu obsahující magnetické mikročástice (viz Obr. 3.6). V prvním kroku vznikl málo stabilní meziproduct s dvojnou vazbou. Neobsazené aktivní $-CHO$ skupiny bylo nutno inaktivovat roztokem glycinu. Nakonec byla dvojná vazba stabilizována redukcí pomocí kyanoborhydridu sodného.

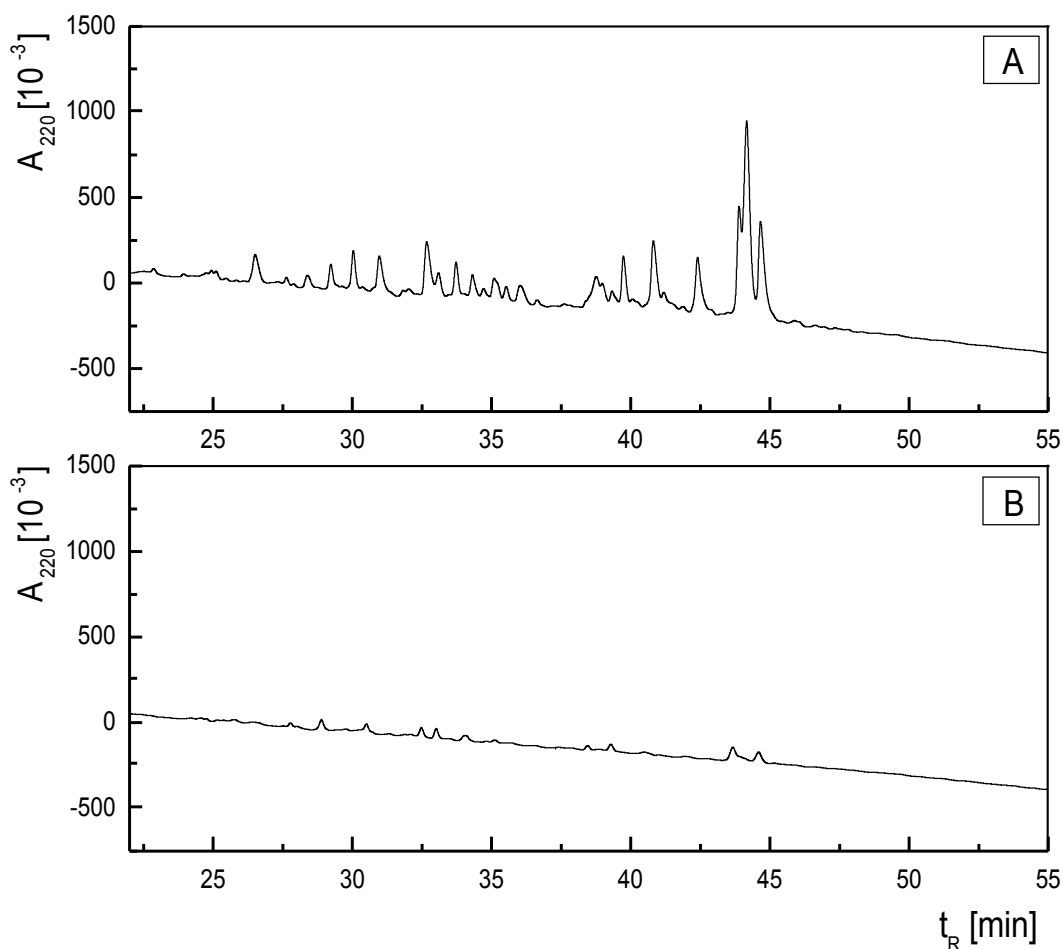


AB = agarózové magnetické mikročástice; L = ligand, lysinový zbytek vázaného α -chymotrypsinu (glycin)

Obrázek 3.6: Vazba α -chymotrypsinu na aktivovaný nosič, agarózové magnetické mikročástice.

Štěpení prasečího pepsinu A bylo provedeno postupem viz. Kap. 2.2.3.1.

Imobilizací α -chymotrypsinu byla autolytická schopnost enzymu minimalizována, což je patrné z porovnání chromatogramů volné a imobilizované formy enzymu (viz. Obr. 3.7).



