

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**SEPARACE ŽALUDEČNÍCH PROTEINÁZ AFINITNÍ
CHROMATOGRAFIÍ NA AGAROSE S IMOBILIZOVANÝM
PEPSTATINEM A**

Bakalářská práce

studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

Jana Vávrová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Věry Pacákové, CSc. a konzultantky Ing. Zdenky 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 7. 6. 2007

.....
podpis

OBSAH

Seznam použitých zkratek.....	6
Úvod.....	7
1. Teoretická část.....	8
1.1 Aspartátové proteinázy.....	8
1.1.1 Aspartátové proteinázy v lidském těle.....	8
1.1.2 Patologické změny aspartátových proteináz v lidském organismu.....	9
1.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti pepsinu a pepsinogenu.....	10
1.1.4 Struktura pepsinu A a pepsinogenu A.....	10
1.2 Pepstatin A.....	11
1.3 Afinity chromatografie.....	12
1.3.1 Úvod.....	12
1.3.2 Nosiče používané pro afinity chromatografii.....	12
1.3.3 Princip afinity chromatografie.....	13
1.3.4 Adsorpce analyzovaných látek.....	14
1.3.5 Eluce zadržovaných látek z kolony.....	14
1.3.5.1 Metody eluce.....	14
1.3.5.2 Způsoby eluce.....	15
1.3.6 Účinnost elučních postupů.....	15
1.3.7 Vliv průtokové rychlosti.....	16
1.3.8 Kapacita kolony.....	17
1.3.9 Afinity chromatografie na principu enzym-inhibitor/substrát.....	17
1.4 Analytické metody.....	18
1.4.1 Stanovení koncentrace proteinů BCA metodou.....	18
1.4.2 Stanovení aktivity podle Ansona a Mirského.....	18
2. Experimentální část.....	19

2.1 Chemikálie.....	19
2.2 Přístroje	19
2.3 Afinitní chromatografie na agarose s imobilizovaným pepstatinem A	20
2.4 FPLC pepsinu	20
2.4.1 Optimalizace adsorpčních podmínek	20
2.4.1.1 Vliv pH	20
2.4.1.2 Vliv iontové síly	20
2.4.2 Optimalizace elučních podmínek	21
2.4.2.1 Vliv pH	21
2.4.2.2 Vliv NaCl.....	21
2.4.2.3 Vliv KSCN a pH.....	21
2.4.2.4 Eluce prasečího pepsinu A pepstatinem A	22
2.4.3 Optimalizace průtokové rychlosti.....	22
2.4.4 Opakovatelnost analýz.....	22
2.4.5 Kapacita stacionární fáze.....	22
2.5 FPLC pepsinu inhibovaného pepstatinem A	23
2.6 FPLC prasečího pepsinogenu A	23
2.7 Analytické metody	23
2.7.1 Stanovení koncentrace proteinů BCA metodou	23
2.7.2 Stanovení aktivity podle Ansona a Mirského.....	23
3.1 Afinitní chromatografie	25
3.2 FPLC pepsinu A	25
3.2.1 Optimalizace adsorpčních podmínek	25
3.2.1.1 Vliv pH	25
3.2.1.2 Vliv iontové síly	25
3.2.2 Optimalizace elučních podmínek	26
3.2.2.1 Vliv pH	26
3.2.2.3 Vliv NaCl.....	27

3.2.2.4 Vliv KSCN a pH.....	28
3.2.2.5 Eluce prasečího pepsinu A pepstatinem A	29
3.2.3 Optimalizace průtokové rychlosti.....	29
3.2.4 Opakovatelnost analýz.....	30
3.2.5 Kapacita stacionární fáze.....	30
3.3 FPLC pepsinu inhibovaného pepstatinem A	30
3.4 FPLC prasečího pepsinogenu A.....	32
4. Závěr	34
Literatura	35

Seznam použitých zkratek

BCA	kyselina bicinchoninová
BOC	N-terc-butyloxy-karbonyl
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (střednětlaká kapalinová chromatografie)
PG	pepsinogen
PG A	pepsinogen A
PG C	pepsinogen C
pepsin	prasečí pepsin A
rpm	(rotations per minute) otáčky za minutu
RSD	relative standard deviation (relativní směrodatná odchylka)

Úvod

Lidská žaludeční šťáva obsahuje dva hlavní trávicí enzymy (pepsin A a pepsin C), které se liší svými biologickými a imunologickými vlastnostmi. Pepsiny jsou produkovány v inaktivní formě jako pepsinogeny (PG A a PG C). Jejich hladiny v krevním séru odrážejí morfologický a funkční stav žaludeční sliznice. Již při raných stádiích rakoviny žaludku se mění zastoupení a hladiny PG. Stanovení těchto hladin proto může být užitečným a včasným markerem rakoviny žaludku. Z diagnostického hlediska je zajímavý především poměr PG A/PG C. U nemocných s rakovinou žaludku byl oproti zdravým jedincům zjištěn v krevním séru nízký poměr PG A/PG C.

Afinitní chromatografie se jeví jako jedna z vhodných metod pro separaci a detekci jednotlivých PG a pepsinů. Tato metoda je založena na biospecifické interakci mezi ligandem imobilizovaným na stacionární fázi a studovanou komplementární látkou. Interakce probíhající v adsorpčním procesu jsou identické nebo velmi podobné interakcím probíhajícím při biologickém působení makromolekuly. Přírodním inhibítorem aspartátových proteináz pepsinového typu je pepstatin A. Proto ho lze využít jako ligand při stanovení pepsinů.

Téma bakalářské práce bylo součástí grantů MSMT: MSM 0021620806 a LC 06044, které se z části zabývají studiem aspartátových proteináz. Konkrétním cílem bakalářské práce byla optimalizace adsorpčních a elučních podmínek pepsinu na afinitní stacionární fázi s imobilizovaným pepstatinem A. Jako modelová proteináza byl použit prasečí pepsin A.

1. Teoretická část

1.1 Aspartátové proteinázy^{1,2,3}

Aspartátové proteinázy se řadí do skupiny proteolytických enzymů, které jsou široce rozšířeny v organizmech. Patří do třídy hydroláz a podtřídy C-N hydroláz, protože katalyzují štěpení peptidové vazby. pH optimum štěpení těmito enzymy leží v kyselé oblasti. Ve svém aktivním centru obsahují dva zbytky kyseliny asparagové, a proto je komise IUB nazvala aspartátové proteinázy³. Všechny aspartátové proteinázy jsou syntetizovány v inaktivní formě jako proenzymy, ze kterých vznikají odštěpením aktivačního peptidu v kyselém prostředí aktivní enzymy. Základní katalytický mechanismus je pro všechny aspartátové proteinázy stejný. Aby mohl být enzym klasifikován jako aspartátová proteináza pepsinového typu, musí být inhibován přirozeným inhibítorem pepstatinem A a syntetickými inhibitory (diazocetylnorleucin methylester, 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxy) propan).

1.1.1 Aspartátové proteinázy v lidském těle^{1,2,3}

Lidská žaludeční šťáva obsahuje trávicí enzymy-pepsiny. Podle biologických a imunologických vlastností se rozlišují dva hlavní typy: pepsin A a pepsin C.

PEPSIN A (EC 3.4.23.1)

Je produkován v inaktivní formě jako pepsinogen A (PG A) hlavními a hlenovými buňkami sliznice těla žaludku dospělých obratlovců. Z žaludeční sliznice se pepsinogen A uvolňuje do žaludku a v malém množství také do krevního séra a moči. V kyselé žaludeční šťávě z něho vzniká aktivní forma – pepsin A, který přednostně štěpí peptidové vazby mezi aromatickými aminokyselinami⁴. Vykazuje vysokou afinitu vůči syntetickému substrátu N-acetyl-L-fenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosinu⁵.

PEPSIN C (EC 3.4.23.3)

Jeho triviální název je gastriksin. Je produkován v inaktivní formě jako pepsinogen C (PG C) po celé žaludeční sliznici a na rozdíl od pepsinu A je produkován také v Brunnerových žlázách v proximálním duodenu a v pylorických žlázách v antru.

Malé množství je sekretováno v epitelových buňkách prostaty a semenných váčcích, ze kterých se PG C dostává do semenného sekretu¹. PG C se vyskytuje v krevním séru, ale narozdíl od PG A není přítomen v moči. Pepsin C vykazuje velmi nízkou afinitu k syntetickému substrátu N-acetyl-L-fenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosinu¹⁰.

1.1.2 Patologické změny aspartátových proteináz v lidském organismu

Rakovina žaludku je v současné době jedna z nejčastějších typů rakoviny a je častou příčinou úmrtí na celém světě. Nejvyšší incidence rakoviny žaludku je v Japonsku, Costa Rice, Chile a nejnižší je naopak ve Spojených státech amerických¹¹. Bylo zjištěno, že hladiny PG v krevním séru odrážejí morfologický a funkční stav žaludeční sliznice¹¹. Je pozorována souvislost mezi hladinami PG v krevním séru a některými onemocněními např. rakovina žaludku^{3,11,12}, gastritida^{1,11,12}, vředy¹¹ a rakovina prsu¹³. Hladiny sérových PG se liší u jednotlivých osob, států a etnických skupin^{3,11}. Hodnoty těchto hladin souvisejí např. s věkem, pohlavím, národnostním původem a životním stylem jedince^{3,11}.

Velká pozornost byla věnována zjišťování hladiny a vzájemného poměru PG A a PG C v krevním séru. Bylo zjištěno, že poměr PG A a PG C může sloužit jako významný diagnostický marker u rakoviny žaludku^{3,11,12}. Oishi provedl čtrnáctiletou studii japonského obyvatelstva, ve které se zabýval souvislostí mezi vznikem rakoviny žaludku a poměrem pepsinogenů v krevním séru. Zjistil, že při rakovině žaludku je velmi nízká hladina sérového PG A, zatímco hladina PG C se významně nemění. Poměr PG A/PG C je 5,1 u zdravých jedinců, zatímco u nemocných s rakovinou žaludku tento poměr výrazně klesá na hodnotu 1,3. Výsledky studie potvrdily, že PG test je vhodný pro detekci raných stádií rakoviny žaludku¹².

Byl zkoumán vztah PG C vzhledem k výskytu rakoviny prsu. Zatímco zdravá lidská prsní tkáň PG C neprodukuje, u patologicky modifikované prsní tkáně k jeho produkci dochází. Studie dokazuje, že PG C může být důležitý při vzniku benigního a maligního prsního onemocnění¹³.

1.1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti pepsinu a pepsinogenu

Pepsiny mají nižší relativní molekulovou hmotnost než pepsinogeny. Porovnání relativních molekulových hmotností lidského a prasečího pepsinu A a PG A je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1. Relativní molekulové hmotnosti lidského a prasečího pepsinu A a PG A

	člověk	prase
pepsin A	34 000 (cit. ⁶)	34 500 (cit. ⁷)
PG A	43 500 (cit. ¹)	42 000 (cit. ³)

PG A má izoelektrický bod při pH 3,7. Konverzí PG A na pepsin A dochází k výraznému poklesu izoelektrického bodu pod hodnotu pH 1, což souvisí se ztrátou devíti lisylových, dvou hystidylových a dvou arginylových zbytků, které jsou součástí aktivačního řetězce³.

Všechny aspartátové proteinázy se vyznačují neobvykle nízkým optimálním pH proteolytické aktivity, které je způsobeno přítomností dvou volných karboxylových skupin asparagové kyseliny v aktivním katalytickém centru. Proteolytická aktivita pepsinu A je závislá na pH. Pepsin A je v oblasti pH 1,0 až 6,0 stabilní⁸ a vykazuje optimální pH proteolytické aktivity při pH 2,0 (cit. ⁹). Zvýšením pH dochází k rychlé ztrátě aktivity. Při pH 5,0 až 6,0 již aktivitu nevykazuje, ale lze ji obnovit úpravou pH na 2,0. Při pH vyšším než 7,0 nastává denaturace pepsinu A.

Pepsin je syntetizován v inaktivní formě jako příslušný PG (zymogen). Při pH nižším než 5,0 dochází k odštěpení aktivačního peptidu ze zymogenu a ke vzniku aktivního enzymu. PG je stabilní v oblasti pH od 5,0 do 8,5 (cit. ¹⁴). K jeho denaturaci dochází při pH vyšším než 8,5.

Pepsin A je stabilní do teploty 45°C. Při vyšších teplotách dochází k jeho postupné denaturaci. Při teplotě 65°C je pepsin A již zcela denaturován¹⁵.

1.1.4 Struktura pepsinu A a pepsinogenu A

Kompletní aminokyselinová sekvence prasečího pepsinu A byla zveřejněna roku 1974 a potvrzena následujícího roku^{16,17,18}. Proti původně zveřejněné struktuře byly opraveny dva aminokyselinové zbytky a délka řetězce byla stanovena na 327 aminokyselinových zbytků místo původních 326. Prasečí pepsin A obsahuje v polypeptidovém řetězci pouze jeden zbytek lysin (v pozici 320) a dva zbytky argininu

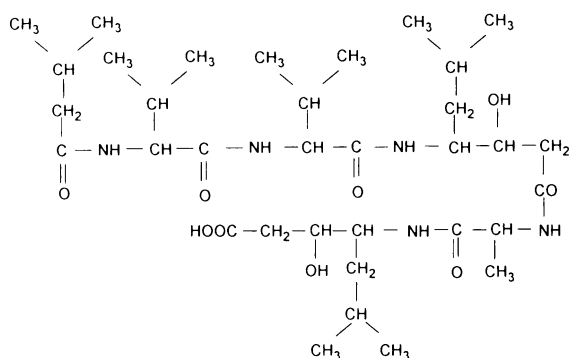
(v pozicích 308, 316) (cit. ^{16,17,18,19}). Celý řetězec je spojen třemi intramolekulárními disulfidickými můstky mezi zbytky 45 a 50, 206 a 210, 250 a 238 (cit. ^{17,19}) a obsahuje jednu fosfátovou skupinu na serinovém zbytku v pozici 68 (cit. ²⁰).

Primární struktura PG A je tvořena jediným polypeptidovým řetězcem o délce zhruba 370 aminokyselinových zbytků, který je spojen třemi intramolekulárními disulfidickými můstky. Z PG A vzniká pepsin A odštěpením bazického aktivačního peptidu z N-konce jeho polypeptidového řetězce³.

Kompletní aminokyselinová sekvence lidského PG A byla publikována roku 1983. Lidský PG A se skládá z 373 a pepsin A z 327 aminokyselinových zbytků²¹. Ze srovnání primárních struktur vyplývá, že všechny aspartátové proteinázy mají podobnou trojrozměrnou strukturu. Trojrozměrná struktura je známa pro prasečí a lidský PG A a lidský PG C. Jejich celkové struktury vykazují velkou podobnost. Lidské a prasečí PG A jsou si podobnější než lidské PG A a C (cit. ²²).

1.2 Pepstatin A (cit. ^{2,23})

Pepstatin A je přirozeným a nejúčinnějším inhibitorem aspartátových proteináz pepsinového typu. Byl izolován z kultur rodu *Streptomyces*. Pepstatin A je používán při studiích enzymatických mechanismů, enzymatických biologických funkcí a také je používán v afinitní chromatografii. Vykazuje největší inhibitorovou aktivitu k pepsinu. Pepstatin A a jeho fragmenty jsou kompetitivní inhibitory aspartátových proteináz, které tvoří velký počet nekovalentních interakcí s aktivním místem aspartátových proteáz, čímž zamezují přístupu substrátu do aktivního místa enzymu. Na obrázku 1.1 je uvedena struktura pepstatinu A



Obr. 1.1 Struktura pepstatinu A (cit. ²): Isovaleryl-Val-Val-AHMHA-Ala-AHMHA

AHMHA=(3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methyl-heptanová kyselina

1.3 Afinitní chromatografie

1.3.1 Úvod²⁴

Hlavní pokrok v rozvoji afinitní chromatografie nastal v šedesátých letech 20. století a to díky několika publikacím. V roce 1967 Porath se svou skupinou publikoval postup specifické imobilizace aminů na inertních polymerech. Cautrecasas, Wilcheck a Anfinsen se zabývali použitím specifických adsorbentů při čištění enzymů a v roce 1968 zavedli termín afinitní chromatografie.