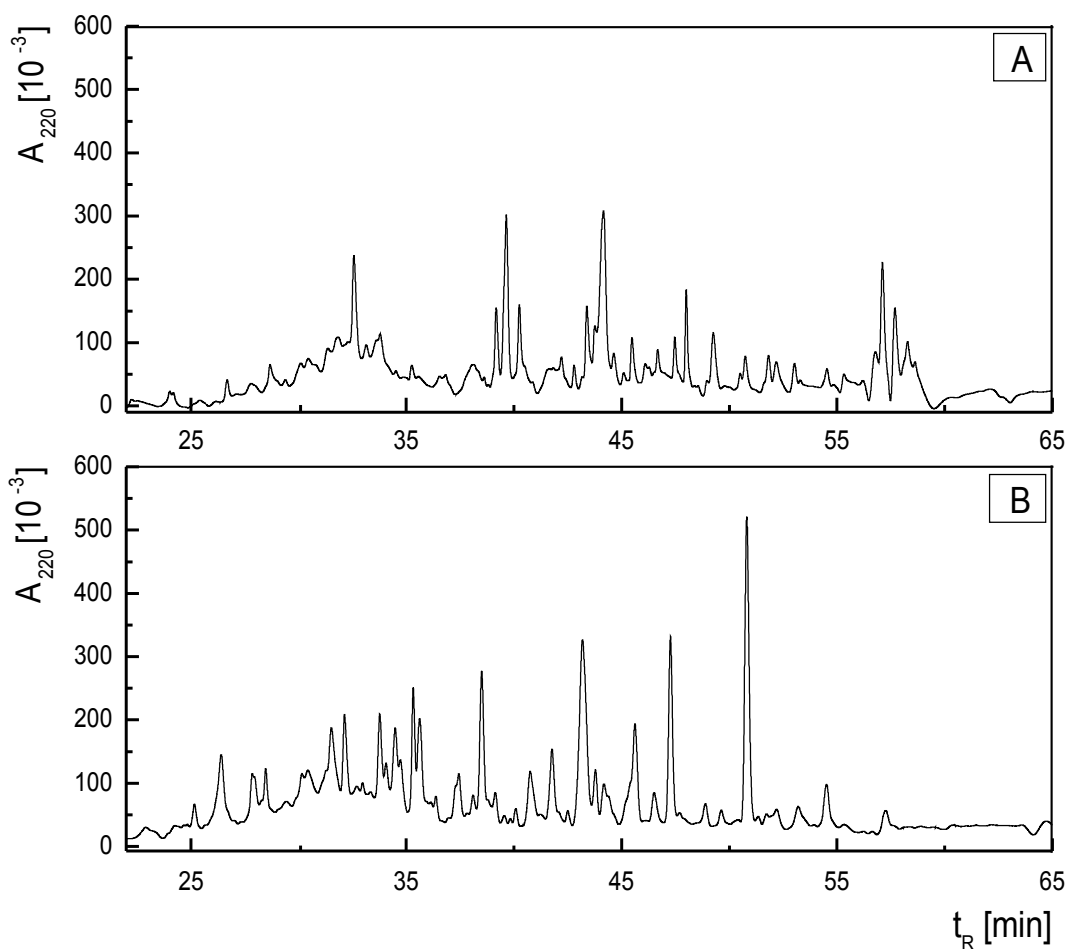
Obrázek 3.7: Porovnání chromatografických záznamů separace autolytických štěpů A) volné formy, B) imobilizované formy α -chymotrypsinu získaných pomocí RP-HPLC.

A: 200 μ l roztoku volného α -chymotrypsinu (1 mg/ml); B: 200 μ l suspenze magnetických částic s imobilizovaným enzymem; inkubace: 24 hod. při 37 °C; RP-HPLC separace: dávkování: 200 μ l; $F = 0.5$ ml/min; eluce: 5 min equilibrační fáze A: 0,1/99,9 (v/v) TCA/deionizovaná H_2O , 60 min gradient 0 – 75 % eluční fáze B: 40/60 (v/v) A/ACN, 10 min 100 % B; detekce: 220 nm. A_{220} je absorbance při 220 nm, t_R retenční čas [min].

Porovnání chromatografických záznamů separovaných peptidových fragmentů prasečího pepsinu A, štěpených jednak pomocí roztoku volného α -chymotrypsinu, jednak pomocí imobilizované formy, je na Obr. 3.8.

V případě imobilizovaného α -chymotrypsinu se zvětšily plochy a výšky píků, přičemž koncentrace prasečího pepsinu A při přípravě vzorků peptidů byla stejná u obou

forem štěpící proteinázy.



Obrázek 3.8: RP-HPLC separace chymotryptických štěpů prasečího pepsinu A získaných štěpením A) volným α -chymotrypsinem, B) imobilizovaným α -chymotrypsinem.

8 mg prasečího pepsinu A; A: 200 μ l roztoku volného α -chymotrypsinu (1mg/ml); B: 200 μ l suspenze magnetických částic s imobilizovaným enzymem; štěpení: 24 hod. při 37 °C; RP-HPLC separace: dávkování: 200 μ l; F = 0.5 ml/min; eluce: 5 min equilibrační fáze A: 0,1/99,9 (v/v) TCA/deionizovaná H₂O, 60 min gradient 0 – 75 % eluční fáze B: 40/60 (v/v) A/ACN, 10 min 100 % B; detekce: 220 nm. A_{220} je absorbance při 220 nm, t_R retenční čas [min].

3.2.2.2 Reprodukovenost metody štěpení imobilizovaným α -chymotrypsinem s RP-HPLC separací

Vyhodnocení reprodukovatelnosti metody štěpení prasečího pepsinu A s použitím imobilizovaného α -chymotrypsinu a následné RP-HPLC separace bylo provedeno z pěti nezávislých měření. Bylo vybráno šest píků¹, u kterých byly porovnány plochy a výšky.

Tabulka 3.1 A, B vyhodnocuje výsledné reprodukovatelnosti obou použitých postupů štěpení, pomocí roztoku volné formy enzymu A) a pomocí imobilizované formy B).

Použití imobilizované formy vedlo ke zvýšení reprodukovatelnosti výsledků. Absolutní rozdíly v hodnotách retenčních časů šesti porovnávaných píků v pěti nezávislých měřeních nepřesahují 0,14 min. Relativní směrodatné odchylky ploch a výšek píků klesly, v případě ploch nepřesahují 4,5%. Větší chybou jsou zatížena stanovení výšek píků, přesto však s, nepřesahují odchylku 10%.

¹ Vzhledem k odlišnosti chromatografických záznamů separace chymotryptických štěpů pepsinu získaných štěpením volnou formou a imobilizovanou formou enzymu, bylo vybráno pro vyhodnocení nových šest samostatných píků.

Tabulka.3.1: Reprodukovatelnost metody štěpení prasečího pepsinu s následnou RP-HPLC separací - použití **A)** volné formy α -chymotrypsinu; **B)** imobilizované formy α -chymotrypsinu.

číslo píku	retenční čas [min]		plocha [$\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$]		výška [μV]	
	medián	R s, [%]	medián	R s, [%]	medián	R s, [%]
		$L_{1,2}$		$L_{1,2}$		$L_{1,2}$
1	32,57	1,48	1586,85	119,80	147,74	45,99
2	39,74	0,22	2572,54	423,99	236,36	22,84
3	44,17	0,08	4797,19	395,82	237,84	71,76
4	49,52	0,58	985,19	189,08	80,13	12,61
5	57,11	0,51	1732,73	199,36	163,22	18,91

A)

číslo píku	retenční čas [min]		plocha [$\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$]		výška [μV]	
	Medián	R s, [%]	medián	R s, [%]	medián	R s, [%]
		$L_{1,2}$		$L_{1,2}$		$L_{1,2}$
1	34,54	0,22	3109,28	313,93	221,81	23,08
2	38,09	0,30	3460,17	108,60	242,19	31,78
3	42,70	0,22	5654,21	302,22	304,79	37,59
4	46,78	0,30	3520,28	29,35	272,20	40,02
5	50,58	0,30	6507,84	58,78	506,83	64,69
6	54,28	0,30	1729,70	81,32	156,66	35,22

B)

3.2.2.3 Stanovení enzymové aktivity imobilizovaného α -chymotrypsinu

Pro stanovení enzymové aktivity volného a imobilizovaného α -chymotrypsinu byla použita metoda podle Nagela a spol. [13], jako nízkomolekulární substrát byl použit N-sukcinyl-L-fenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA). Byla změřena jednak závislost enzymové aktivity volného α -chymotrypsinu na množství volné proteinázy v inkubačním roztoku (Obr. 3.9) a jednak závislost na koncentraci substrátu v reakční směsi (bylo použito konstantní množství α -chymotrypsinu (400 μ g) a koncentrace substrátu se zvyšovala, 5, 10, 20, 30 a 40 mg/ml). Při vyšším množství substrátu v reakční směsi se tvořila sraženina, před měřením aktivity bylo nutné vzorky filtrovat.

Na základě získaných závislostí byly zvoleny nejvhodnější podmínky stanovení: 200 μ l enzymu, 100 μ l substrátu o koncentraci 40 mg/ml, 1 ml reakčního pufru: 0,1 M Tris-HCl pufr (pH 7,8) s obsahem 0,025 M chloridu vápenatého.

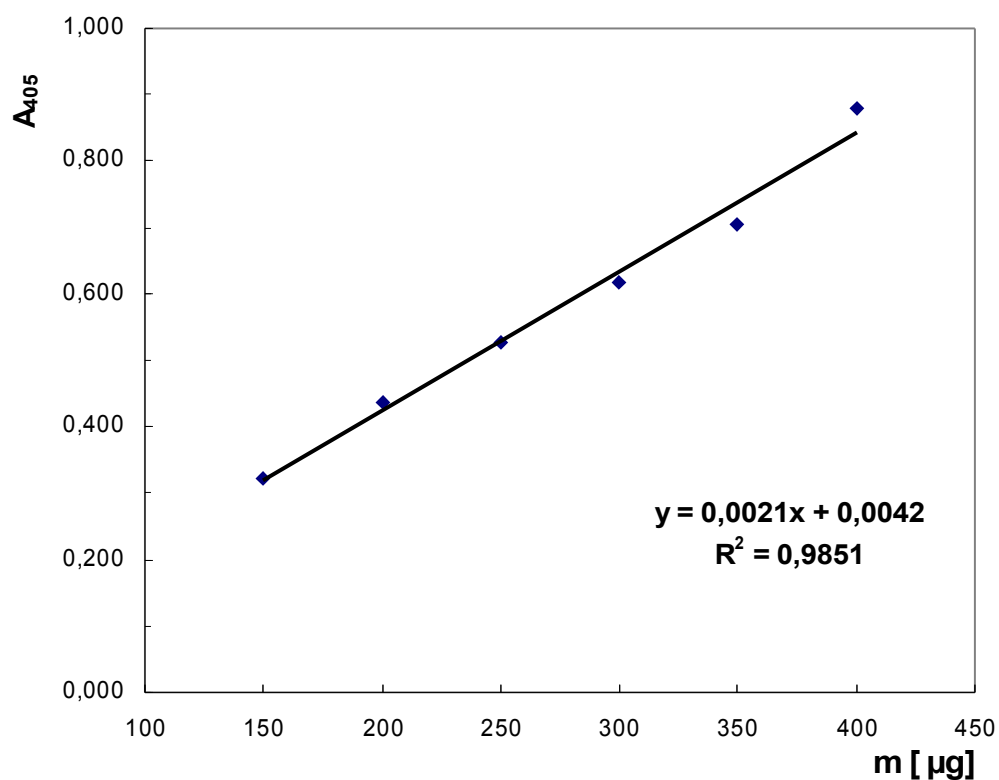
Dále byla stanovena enzymová aktivita α -chymotrypsinu imobilizovaného na magnetické částice. Ze závislosti aktivity volného α -chymotrypsinu na množství enzymu (Obr. 3.9) bylo zjištěno, že aktivita 200 μ l magnetických částic odpovídá aktivitě roztoku obsahujícího 422 μ g volného enzymu v 200 μ l reakčního pufru.

Vedle stanovení enzymové aktivity bylo množství navázaného α -chymotrypsinu přibližně určeno spektrofotometricky z rozdílu absorbancí roztoku enzymu před a po imobilizaci na magnetické částice, při 280 nm: 1 ml částic obsahoval přibližně 0,2 mg imobilizovaného enzymu.