Afinitní chromatografie je separační metoda založená na schopnosti biologicky aktivních látek (tzv. receptorů) se specificky, nekovalentně a reverzibilně vázat na komplementární sloučeniny (tzv. ligandy), které jsou imobilizovány na chromatografickém nosiči. Na povrch tuhého nosiče je pevně vázána kovalentní vazbou látka vysoce selektivní pro daný protein. Na kolonu obsahující stacionární fázi s daným ligandem se nadávkuje vzorek. Látky nevykazující afinitu k ligandu projdou bez zadržení a eluují se v mrtvém objemu. Látky s afinitou k ligandu jsou zadrženy. Navázané analyty se uvolní změnou rozpouštědla jako takového, změnou koncentrace solí, změnou pH, změnou teploty či disociačními činidly. Afinitní chromatografie se využívá zejména při izolaci a čištění enzymů, protilátek, proteinů, receptorů, k separaci buněk a virů, nukleových kyselin, denaturovaných nebo chemicky modifikovaných a syntetických proteinů od nativních. Používá se také např. k zakoncentrování zředěných roztoků proteinů a ke stanovení disociačních a jiných rovnovážných konstant.

1.3.2 Nosiče používané pro afinitní chromatografii²⁶

Příprava stacionární fáze se obvykle provádí chemickou vazbou afinitního ligandu na tuhý nosič, který obsahuje funkční skupiny pro vazbu na ligand. Významnou charakteristikou nosiče je velikost částic, distribuce velikosti pórů, pórovitá struktura umožňující pohyb makromolekul, přístupnost povrchu a dostatečné množství funkčních skupin pro ligand. Nosič musí být teplotně, chemicky a mechanicky stabilní²⁷ a musí co nejméně interagovat s analytem (minimální nespecifické interakce)²⁴.

Pro afinitní chromatografii jsou velmi používané agarosové nosiče a jejich deriváty, které vykazují velmi nízké nespecifické sorpce. Komerčně dostupný zástupce

této skupiny je Sepharosa, která obsahuje dvě polysacharidové jednotky. Je stabilní v rozmezí pH 4-9 a snese teploty až do 40°C. Dalším komerčně dostupným nosičem je silikagel, jehož povrch musí být před navázáním afinitního ligandu modifikován. Silikagel je nestabilní v kyselé (pH < 2) i alkalické (pH > 8) oblasti. Při pH > 4 lze již pozorovat nescifické interakce²⁸. Jeho výhodou je velký povrch, vysoká účinnost a mechanická odolnost ve srovnání s agarosovými nosiči. Jako nosiče lze také použít různé oxidy kovů, nejčastěji Al₂O₃, TiO₂ a ZrO₂. TiO₂ a ZrO₂ mají výborné mechanické vlastnosti a chemickou stabilitu a snáší i extrémní pH²⁸ na rozdíl od Al₂O₃, který je použitelný jen v oblasti pH 3-12. Mezi další používané nosiče patří hydroxyalkylmethakrylátové a polyakrylamidové gely, dextranové gely a celulósa.

1.3.3 Princip afinitní chromatografie

Mezi izolovaným proteinem a afinitním ligandem vázaném na nerozpustném nosiči dochází ke vzniku specifického aktivního komplexu. Při tvorbě komplexu dochází ke zpomalení, respektive úplnému zadržení látek procházejících kolonou. Za předpokladu, že má jen jedna ze skupiny látek afinitu k ligandu, lze tvorbu komplexu popsat následující rovnicí:



E-analyzovaná látka, L-afinitní ligand, EL-specifický komplex protein-ligand

Disociační konstanta komplexu protein-ligand je dána vztahem:

$$K = \frac{[E][L]}{[EL]} \quad (1.2.)$$

Disociační konstanta musí být dostatečně velká, aby došlo k tvorbě komplexu a tím k zadržení látek v koloně a zároveň nesmí být příliš vysoká, aby znemožnila eluci navázané látky z kolony²⁵.

Na tvorbě komplexu biologicky aktivní studované látky a vazebného místa ligandu se mohou podílet interakce několika typů²⁵ např. elektrostatické interakce, Londonovy disperzní síly, hydrofobní interakce, vodíkové interakce. Nejčastěji využívanými interakcemi v afinitní chromatografii jsou enzym-inhibitor, enzym-substráty, enzym-kofaktory, antigen-protilátka, hormon-receptor a další.

1.3.4 Adsorpce analyzovaných látek

Optimální podmínky pro adsorpci jsou závislé nejen na charakteru analyzované látky, ale i na jeho interakci s imobilizovaným ligandem. Mobilní fáze používaná k ekvilibraci afinitního nosiče, její iontová síla a pH mají odpovídat optimálním podmínkám interakce analyzované látky s ligandem.

Po adsorpci studované látky na nosič musí být kolona promyta ekvilibrační mobilní fází o několikanásobném objemu kolony, aby došlo k vymytí neadsorbovaných látek.

1.3.5 Eluce zadržovaných látek z kolony

Specificky adsorbovaná látka může být vymyta vhodným elučním činidlem. Podmínky uvolňování analyzovaných látek z kolony však nelze obecně definovat, protože jsou závislé na specifických faktorech pro danou separaci. Pokud má studovaná látka ke zvolenému ligandu nízkou afinitu, je v koloně za daných podmínek zadržena reverzibilně a k její eluci se nemusí měnit složení mobilní fáze. Tímto způsobem se studovaná látka získá ve zředěné formě, a také může být za takových podmínek nestálá. Naopak, vyznačuje-li se analyzovaná látka vysokou afinitou k ligandu, musí se změnit složení mobilní fáze, aby došlo k eluci.

1.3.5.1 Metody eluce²⁴

1) Nespecifické metody eluce

Při tomto způsobu látka eluuje změnou některé z vlastností složení mobilní fáze, např. změnou pH, iontové síly, permitivity prostředí nebo teploty. U většiny analýz stačí pro eluci změna jedné vlastnosti. Při analýze je nutno dodržet podmínky, při kterých nedochází k částečné nebo úplné denaturaci proteinu.

2) Specifické metody eluce

Tato eluce bývá ke studovaným látkám šetrnější. Při tomto způsobu eluce se do mobilní fáze přidává specifická látka, která vytvoří s afinitním ligandem stabilnější komplex než je původní komplex analytu. Tím dojde k rozrušení komplexu afinitního ligandu se zkoumanou látkou a k její následné eluci. Protože

je přidána specifická látka jednoduché chemické struktury, můžeme ji většinou z kolony vymýt ekvilibrační mobilní fází po eluci analyzované látky.

1.3.5.2 Způsoby eluce²⁴

1) Izokratický způsob eluce

Tento způsob eluce je vhodný pro biologicky aktivní látky s nízkou afinitou k použitému ligandu a s jednoduchou chemickou strukturou. Látky se od sebe příliš neliší v afinitě ke stacionární fázi, takže jejich zóny eluují v nepříliš dlouhých intervalech. Jinak by se na úplnou eluci spotřebovalo příliš mnoho mobilní fáze a poslední složky by vytvářely příliš široké zóny.

2) Gradientový způsob eluce

Při tomto způsobu měníme během analýzy složení mobilní fáze, plynule roste eluční síla použité mobilní fáze. Tím vzniká koncentrační gradient a je dosaženo zmírnění rozmývání zón, neboť zadní část chromatografické zóny je ve styku se silnějším elučním roztokem než její přední část. V použití gradientové eluce je důležité zvolit vhodnou strmost gradientu. U pozvolného gradientu je dosaženo lepšího rozlišení, ale s větší šířkou elučních píků. Naopak při strmém gradientu je dosaženo ostřejších píků, ale horšího rozlišení.

3) Stupňovitý způsob eluce

Kolona je postupně promývána několika elučními činidly, z nichž každé následující má vždy vyšší eluční sílu. Při eluci mohou vznikat nesymetrické píky eluovaných látek a sestupná část křivky může být protáhlá (tzv. chvostování), v tomto případě je pak vhodnější použít gradientový způsob eluce.