Stanovení enzymové aktivity bylo dále použito ke sledování změn aktivity při opakovaném použití imobilizovaného enzymu ke štěpení. Bylo zjištěno, že po 10 násobném použití magnetických částic s imobilizovaným enzymem klesla jejich proteolytická aktivita 40x. Vzhledem k tomu, že analýza pomocí RP-HPLC neprokázala v případě imobilizovaného enzymu autolytické štěpení (Kap. 3.2.2.1), vysvětlení poklesu enzymové aktivity při opakovaném použití bude předmětem dalšího studia.

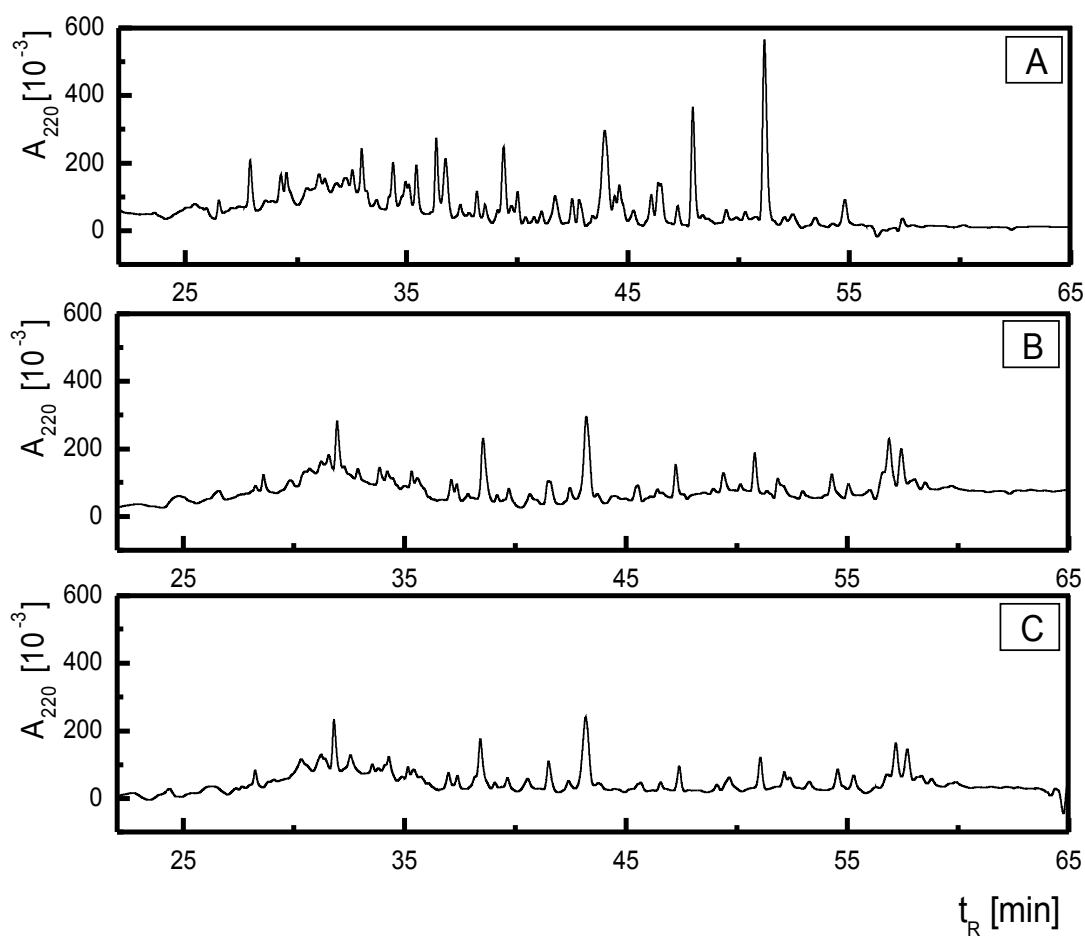
Na Obr. 3.10 jsou znázorněny výsledky RP-HPLC analýzy proteolytických štěpů prasečího pepsinu, získaných při opakovaném používání imobilizovaného α -chymotrypsinu. Jak je vidět z uvedených obrázků, plochy a výšky píků, které odpovídají peptidům prasečího pepsinu A, se v závislosti na četnosti používání magnetických částic snižují. Tato skutečnost odpovídá stanovené snížené aktivitě

opakovaně používaných částic s imobilizovaným enzymem.



Obrázek 3.9: Kalibrační závislost enzymové aktivity (vyjádřené změnou absorbance při 405 nm) volného α -chymotrypsinu na množství volné proteinázy v inkubačním roztoku.

Reakční pufr: 0,1 M Tris-HCl (pH 7,8) s obsahem 0,025 M chloridu vápenatého; koncentrace substrátu (SUPHEPA): 40 mg/ml; inkubace: 10 min při teplotě 37 °C. A_{405} je absorbance měřená při 405 nm, m [μg] obsah α -chymotrypsinu v 200 μl roztoku enzymu.



Obrázek 3.10: Porovnání chromatogramů α -chymotryptických štěpů prasečího pepsinu A, získaných štěpením A) nových, B) 2 \times použitých a C) 3 \times použitých magnetických mikročástic s imobilizovaným α -chymotrypsinem.