1.3.6 Účinnost elučních postupů²⁴

Účinnost afinitní chromatografie je často omezována rozšiřováním píku, které je způsobeno neúplným ustavením difúzní rovnováhy. Píky jsou na eluční křivce tím širší, čím více se liší systém od ideálního stavu. Mírou tohoto jevu je výškový ekvivalent teoretického patra, který je ovlivňován třemi faktory:

1) Rychlost ustavování difúzní rovnováhy

Rovnováhy se dosahuje rychleji u nosičů s malými částicemi a při použití malé průtokové rychlosti.

2) Podélná difúze

Při velmi malé průtokové rychlosti se zvětšuje šířku píků, zejména u proteinů s malou relativní molekulovou hmotností.

3) Geometrie afinitní kolony

U afinitních kolon, které jsou nerovnoměrně naplněné a které mají velký mrtvý objem, klesá výškový ekvivalent teoretického patra.

1.3.7 Vliv průtokové rychlosti²⁴

V některých případech dochází k ustavení adsorpční rovnováhy mezi specifickým ligandem a analyzovanou látkou velmi pomalu. Je to způsobeno relativně malým počtem srážek velkých molekul, které jsou potřeba ke specifické adsorpci, pro které je nutné těsné spojení aktivního místa proteinu s afinitním ligandem. Difúzní jevy jsou důležitým faktorem v celkové kinetice reakce.

Typy difúzních jevů:

1) Podélná difúze

Je podmíněna koncentračním gradientem. Může probíhat radiálně i axiálně. Za podmínek normální afinitní chromatografie nemá tato difúze pravděpodobně velký význam, ale při malém průtoku u slabě interagujících systémů může být důležitým faktorem.

2) Vířivá difúze

Difúze má významný vliv při velké průtokové rychlosti. Je způsobena nerovnoměrnostmi toku, které způsobují částice gelu ve sloupci. Při pomalém ustanovování rovnováhy má analyzovaná látka v rychlém proudu menší možnost interakce s imobilizovaným ligandem než látka v pomalém proudu.

3) Omezená difúze

Při této difúzi dochází k omezení molekulární difúze v pórech gelové matrice, což může zabránit dobrému přístupu makromolekuly k ligandu. Vliv této difúze se sníží použitím velmi pórovitých nosičů.

1.3.8 Kapacita kolony²⁴

Kapacita stacionární fáze se zjišťuje za optimálních adsorpčních a elučních podmínek pro danou látku. Účinnost afinitní stacionární fáze závisí na její schopnosti vázat komplementární makromolekuly a na dostatečné a účinné eluci studovaného proteinu. Kapacitu stacionární fáze určuje koncentrace imobilizovaného ligandu, který je volně dostupný pro interakci s komplementární látkou. Maximální vazebná kapacita stacionární fáze pro enzym je úměrná koncentraci imobilizovaného ligandu. Kapacita adsorbentu značně klesá při vysokých průtokových rychlostech, kdy není dosaženo rovnováhy.

1.3.9 Afinitní chromatografie na principu enzym-inhibitor/substrát

Afinitní chromatografie na principu enzym-inhibitor využívá schopnosti biologicky aktivních látek (enzym) vytvářet komplex s inhibitorem, který je imobilizován na stacionární fázi. Inhibitory se dělí podle svého původu do dvou skupin, na přirozené a syntetické. Mezi přirozené inhibitory aspartátových proteináz patří pepstatin A, který inhibuje všechny aspartátové proteinázy pepsinového typu².

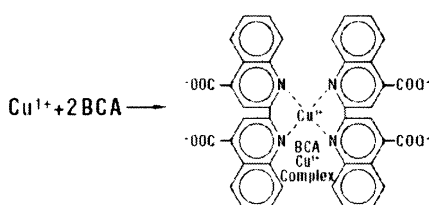
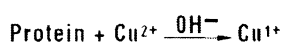
Pro efektivní izolaci a separaci pepsinů z různých zdrojů byla použita afinitní chromatografie využívající např. protilátky²⁹, deriváty substrátu^{5,30,31,33} nebo inhibitory pepsinu^{23,32} jako ligandy. Pro separaci pepsinů A a C z žaludeční šťávy byla použita např. stacionární fáze Sepharosa 4B s imobilizovaným inhibitorem Val-D-Leu-Pro-Phe-Phe-Val-D-Leu (cit. ³²).

V Kayově studii, zabývající se interakcí prasečího pepsinogenu s pepstatinem A imobilizovaným na aminohexyl-Sepharose, byl popsán vliv pH na eluci pepsinogenu a pepsinu³⁴. Dále byla popsána izolace PG C z prsní tkáně na stacionární fázi agarosy s imobilizovaným pepstatinem A (cit. ¹³).

1.4 Analytické metody

1.4.1 Stanovení koncentrace proteinů BCA metodou³⁵

Metoda je založena na reakci peptidových vazeb proteinů s Cu^{2+} ionty. Za alkalických podmínek dochází ke konverzi Cu^{2+} na Cu^+ , které jsou poté detegovány reakcí s BCA za vzniku purpurového zbarvení. Intenzita tohoto zbarvení je závislá na koncentraci proteinů.



Obr. 1.2 Princip metody BCA³⁷

1.4.2 Stanovení aktivity podle Ansona a Mirského³⁶

Metoda je založena na proteolytickém štěpení hemoglobinu pepsinem, při kterém dochází k uvolňování peptidů. Peptidy jsou následně stanoveny BCA metodou. Množství uvolněných peptidů v přesně stanoveném čase je přímo úměrné množství pepsinu ve vzorku.

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie

prasečí pepsin A – Sigma-Aldrich (ČR)
prasečí pepsinogen – Sigma-Aldrich (ČR)
pepstatin A – Sigma-Aldrich (ČR)
BCA Protein Assay reagent – Pierce (USA)
kyselina octová p.a. – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
dihydrogenfosforečnan sodný p.a. – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
hydroxid sodný p.a. – Kulich, Hradec Králové (ČR)
chlorid sodný p.a. – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
kyselina chlorovodíková p.a. – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
tris-(hydroxymethyl)-aminomethan čistý – Loba Feinchemie (Rakousko)
thiokyanatan draselný – Lachema (ČR)
methanol G CHROMASOLV for gradient elution – Sigma-Aldrich (ČR)
síran měďnatý p.a. – Lukeš, Uherský Brod (ČR)
destilovaná voda

2.2 Přístroje

Všechna měření byla prováděna na přístroji Biologic system (Bio-Rad, USA), který byl vybaven 1 mL dávkovací smyčkou, UV detektorem (280 nm) a sběračem frakcí Model 2110 Fraction Collector.

Byla používána kolona Bio-Scale MT 2 High-Resolution Column s vnitřním průměrem 7 mm, délkou 52 mm a o objemu 2 mL od firmy Bio-Rad (USA), která byla naplněna stacionární fází agarosou s imobilizovaným pepstatinem A.

Dále byly použity následující přístroje: analytické váhy XT 120 A (Precisa, Švýcarsko), váhy BL 510 (Sartorius, Německo), pH metr 3305 (Jenway, Velká Británie), ultrazvuk (Ultrasonic Compact Cleaner 1 L PS 01000 od Powersonic, Slovensko), Multiskan MS Version 3.0. (LABSYSTEMS, Finsko), centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo), vodní lázeň Julabo MV-4 (Julabo, Německo), AccuBlock (Labnet, USA).

2.3 Afinity chromatografie na agarose s imobilizovaným pepstatinem A

Protein byl rozpuštěn v ekvilibrační mobilní fázi a zfiltrován přes filtr s PTFE membránou o velikosti pórů 0,45 µm (Whatman, USA).

Před každou analýzou byla kolona promývána ekvilibrační mobilní fází do ustálení linie detektoru (20 mL). Poté byl nadávkován vzorek (1 mL) a kolona byla promývána ekvilibrační mobilní fází do vymytí všech neadsorbovaných látek. Adsorbovaný protein byl eluován příslušnou eluční mobilní fází.