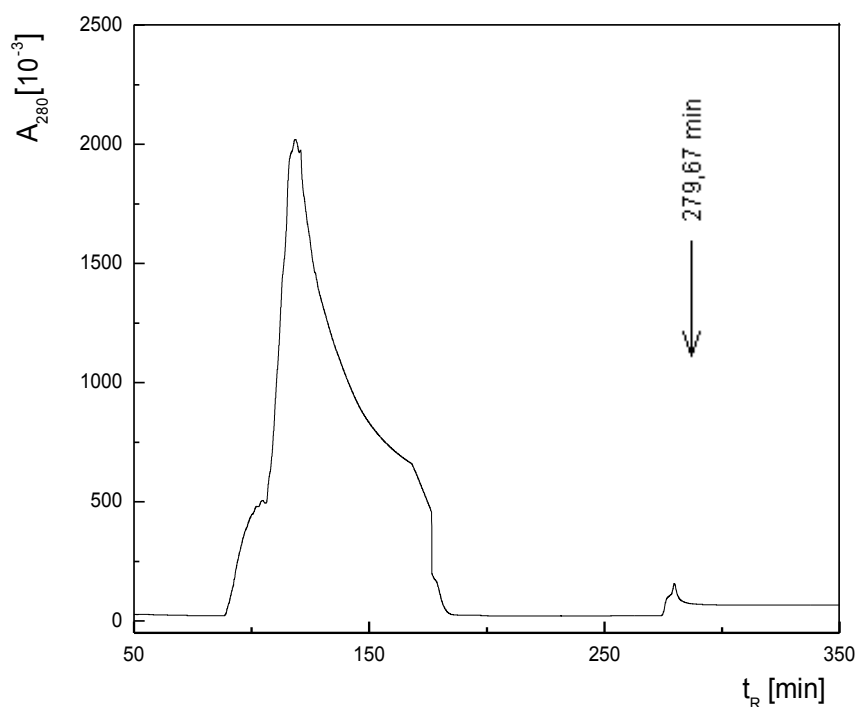
8 mg prasečího pepsinu A; 200 μ l suspenze magnetických částic s imobilizovaným enzymem; štěpení: 24 hod. při 37 $^{\circ}$ C; RP-HPLC separace: dávkování: 200 μ l; F = 0.5 ml/min; eluce: 5 min equilibrační fáze A: 0,1/99,9 (v/v) TCA/deionizovaná H₂O, 60 min gradient 0 – 75 % eluční fáze B: 40/60 (v/v) A/ACN, 10 min 100 % B; detekce: 220 nm. A_{220} je absorbance při 220 nm, t_R retenční čas [min].

3.3 Identifikace fosforylovaného peptidu prasečího pepsinu A v RP-HPLC chromatogramu

Molekula prasečího pepsinu A obsahuje jednu fosfátovou skupinu, vázanou na serinový zbytek v pozici 68. Z tohoto důvodu byl použit, jako modelová bílkovina k optimalizaci analytického postupu pro studium fosforylace lidských pepsinů a pepsinogenů.

3.3.1 Předseparace fosforylovaného peptidu pomocí Fe(III)-IMAC

Pro identifikaci píku, který odpovídá fosforylovanému peptidu v chromatografickém záznamu separace peptidů prasečího pepsinu A z RP-HPLC s UV detekcí, bylo použito nejprve předseparace fosfopeptidu pomocí Fe(III)-IMAC. Prasečí pepsin byl štěpen imobilizovaným α -chymotrypsinem. Pro separaci byla použita 10 ml chromatografická kolona (1,0 × 10,0 cm) naplněná 3 ml Sepharosy s navázanou IDA. Separace byla provedena postupem viz. Kap. 2.2.4.2. Chromatografický záznam je uveden na Obr. 3.11.



Obrázek 3.11: Separace fosforylovaného peptidu z chymotryptické směsi peptidů prasečího pepsinu A pomocí Fe(III)-IMAC.

8 mg prasečího pepsinu A; 200 μ l suspenze magnetických částic s imobilizovaným enzymem; štěpení: 24 hod. při 37 °C; equilibrace kolony 0,10 M octanovým pufrém (pH 5,6); izokratická eluce 0,05 M fosforečnanovým pufrém (pH 6,0); F: 0,33 ml/min; detekce: 280 nm. A_{280} je absorbance při 280 nm, t_R retenční čas [min].

Během nanesení vzorku na kolonu a equilibrace kolony (83-269 min) došlo k vymytí neadsorbovaných peptidů. V chromatogramu tvoří tyto peptidy první pík. Druhý pík v chromatogramu $t_R = 279,67$ min odpovídá fosforylovanému peptidu, jak bylo ověřeno metodou MALDI-TOF MS (poměr $m/z = 1321,56$).

V elučních frakcích Fe(III)-IMAC separace, sbíraných po 1 ml, byla stanovena bílkovina pomocí BCA metody. Frakce z časového rozmezí 268,9-350,0 min (eluce), která obsahovala největší množství bílkoviny, byla dávkována na RP-HPLC kolonu a následně byla provedena separace lineárním gradientem.

Předpokladem tohoto analytického postupu bylo získat jeden charakteristický pík

v chromatografickém záznamu, který by odpovídal fosforylovanému peptidu z prasečího pepsinu A. V chromatografickém záznamu separace však nebyl žádný pík prokázán. Důvodem je pravděpodobně velice nízká koncentrace fosfopeptidu, izolovaného pomocí Fe(III)-IMAC a nízká citlivost UV detekce. Během gradientové eluce došlo k rozmytí peptidu v mobilní fázi.

3.3.2 Spojení RP-HPLC předseparace se separací pomocí FE(III)-IMAC s hmotnostní detekcí

Na základě výsledků získaných předešlým měřením byl zvolen postup opačný. Peptidy prasečího pepsinu získané štěpením imobilizovaným α -chymotrypsinem byly nejprve předseparovány pomocí RP-HPLC systému. Eluce byla provedena lineárním gradientem viz. Kap. 2.2.4.1. Chromatografický záznam byl rozdělen na 9 pětiminutových úseků (16.-20., 21.-25., 26.-30., 31.-35., 36.-40., 41.-45., 46.-50., 51.-55., 56.-60. minuta). Během 10 analýz byly frakce z těchto úseků sbírány a slity do 9 vzorků, odpovídajících vždy danému časovému úseku.

Jednotlivé vzorky byly nanесeny na Fe(III)-IMAC kolonu. Bylo použito 1 ml kolony ($0,8 \times 4,0$ cm), pro snížení objemů roztoků a zamezení nežádoucímu ředění vzorku. Postup separace je uveden v Kap. 2.2.4.2. Detekce elučnicích frakcí byla provedena pomocí MALDI-TOF MS.

Vzorek z úseku 31.-35. min z RP-HPLC systému obsahoval hledaný fosforylovaný peptid z prasečího pepsinu A ($m/z = 1321,56$).

V analyzovaných vzorcích 1-9 byly nalezeny peptidy prasečího pepsinu A, které obsahovaly větší množství kyselých aminokyselinových zbytků. Tento výsledek se shoduje s výsledky Krabba a spol. [27]. Navíc byly nalezeny i tzv. „miss-cleavage“ fragmenty, které měly být podle předpokládané specifity štěpící proteinázy α -chymotrypsinu štěpeny na více místech na menší fragmenty.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byl ve frakci z 41.-45. minuty prokázán peptid odpovídající autolytickému štěpu α -chymotrypsinu. Intenzita signálu tohoto štěpu z MS detektoru není vysoká (kolem 500 a.u.).

Souhrn identifikovaných látek pomocí MALDI-TOF je uveden v Tab. 3.2.

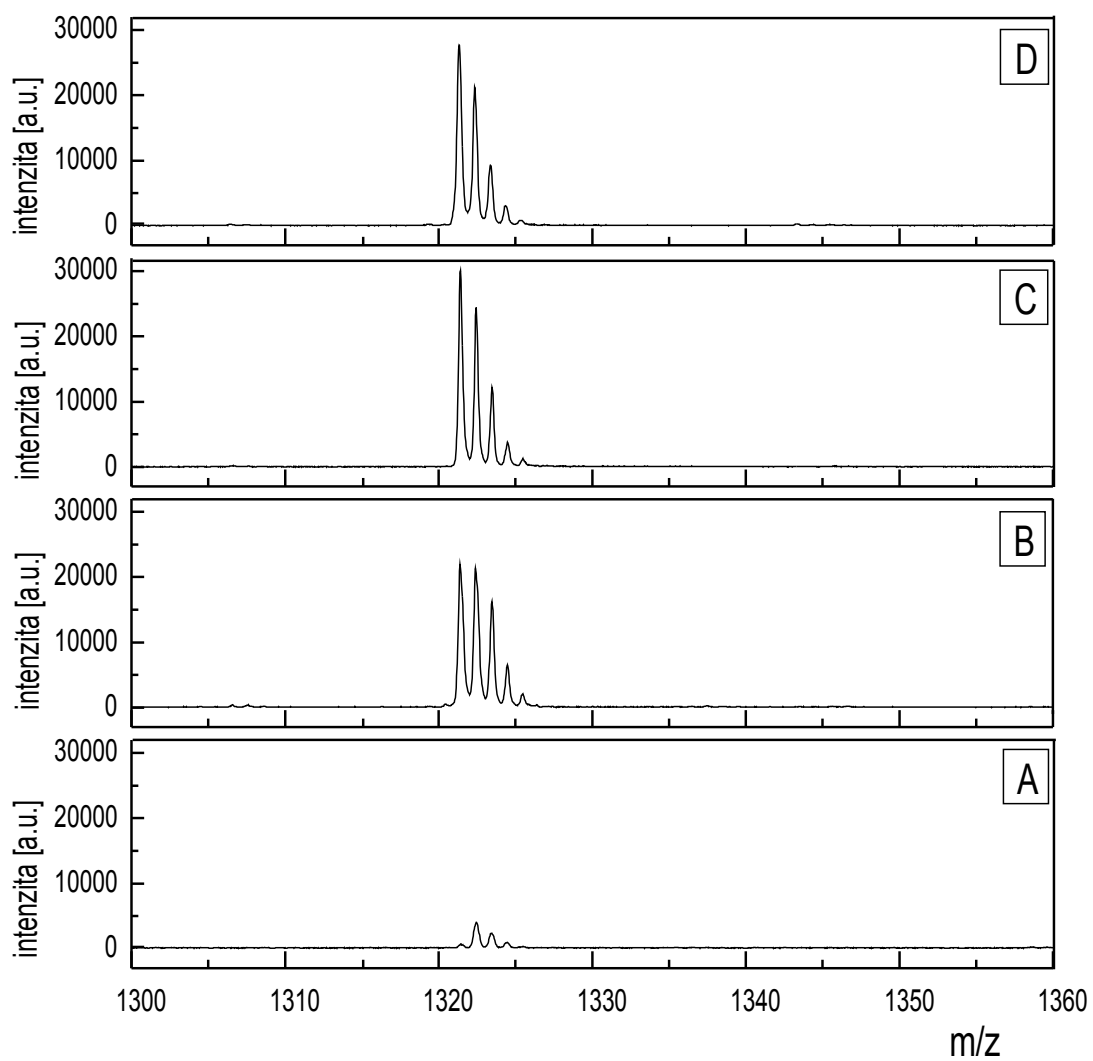
Tabulka 3.2: Identifikované látky pomocí MALDI-TOF v RP-HPLC frakcích po separaci fosfopeptidů na Fe(III)-IMAC koloně.