Během analýz byly odebírány 0,5 mL frakce, ve kterých bylo stanovováno množství proteinů BCA metodou, případně jejich proteolytická aktivita metodou Ansona a Mirského.

2.4 FPLC pepsinu

2.4.1 Optimalizace adsorpčních podmínek

2.4.1.1 Vliv pH

vzorek: 1 mg pepsinu/mL 50 mM octanového pufru pH 3,5

ekvilibrační mobilní fáze:

a) 50 mM octanový pufr pH 3,5

b) 100 mM Tris-HCl pufr pH 7,2

eluční mobilní fáze: 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 1 M KSCN (izokratická eluce)

2.4.1.2 Vliv iontové síly

vzorek: 1 mg pepsinu/mL 50 mM octanového pufru pH 3,5 s přidavkem 1M NaCl

ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5 s přidavkem 1M NaCl

eluční mobilní fáze: 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 1 M KSCN (izokratická eluce)

2.4.2 Optimalizace elučních podmínek

vzorek: 1 mg pepsinu/mL 50 mM octanového pufru pH 3,5

ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5

Během analýz byly odebírány 0,5 mL frakce, ve kterých bylo stanovováno množství proteinů BCA metodou.

2.4.2.1 Vliv pH

eluční mobilní fáze:

- a) 100 mM Tris-HCl pH 8,5
- b) 200 mM fosforečnanový pufr pH 8,5
- c) 200 mM uhličitanový pufr pH 9,0
- d) 200 mM uhličitanový pufr pH 10,0
- e) 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7

2.4.2.2 Vliv NaCl

eluční mobilní fáze:

- a) 50 mM octanový pufr pH 3,5; 50 mM octanový pufr pH 3,5 s přídavkem 1M NaCl; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7
- b) 200 mM fosforečnanový pufr pH 8,5; 200 mM fosforečnanový pufr pH 8,5 s přídavkem 1M NaCl; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7
- c) 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídavkem 1 M NaCl; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídavkem 1M KSCN

2.4.2.3 Vliv KSCN a pH

eluční mobilní fáze:

- a) 50 mM octanový pufr pH 3,5 s přídavkem 3 M KSCN; 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 s přídavkem 3 M KSCN; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídavkem 3 M KSCN
- c) 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídavkem 1 M KSCN

d) 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 2 M KSCN

2.4.2.4 Eluce prasečího pepsinu A pepstatinem A

eluční mobilní fáze: roztok pepstatinu A; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 1M KSCN

Roztok pepstatinu A: 10 mg pepstatinu A rozpuštěno v 1mL kyseliny octové a v 9 mL methanolu a poté doplněno 50 mM octanovým pufrem pH 6,0 do 50 mL

2.4.3 Optimalizace průtokové rychlosti

vzorek: 1 mg pepsinu /mL 50 mM octanového pufru pH 3,5

ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5

eluční mobilní fáze: 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 1 M KSCN

průtoková rychlost:

a) 1 mL/min

b) 0,5mL/min

2.4.4 Opakovatelnost analýz

vzorek: 1 mg pepsinu/mL 50 mM octanového pufru pH 3,5

ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5

eluční mobilní fáze: 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 1 M KSCN

(izokratická eluce)

průtoková rychlost: 0,5mL/min

2.4.5 Kapacita stacionární fáze

vzorek: 2 mg pepsinu/mL 50 mM octanového pufru pH 3,5

ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5

eluční mobilní fáze: 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 1 M KSCN

(izokratická eluce)

průtoková rychlost: 0,5 mL/min

v odebíraných frakcích (0,5 mL) byla stanovována aktivita pepsinu metodou Ansona a Mirského

Po promytí kolony ekvilibrační mobilní fází byl na kolonu aplikován vzorek, dokud aktivita pepsinu v odebíraných frakcích nevykazovala konstantní hodnotu. Poté byla provedena eluce adsorbovaného pepsinu.

2.5 FPLC pepsinu inhibovaného pepstatinem A

vzorek: (1 mg pepsinu + 1 mg pepstatin A) /mL 50 mM octanového pufru pH 3,5 →
vzorek byl přes noc inkubován při 7°C

ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5

eluční mobilní fáze: 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídatkem 1M KSCN

2.6 FPLC prasečího pepsinogenu A

vzorek: 1 mg prasečího pepsinogenu A/mL 50 mM octanového pufru pH 6,0

ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 6,0

eluční mobilní fáze: 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídatkem 1M KSCN

2.7 Analytické metody

2.7.1 Stanovení koncentrace proteinů BCA metodou

Provedení komerční kit (Pierce, USA)

Roztoky: BCA Protein Assay Reagent A

BCA Protein Assay Reagent B (CuSO₄)

Postup:

Do mikrotitrační destičky se napipetuje 40 μL vzorku a přidá se 200 μL roztoku (BCA Protein Assay Reagent A : B v poměru 49:1). Mikrotitrační destička se 60 s třepe, a pak se 30 minut inkubuje při 65°C. Potom se proměří absorbance při vlnové délce 540 nm.

2.7.2 Stanovení aktivity podle Ansona a Mirského

Stanovení aktivity bylo provedeno modifikovanou metodou podle Ansona a Mirského³⁶

Roztoky: 0,3 M kyselina chlorovodíková

0,5 M hydroxid sodný

0,3 M trichloroctová kyselina (TCA)

2,5 % roztok hemoglobinu (1 g hemoglobinu se rozpustí ve 40 mL vody a přidá se 10 mL 0,3 M HCl).

Postup: Do mikrokumavky se napipetuje 250 μ L roztoku hemoglobinu a nechá se temperovat 10 minut ve vodní lázni při teplotě 37°C. Přidá se 50 μ L vzorku. Přesně po 10 minutách se reakce ukončí přidáním 500 μ L 0,3 M TCA. Mikrokumavka se odstředí v centrifuze po dobu 15 minut při 12 000 rpm a 10°C. V supernatantu se stanoví koncentrace proteinů BCA metodou (viz. 2.7.1).

3. Výsledky a diskuze

3.1 Afinity chromatografie

Předběžné analýzy byly prováděny nízkotlakou afinitní chromatografií na koloně obsahující 0,5 mL agarosu s imobilizovaným pepstatinem A. Podmínky pro první analýzu vycházely z literatury³⁸. Další analýzy byly prováděny na FPLC systému.

3.2 FPLC pepsinu A

3.2.1 Optimalizace adsorpčních podmínek

Adsorpce pepsinu na stacionární fázi agarosu s imobilizovaným pepstatinem A je závislá nejen na vlastnostech tohoto proteinu, ale také na jeho interakci s imobilizovaným ligandem. Byl zkoumán vliv pH a iontové síly (přídavek NaCl) ekvilibrační mobilní fáze na adsorpci pepsinu.

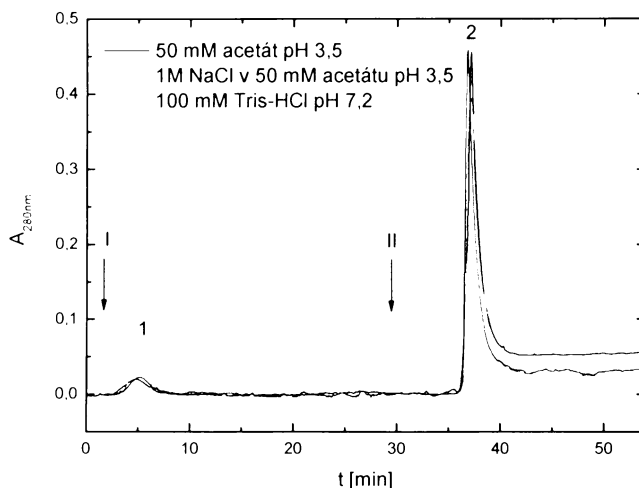
3.2.1.1 Vliv pH

Při volbě pH ekvilibrační mobilní fáze se vycházelo z podmínek stability a denaturace pepsinu a stability použité stacionární fáze. Výrobce doporučuje pracovat s agarosou s imobilizovaným pepstatinem A v rozmezí pH 2 až 11. Pro zjištění vlivu pH ekvilibrační mobilní fáze byl použit 50 mM octanový pufr pH 3,5 a 100 mM Tris - HCl pH 7,2. Bylo zjištěno, že v rozmezí pH 3,5 až 7,2 dochází k úplné adsorpci pepsinu (obr. 3.1). Ve frakcích v mrtvém objemu nebyla proteolytická aktivita detegována. Pro další analýzy byl vzhledem k pH stabilitě pepsinu použit 50 mM octanový pufr pH 3,5.