Identifikovaná látka	Frakce
<i>fosforylovaný peptid z prasečího pepsinu A</i> ($m/z = 1321,56$) <i>peptidy prasečího pepsinu A</i>	4. (31. – 35. min) 1. – 9.
(obsah kyselých aminokyselinových zbytků) <i>„miss-cleavage“ fragmenty</i> (málo naštěpené peptidy)	1. – 9.
<i>peptid odpovídající autolytickému štěpu α-chymotrypsinu</i>	6. (41. – 45. min)

Jak již bylo zmíněno, tímto postupem byl vymezen časový úsek 31.-35. min v záznamu z RP-HPLC systému s UV detekcí, kde byla potvrzena přítomnost fosfopeptidu. Pro přesnější identifikaci bylo provedeno dalších 10 separací hydrolytických štěpů modelového pepsinu, ze kterých byly sbírány minutové frakce z úseku 31.-35. min. Tyto frakce z RP-HPLC předseparace byly nanášeny na Fe(III)-IMAC kolonu. Eluát z Fe(III)-IMAC separace byl analyzován pomocí MALDI-TOF MS.

Hledaný fosfopeptid (poměr $m/z = 1321,56$) s relativní molekulovou hmotností 41236,110 eluoval během 32. až 35. minuty separace, přičemž největší koncentrace byla ve frakci z 34. minuty, viz. Obr. 3.12. Aminokyselinové složení tohoto peptidu je: E-A-T-S-Q-E-L-S-I-T-Y, kde první uvedený serin obsahuje fosfátovou skupinu.

Porovnáním výsledků MS analýzy s chromatografickým záznamem hydrolytických štěpů prasečího pepsinu A z RP-HPLC separačního systému (viz. Obr.3.8), by mohl hledanému fosfopeptidu odpovídat pík s $R_t=34,54$ min. Avšak jak je patrné z Obr. 3.12, hledaný fosfopeptid eluuje ve třech frakcích v časovém rozmezí 33-35 min. Nelze tedy v chromatogramu chymotryptické směsi prasečího pepsinu fosforylovanému peptidu přiřadit jeden pík.



Obrázek 3.12: Záznam MS analyzy A) 32., B) 33., C) 34., a D) 35. frakce z RP-HPLC separace chymotryptické směsi štěpů prasečího pepsinu A po Fe(III)-IMAC separaci fosfopeptidu.

4. ZÁVĚR

Pro vypracování metody separace a následné identifikace fosfopeptidů bylo použito modelové bílkoviny prasečího pepsinu A. Ten ve své molekule obsahuje jednu fosfátovou skupinu. Pro přípravu směsi peptidů prasečího pepsinu A byl použit jako štěpicí proteináza α -chymotrypsin. Byly nalezeny optimální podmínky pro štěpení studovaného proteinu a pro separaci peptidů ze vznikající směsi pomocí RP-HPLC. Pozornost byla věnována separaci fosfopeptidů.

Podrobnější analýzou vznikajících peptidových štěpů byly po štěpení pepsinu A α -chymotrypsinem v peptidové směsi nalezeny vedle peptidů pepsinu, také peptidové štěpy odpovídající chymotrypsinu, vznikajících jeho autolytickou aktivitou.

Chymotrypsin byl imobilizován pomocí svých volných aminoskupin na magnetické agarózové částice, aktivované pomocí $-CHO$ skupiny. Enzymová aktivita imobilizované proteinázy byla porovnána s aktivitou volné formy α -chymotrypsinu při použití nízko-molekulárního substrátu.

Imobilizovaný α -chymotrypsin byl použit pro přípravu peptidové směsi prasečího pepsinu A a výsledky byly porovnány s výsledky získanými volným enzymem. Použitím imobilizované proteinázy se podstatně snížil výskyt autolytických štěpů ve výsledné směsi peptidů a zvýšila se reprodukovatelnost výsledků.

Byla vypracována metoda pro separaci a identifikaci fosfopeptidu. Jako nejúčinnější byl nalezen postup zahrnující separaci směsi peptidů pomocí RP-HPLC, po které následovala separace části peptidů pomocí IMAC s imobilizovanými Fe(III) ionty a analýza pomocí MALDI-TOF MS. Tímto způsobem byl identifikován peptid s relativní molekulovou hmotností 41236,110 spořadím aminokyselin E-A-T-S-Q-E-L-S-I-T-Y, kde první uvedený serin obsahuje fosfátovou skupinu.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Tomasová A.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha 1997.
2. Fusek M.; Větvička V.: *Aspartic proteinases: Physiology and pathology*, CRC Press, Huston (1995).
3. Vaňková H.: *Dizertační práce*, Univerzita Karlova, Praha 2000.
4. Hynek R.: *Dizertační práce*, Vysoká škola chemicko technologická 1996.
5. Morávek L.; Kostka V.: *FEBS LETT.* 43, 207 (1974).
6. Jensen A. L.; Foltmann B.: *Scand. J. Clin. Lab. Investigation* 56, 69 (1996).
7. Hynek R.; Kašička V.; Kučerová Z.; Káš J.: *J. Chromatogr. B.* 688, 213 (1997).
8. Majerčáková P.; Kučerová Z.: *Chem. Listy* 94, 578 (2000).
9. Štosová T.; Havliš J.; Lenobel R.; Šebela M.: *Chem. Listy* 99, 896 (2005).
10. Meloun B.; Kluh I.; Kostka V.; Morávek L.; Prusík Z.; Vaněček J.; Keil B.; Šorm F.: *Biochim. Biophys. Acta* 130, 543 (1966).
11. Sigler P. B.; Blow D. M.; Matthews B. W.; Henderson R.: *J. Mol. Biol.* 35, 143 (1968).
12. Goldstein L.: *Methods in Enzymology* 19, (1970).
13. Nagel W.; Willing F.; Petke W.; Schmidt F. H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 340, 1 (1965).
14. Mateo C.; Palomo J. M.; Fernandez-Lorete G.; Guisan J. M.; Fernandez-Lafuente R.: *Enzyme Microb. Tech.* 40, 1451 (2007).
15. Turková J.; Vohník S.; Helusová S.; Benes M.; Tichá M.: *J. Chromatogr.* 597, 19 (1992).
16. Means G. E.: *J. Protein Chemistry* 3:1, (1984).
17. Solá R. J.; Griebenow K.: *FEBS J.* 273, 5303 (2006).
18. Solá R. J.; Al-Azzam W.; Griebenow K.: *Biotechnol Bioeng.* 94:6, 1072 (2006).
19. Solá R. J.; Griebenow K.: *FEBS Lett.* 580, 1685 (2006).
20. Hong J.; Xu D.; Gong P.; Sun H.; Li D.; Yao S.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 45, 84 (2007).
21. Hong J.; Xu D.; Gong P.; Yu J.; Ma H.; Yao S.: *Microporous and Mesoporous*