3.2.1.2 Vliv iontové síly

Byl zjišťován vliv iontové síly (přídavek NaCl) ekvilibrační mobilní fáze (50 mM octanový pufr pH 3,5) na adsorpci pepsinu. Bylo zjištěno, že iontová síla nemá na adsorpci pepsinu žádný vliv (obr. 3.1). Pepsin se zcela adsorbuje při koncentracích 0 až

1 M NaCl. Pro další analýzy byl jako ekvilibrační mobilní fáze zvolen 50 mM octanový pufr pH 3,5 bez přídavku NaCl.



Obr. 3.1 Vliv pH a iontové síly ekvilibrační mobilní fáze na adsorpci pepsinu

Experimentální podmínky: vzorek – 1 mL prasečího pepsinu A (koncentrace 1 mg/mL); I – ekvilibrační mobilní fáze (50 mM octanový pufr pH 3,5; 1M NaCl v 50 mM octanovém pufru pH 3,5; 100 mM Tris-HCl pH 7,2); II – 1M KSCN v 200 mM uhličitanovém pufru pH 10,7; průtoková rychlost: 0,5 mL/min; absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

pík číslo: 1 – neadsorbující se látky ze vzorku (příslušné odebrané frakce nevykazovaly proteolytickou aktivitu)

2 – desorbovaný prasečí pepsin A

3.2.2 Optimalizace elučních podmínek

Eluce studovaného pepsinu byla prováděna zvýšením pH a změnou iontové síly (přídavek KSCN, NaCl).

3.2.2.1 Vliv pH

V tabulce 3.1 jsou uvedena procentuální množství pepsinu desorbovaného z kolony daným pH eluční mobilní fáze. Z tabulky je patrné, že k částečné eluci (61%) pepsinu dochází až při pH 9,0. Nejeftektivnější desorpce byla dosažena při pH 10,7

(73%). K úplné desorpci by zřejmě bylo nutné dalšího zvýšení pH, což ale nebylo vzhledem k nestabilitě kolony nad pH 10,7 možné.

Tab. 3.1 Porovnání výtěžnosti (%) pro prasečí pepsin A při použití různých elučních mobilních fází

Experimentální podmínky: vzorek – 1 mL pepsinu (koncentrace 1 mg/mL); ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5; eluční mobilní fáze (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 200 mM fosforečnanový pufr pH 8,5; 200 mM uhličitanový pufr pH 9,0; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,0; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7); průtoková rychlost: 1 mL/min; absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

eluční mobilní fáze	výtěžnost [%]
100 mM Tris-HCl pH 8,5	0
200 mM fosforečnanový pufr pH 8,5	1
200 mM uhličitanový pufr pH 9,0	61
200 mM uhličitanový pufr pH 10,0	67
200 mM uhličitanový pufr pH 10,7	73

3.2.2.3 Vliv NaCl

V tabulce 3.2 je uveden vliv přídavku 1 M NaCl v eluční mobilní fázi na desorpci pepsinu. Z tabulky je patrné, že pouhým zvýšením iontové síly bez zvýšení pH mobilní fáze nedochází k žádné desorpci pepsinu. Dále byl zjišťován vliv zvýšení iontové síly za současného zvýšení pH mobilní fáze. Bylo zjištěno, že 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídavkem 1 M NaCl neměl na desorpci pepsinu prakticky žádný vliv. Dále byl jako eluční mobilní fáze použit 200 mM fosforečnanový pufr pH 8,5 s přídavkem 1 M NaCl. Bylo zjištěno, že ani tato mobilní fáze není vhodná, neboť byl při analýze získán značně rozmytý eluční pík a pepsin byl desorbován pouze z 42 %. Žádná z použitých elučních mobilních fází není dostačující pro úplnou desorpci pepsinu.

Tab. 3.2 Vliv přidavku NaCl do různých elučních mobilních fází na výtěžnost (%) pro prasečí pepsin A
 Experimentální podmínky: vzorek – 1 mL pepsinu (koncentrace 1 mg/mL); ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5; eluční mobilní fáze: 0 a 1 M NaCl v příslušné mobilní fázi (50 mM octanový pufr pH 3,5; 200 mM fosforečnanový pufr pH 8,5; 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7); průtoková rychlost: 1 mL/min; absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

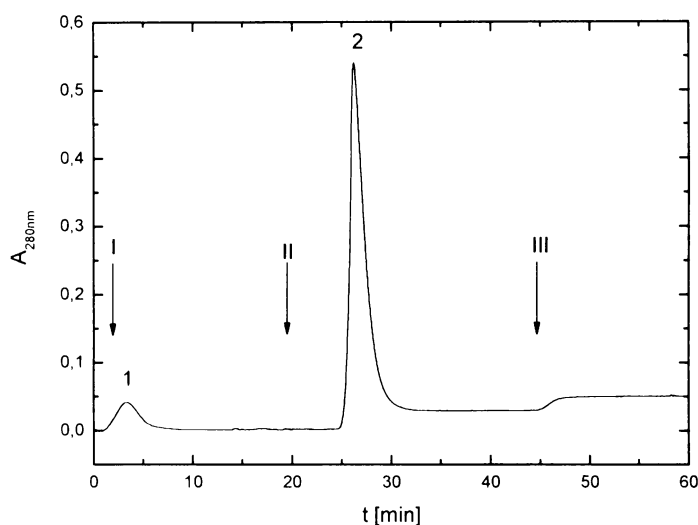
	NaCl	
	0 M	1 M
50 mM octanový pufr pH 3,5	0 %	1 %
200 mM fosforečnanový pufr pH 8,5	1 %	43 %
200 mM uhličitanový pufr pH 10,7	73 %	81 %

3.2.2.4 Vliv KSCN a pH

V předešlých analýzách bylo zjištěno, že zvýšení pH (viz. kap. 3.2.2.1) a přidavek 1 M NaCl (viz. kap. 3.2.2.3) do eluční mobilní fáze nevede k úplné desorpci pepsinu. Proto bylo hledáno jiné aditivum, které by zlepšilo eluci. Jako aditivum byla použita chaotropní sůl-KSCN.

Byla provedena analýza, kdy k eluci adsorbovaného pepsinu byly využity postupně tyto mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5 s přidavkem 3 M KSCN; 50 mM fosforečnanový pufr pH 6,0 s přidavkem 3 M KSCN a 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 3 M KSCN. Bylo zjištěno, že přidavek 3 M KSCN do octanového a fosforečnanového pufru nemá na desorpci pepsinu vliv. Pepsin byl desorbován až použitím 200 mM uhličitanového pufru pH 10,7 s přidavkem 3 M KSCN. Pro další analýzy byl zvolen tento pufr a byl hledán optimální přidavek KSCN (viz. obr. 3.2). Bylo zjištěno, že k desorpci 99 % pepsinu dochází již při koncentraci 1 M KSCN a další zvýšení koncentrace na 2 M nemělo vliv.

Porovnáním elučních mobilních fází bez a s přidavkem 1 M KSCN v 200 mM uhličitanovém pufru pH 10,7 bylo zjištěno, že přítomnost KSCN způsobuje zrychlení desorpce pepsinu (zkrácení doby analýzy). Jako optimální eluční fáze byl proto zvolen 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přidavkem 1 M KSCN.



Obr. 3.2 Vliv koncentrace KSCN na eluci pepsinu

Experimentální podmínky: vzorek – 1 mL prasečího pepsinu A (koncentrace 1 mg/mL); I – 50 mM octanový pufr pH 3,5; II – 1M KSCN v 200 mM uhličitanovém pufru pH 10,7; III – 2M KSCN v 200 mM uhličitanovém pufru pH 10,7

průtoková rychlost: 0,5 mL/min; absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

pík číslo: 1 – neadsorbující se látky ze vzorku (příslušné odebrané frakce nevykazovaly proteolytickou aktivitu)

2 – desorbovaný prasečí pepsin A

3.2.2.5 Eluce prasečího pepsinu A pepstatinem A

Přidáním inhibitoru nebo substrátu daného enzymu do ekvilibrační mobilní fáze¹³ lze dosáhnout specifické eluce analytu. Proto byl ke specifické eluci pepsinu testován přídavek pepstatinu A (inhibitor). Eluce volným pepstatinem A neměla na desorpci pepsinu žádný vliv. Během analýzy pravděpodobně docházelo k adsorpci pepstatinu A z mobilní na stacionární fázi, což vedlo ke zvyšování tlaku s následným porušením sloupce stacionární fáze. Pepstatin A tedy není vhodným elučním činidlem.

3.2.3 Optimalizace průtokové rychlosti

Byl zkoumán vliv průtokové rychlosti mobilní fáze kolonou. Byly provedeny analýzy při průtokové rychlosti 0,5 a 1 mL/min. Při průtokové rychlosti 0,5 mL/min byla

získána vyšší výtěžnost (99%) a méně rozmytý pík než při 1 mL/min (výtěžnost 81%). Proto byla pro další analýzy zvolena průtoková rychlost 0,5 mL/min.

3.2.4 Opakovatelnost analýz

V kapitolách 3.2.1 až 3.2.3 byly určeny optimální podmínky pro adsorpci (50 mM octanový pufr pH 3,5) a eluci (1M KSCN v 200 mM uhličitanovém pufru pH 10,7) pepsinu (obr. 3.3). Za těchto podmínek byly získány dva píky. První pík byl v mrtvém objemu a v jeho frakcích byla prokázána přítomnost proteinů, které však nevykazovaly proteolytickou aktivitu. Jedná se o nečistoty ze vzorku. Druhý pík, nacházející se v eluční části chromatogramu, představoval pepsin.

Za optimální podmínek byla analýza zopakována desetkrát. V tabulce 3.3 je uvedena výtěžnost a plocha elučního píku jednotlivých analýz, směrodatná odchylka, interval spolehlivosti a variační koeficient³⁹. K určení odlehlých výsledků, byl použit 3 σ -test a t-test.

Výtěžnost byla vypočítána ze vztahu:

$$\text{výtěžnost (\%)} = \left(\frac{m_A}{\sum m_{\text{FRAKCE}}} \right) * 100 \quad (3.1.)$$

kde m_A je množství nadávkovaného proteinu stanoveného metodou BCA [mg], m_{FRAKCE} množství proteinu stanovené v odebírané frakci [mg].

3.2.5 Kapacita stacionární fáze

Stanovení kapacity stacionární fáze bylo provedeno podle postupu popsaného v kapitole 1.3.8. Kapacita stacionární fáze s imobilizovaným pepstatinem A byla 38 mg prasečího pepsinu A na 1 mL této studované stacionární fáze.

3.3 FPLC pepsinu inhibovaného pepstatinem A

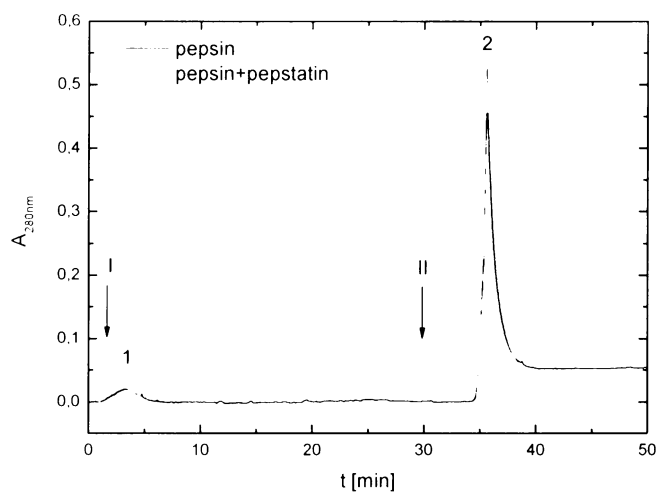
Žaludeční aspartátové proteinázy jsou inhibovány přirozeným inhibitorem pepstatinem A (cit. ²). Tento inhibitor tvoří velký počet nekovalentních interakcí s aktivním místem pepsinu. Proto jsme předpokládali, že pepsin interaguje přes své aktivní místo s pepstatinem A imobilizovaným na agarose. K ověření této hypotézy jsme

si připravili vzorek pepsinu, který byl inkubován přes noc při 7°C s pepstatinem A. Při inkubaci došlo k navázání pepstatinu A do aktivního místa pepsinu, což bylo ověřeno stanovením proteolytické aktivity (vzorek nevykazoval žádnou aktivitu). Vzhledem k zablokovanému aktivnímu místu jsme předpokládali, že nedojde při nadávkování na stacionární fázi k adsorpci. Na obrázku 3.3 jsou uvedeny chromatogramy pepsinu a inhibovaného pepsinu pepstatinem A (zablokované aktivní místo). Z obrázku je patrná shodnost obou chromatogramů. Proto lze předpokládat, že nedochází k vazbě pepsinu přes aktivní místo, ale že se na vazbě pravděpodobně podílí jiná část molekuly.

Tab. 3.3: Opakovatelnost a výtěžnost získané během deseti analýz za optimálních podmínek a jejich statistické vyhodnocení. Všechny analýzy byly provedeny za stejných podmínek.

Experimentální podmínky: vzorek – 1 mL pepsinu (koncentrace 1 mg/mL); ekvilibrační mobilní fáze: 50 mM octanový pufr pH 3,5; eluční mobilní fáze: 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídavkem 1M KSCN; průtoková rychlost: 0,5 mL/min; absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

číslo analýzy	plocha elučního píku [mV.s]	výtěžnost [%]
1	44 000	98
2	44 600	99
3	43 800	99
4	44 300	99
5	43 500	98
6	43 700	98
7	44 500	99
8	44 200	99
9	43 400	98
10	44 100	99
průměr	44 060	99
směrodatná odchylka	350	1
variační koeficient	1 %	1 %
interval spolehlivosti	44 060 ± 250	99 ± 1
určení odlehlých výsledků t-testem, 3σ-test	žádný z výsledků není odlehlý	



Obr. 3.3 Chromatografie pepsinu a inhibovaného pepsinu pepstatinem A

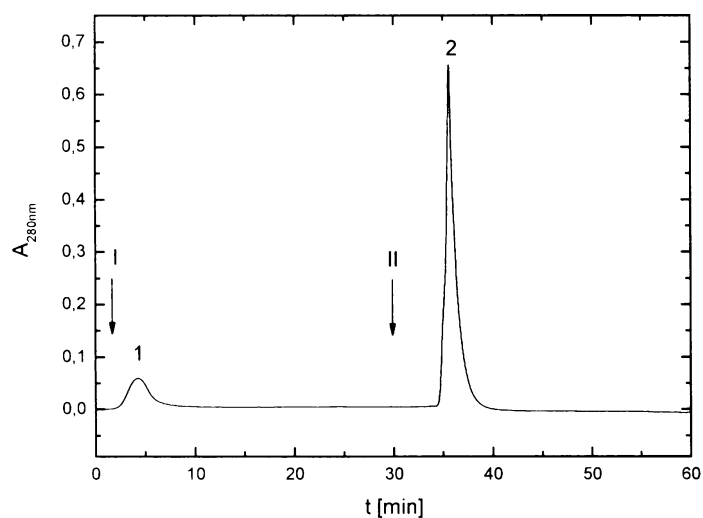
Experimentální podmínky: vzorek – 1 mL prasečího pepsinu A nebo 1 mL inhibovaného pepsinu pepstatinem A (koncentrace 1 mg/mL); I – 50 mM octanový pufr pH 3,5; II – 1M KSCN v 200 mM uhličitanovém pufru pH 10,7; průtoková rychlost: 0,5 mL/min; absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

pík číslo: 1 – neadsorbující se látky ze vzorku

2 – desorbovaný prasečí pepsin A

3.4 FPLC prasečího pepsinogenu A

Pro eluci prasečího pepsinogenu A (obr. 3.4) byly použity optimální eluční podmínky zjištěné pro pepsin. Byl získán jeden pík v mrtvém objemu (neadsorbující se látky nevykazující aktivitu) a druhý pík v eluční oblasti, který představuje pepsinogen (výťažnost 99%).