Materials 109, 470 (2008).

22. Hynek R.; Kašička V.; Kučerová Z.; Káš J.: J. Chromatogr. B. 681, 37 (1996).

23. Li Y.; Liu Y.; Tang J.; Lin H.; Yao N.; Shen X.; Deng Ch.; Yang P.; Zhang X.: J.Chromatogr. A 1172, 57 (2007).

24. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2005, s. 136-170.

25. Poole C. F.; Poole S. K.: *Chromatography Today*, ELSEVIER-Amsterdam-Oxford —New York-Tokyo 1991, p. 394-405.

26. Qian W.; Jacobs J. M.; Liu T.; Camp II D. G.; Smith R. D.: Mol. Cell. Proteomics 5:10, 1727 (2006).

27. Krabbe J. G.; Gao F.; Li J.; Ahlskog J. E.; Lingeman H.; Niessen W. M. A.; Irth H.: J. Chromatogr. A 1130, 287 (2006).

28. Chaga G. S.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 313 (2001).

29. Pearson R. G.: *Hard and Soft Acids and Bases*, Hutchington & Ross, Stroudsburg 1973, p. 53-59, 67-85.

30. Scopes R. K.: *Protein Purification – Principles and Practice*, Springer-Verland New York 1994, p. 180-183.

31. Gooding K. M.; Regnier F. E.: *HPLC of Biological Macromolecules*, 2nd edition, Marcel Dekker, New York 2002.

32. Kučerová Z.: Chem. listy 85, 526 (1991).

33. Holmes L. D., Schiller M. R.: J. Liq. Chrom. and Rel. Technol. 20:1, 123 (1997).

34. Toomik R.; Toomik P.: Prep. Biochem. 22, 183 (1992).

35. Chung B. H.; Arnold F. H.: Biotech. Lett. 13, 615 (1991).

36. Kučerová Z.; Majerčáková P.: J. Biochem. Biophys. Methods 49, 523 (2001).

37. Muszynska G.; Dobrowolska G.; Medin A.; Ekman P.; Porath J. O.: J. Chromatogr. 604, 19 (1992).

38. Belew M.; Porath J.: J. Chromatogr. 516, 333 (1990).

39. Shihua L., Chhabil D.:Anal. Biochem. 270, 9 (1999).

40. Smith P. K.; Krohn R. I.; Hermanson G. T.; Mallia A. K.; Gartner F. H.; Provonzano M. D.; Fujimoto E. K.; Goeke N. M.; Olson B. J.; Klenk D. C.:Anal. Biochem. 150, 76 (1985).

41. Walker J. M.: *The Protein Protocols Handbook*, 2nd edition, Totowa, NJ, Humana Press (2002).

42. Liu Z.; Schey K.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* *16*, 482 (2005).
43. Yoo Y. S.; Han Y. S.; Suh M. J.; Park J.: *J. Chromatogr. A* *763*, 285 (1997).
44. Wattenberg A.; Organ J.; Sneider K.; Tyldesley R.; Bordoli R.; Bateman R. H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* *13*, 772 (2002).
45. Hjerrild M.; gammeltoft S.: *FEBS Lett.* *580*, 4764 (2006).
46. Ahn Y. H.; Ji E. S.; Kwon K. H.; Lee J. Y.; Cho K.; Kim J. Y.; Kang H. J.; Kim H. G.; Yoo J. S.: *Anal. Biochem.* *370*, 77 (2007).
47. Han L.; Shan Y.; Chen D.; Yu X.; Yang D.; Tu B.; Zhao D.: *J. Colloid Interf. Sci.* *318*, 315 (2008).
48. Liao P. Ch.; Leykam J.; Andrews P. C.; Gage D. A.; Allison J.: *Anal. Biochem.* *219*, 9 (1994)
49. Pinkse M. W.; Uitto P. M.; Hilhorst M. J.; Ooms B.; Heck A. J.: *Anal. Chem.* *76*, 3935 (2004)
50. Stone K. L.; LoPresti M. B.; Crawford J. M.; DeAngelis R.; Williams K.: *A Practical Guide To Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Academic Press, New York (1987).
51. Vankova H.; Rp, Pospisilova M.; Ticha M.; Turkova J.: *Biotechn. Techn.* *8*, 375 (1994).
52. Rice R. H.: *BBA* *492*, 316 (1977)
53. Sebela M.; Stosová T.; Havlis J.; Wielsch N.; Thomas H.; Zdráhal Z.; Shevchenko A.: *Proteomics.* *6:10*, 2959 (2006).