Obr. 3.4 Chromatografie prasečího pepsinogenu A

Experimentální podmínky: vzorek – 1 mL prasečího pepsinogenu A (koncentrace 1 mg/mL); I – 50 mM octanový pufr pH 6,0; II – 1M KSCN v 200 mM uhličitanovém pufru pH 10,7; průtoková rychlost: 0,5 mL/min; absorbance měřena při vlnové délce 280 nm

pík číslo: 1 – neadsorbující se látky ze vzorku (příslušné odebrané frakce nevykazovaly proteolytickou aktivitu)

2 – desorbovaný prasečí pepsinogen A

4. Závěr

Cílem bakalářské práce byla optimalizace adsorpčních a elučních podmínek afinitní chromatografie pro prasečí pepsin A. Byla používána komerčně dodaná stacionární fáze agarosa s imobilizovaným pepstatinem A. Průběh všech analýz byl vyhodnocen pomocí stanovení proteinů (BCA metodou), případně aktivity pepsinu (metodou Ansona a Mirského) v odebíraných frakcích.

Při optimalizaci adsorpčních podmínek bylo zjištěno, že na adsorpci prasečího pepsinu A nemá vliv pH v rozmezí 3,5 až 7,2 ani iontová síla (přídavek 0 až 1 M NaCl). Jako optimální adsorpční mobilní fáze byl zvolen 50 mM octanový pufr pH 3,5.

Při optimalizaci elučních podmínek byl zkoumán vliv pH a iontové síly. Eluce byly prováděny izokratickým způsobem. Účinné desorpce prasečího pepsinu A bylo dosaženo pouhým zvýšením pH na 10,7, ale eluční pík byl značně rozmytý. Proto byl zkoumán vliv přídavku NaCl nebo KSCN do eluční mobilní fáze. Zatímco NaCl měl na desorpci jen malý vliv, přídavkem KSCN bylo dosaženo ostrého elučního píku. Jako optimální eluční fáze byl proto zvolen 200 mM uhličitanový pufr pH 10,7 s přídavkem 1 M KSCN.

Byla stanovena kapacita studované stacionární fáze (38 mg pepsinu na 1 mL stacionární fáze). Výtěžnost pro prasečí pepsin A byla vysoká, tj. $(99 \pm 1) \%$. Opakovatelnost analýz byla velmi dobrá, variační koeficient pro plochu elučního píku byl nízký (RSD 1 %).

Při analýzách pepsinu a pepsinu inhibovaného pepstatinem A (zablokované aktivní místo pepsinu) došlo v obou případech k adsorpci na stacionární fázi. Tím bylo prokázáno, že prasečí pepsin A se na ligand (pepstatin A) neváže přes své aktivní místo. Přesné určení místa vazby prasečího pepsinu A na ligand vyžaduje další studii.

Nakonec byla provedena analýza prasečího pepsinogenu A. Při FPLC došlo k adsorpci prasečího pepsinogenu A na stacionární fázi. Využití agarosy s imobilizovaným pepstatinem A k analýze lidských pepsinogenů by bylo nutno ještě dále ověřit.

Literatura

1. Samloff I. M.: *Gastroenterology* **96**, 586 (1989).
2. Fusek M., Větvička V.: *Aspartic Proteinases*. CRC Press, Houston 1995.
3. Gritti I., Banfi G., Roi G. S.: *Pharmacol. Res.* **41**, 265 (2000).
4. Karlson P., Gerok W., Gross W.: *Pathobiochemie*. Academia, Praha 1987.
5. Kučerová Z., Tichá M.: *J. Chromatogr. B* **770**, 121 (2002).
6. Mills J. N., Tang J.: *J. Biol. Chem.* **242**, 3093 (1967).
7. Ryle A. P., Auffret C. A.: *Biochem. J.* **179**, 247 (1979).
8. Barret A. J.: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press 1999.
9. Richmond V., Tang J., Wolf S., Trucco R. E., Caputto R.: *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 453 (1958).
10. Arnoštová H.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2000.
11. Kazumasa M.: *Gastric Cancer* **9**, 245 (2006).
12. Oishi Y., Kiyohara Y., Kubo M., Tanaka K., Tanizaki Y., Ninomiya T., Doi Y., Shikata K., Yonemoto K., Shiota T., Matsumoto T., Iida M.: *Am J Epidemiol.* **163**, 629 (2006).
13. Sánchez L. M., Freije J. P., Merino A. M., Vizoso F., Foltmann B., López-Otin C.: *J. Biol. Chem.* **267**, 24725 (1992).
14. Kreuning J., Samloff I. M., Rotter J. I., Eriksson A. W.: *Pepsinogens in Man: Clinical and Genetic Advances*. Alan R. Liss, Inc., New York 1985.
15. Wiseman A.: *Příručka enzymové technologie*. SNTL Praha 1980.
16. Chen K. C. S., Tao N., Tang J.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5068 (1975).
17. Supelveda P., Marcinişzyn J. Jr., Liu D., Tang J.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5082 (1975).
18. Marcinişzyn J. Jr., Supelveda P., Huang W-Y., Lanier J. P.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5076 (1975).
19. Morávek L., Kostka V.: *FEBS Letters* **43**, 207 (1974).
20. Tang J., Hartley B. S.: *Biochem. J.* **118**, 611 (1970).
21. Sogawa K., Fujii-Kuriyami Y., Mizukami Y., Ichihara Y., Takahashi K.: *J. Biol. Chem.* **258**, 5306 (1983).
22. Richter C., Tanaka T., Yada R.Y.: *Biochem. J.* **335**, 481 (1998).
23. Marcinişzyn J., Hartsuck J.A., Tang J.: *J. Biol. Chem.* **251**, 7088 (1976).
24. Lowe C. R., Dean P. D. G.: *Afininí chromatografie*. SNTL, Praha 1979.

25. Turková J.: *Bioaffinity Chromatography (2nd Ed.)*. Elsevier, Amsterdam 1993.
26. Vařilová T.: *Chem. Listy* **99**, 570 (2005).
27. Štulík K.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
28. Leonard M.: *J. Chromatogr. B* **699**, 3 (1997).
29. Zöllner M., Matzuka S., Rapp W.: *Biochim. Biophys. Acta* **427**, 708 (1976).
30. Tonková E., Tichá M., Kučerová Z.: *Int. J. Biochromatogr.* **4**, 35 (1998).
31. Arnoštová H., Kučerová Z., Tišlerová I., Trnka T., Tichá M.: *J. Chromatogr. A* **911**, 211 (2001).
32. Kučerová Z., Pohl J., Korbová L.: *J. Chromatogr.* **376**, 409 (1986).
33. Frýdlová J., Kučerová Z., Tichá M.: *J. Chromatogr. B* **800**, 109 (2004).
34. Kay J., Dykes C. W.: *Biochem. J.* **157**, 499 (1976).
35. Walker J. M.: *The Protein Protocols Handbook 2*. přeprac. vyd. USA, Humana Press 2002.
36. Anson M. L., Mirsky A. E.: *J. Gen. Physiol.* **16**, 59 (1932).
37. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goetze N. M., Olson B. J., Klenk D. C.: *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).
38. Fu J. Y., Wu S. M., Chang C. T., Sung H. Y.: *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1042 (2003).
39. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*. Karolinum, Praha 2003.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc., a Ing. Zdence Kučerové, CSc., za odborné vedení, trvalý zájem a cenné rady a připomínky k mé bakalářské práci.

Dále děkuji všem svým kolegům na Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK, zejména pak Mgr. Janě Frýdlové, za všestrannou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také svým rodičům, celé rodině a přátelům za podporu během studia.

Závěrem chci poděkovat za finanční zabezpečení mé práce (granty MSMT: MSM 0021620806 a LC 06044, které se z části zabývají studiem aspartátových proteináz).