

Katarzyna SZALAPATA, Monika OSIŃSKA-JAROSZUK, Marcin GRAŻ,  
Anna JAROSZ-WILKOŁAZKA

e-mail: katarzyna.szalapata@poczta.umcs.lublin.pl

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

## Analiza wydajności i specyficzności procesu immobilizacji syntetycznego inhibitora proteaz serynowych z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej

### Wstęp

Elektroforeza kapilarna jest specyficzną techniką służącą do rozdzielania składników mieszanin różnych cząsteczek za pomocą pola elektrycznego. Spośród innych technik elektroforetycznych wyróżnia ją to, że rozdział prowadzony jest w rurce o małej średnicy nazywanej kapilarą [Whatley, 2001].

Cząsteczki znajdujące się w mieszaninie mogą mieć ładunek elektryczny dodatni lub ujemny. W przypadku, gdy liczba ładunków dodatnich i ujemnych w roztworze równoważy się, dochodzi do powstawania neutralnych (nienaładowanych) cząsteczek. Jeżeli weźmie się pod uwagę swobodę poruszania się cząsteczek w roztworze, to ładunek skumulowany na ich powierzchni sprawia, że będą się one poruszały w kierunku regionów naładowanych przeciwnie (np. w kierunku elektrod). W przypadku braku pola elektrycznego ruch takich cząsteczek jest losowy, natomiast w momencie zastosowania pola elektrycznego obserwuje się, że losowość i swoboda ruchu jonów o różnym ładunku zanika. Wówczas kationy (jony o dodatnim ładunku) podążają w stronę katody, natomiast aniony (jony o ładunku ujemnym) poruszają się w kierunku anody. Te zjawiska fizyczne występujące w technice elektroforezy kapilarnej sprawiają, że pozwala ona na prowadzenie rozdziału mieszanin z wysoką wydajnością i specyficznością [Whatley, 2001].

W niniejszej pracy technika elektroforezy kapilarnej została zastosowana do oznaczania stężenia syntetycznego inhibitora proteaz serynowych. Wybrany do przeprowadzenia procesu kowalencyjnej immobilizacji związek AEBSF (4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride hydrochloride) jest inhibitorem o szerokim spektrum działania. Badania prowadzone nad analizą jego właściwości biologicznych wykazały, że hamuje on wytwarzanie białka  $\beta$ -amyloidowego w komórkach nerwowych [Citron *i in.*, 1996] oraz wywołuje efekt antykoagulacyjny i antytrombotyczny [Giedroń *i Bielawiec*, 1996]. Ponadto może wykazywać działanie antybakteryjne lub antygrzybicze poprzez obniżanie aktywności endogennych proteaz serynowych mikroorganizmów pasożytniczych. Na podstawie tych doniesień inhibitor AEBSF został wybrany jako modelowa cząsteczka do immobilizacji inhibitorów proteaz serynowych, które wykazują aktywność biologiczną.

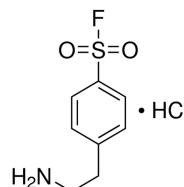
Celem niniejszej pracy była analiza wydajności procesu kowalencyjnej immobilizacji syntetycznego inhibitora proteaz serynowych, zbadanie mechanizmu specyficzności powstającego wiązania pomiędzy nośnikiem a immobilizowanym związkiem oraz określenie liczby uwolnionych z powierzchni nośnika cząsteczek inhibitora AEBSF. Do wykonania analiz zastosowano technikę elektroforezy kapilarnej, która pozwoliła na przeprowadzenie szybkiego i precyzyjnego pomiaru.

### Badania doświadczalne

#### Materiały

W procesie immobilizacji zastosowano syntetyczny inhibitor proteaz serynowych AEBSF (*Sigma-Aldrich*), którego strukturę pokazano na rys. 1. Natomiast proces jego unieruchamiania przeprowadzono na nierozpuszczalnej matrycy ze szkła o kontrolowanej porowatości (POCh) o następujących parametrach podstawowych:

- średnica porów  $D = 25,0$  nm
- objętość porów  $V_p = 1,27$  cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup>
- powierzchnia specyficzna nośnika  $S_{Hg} = 176,69$  m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>



Rys. 1. Struktura cząsteczki syntetycznego inhibitora proteaz serynowych AEBSF

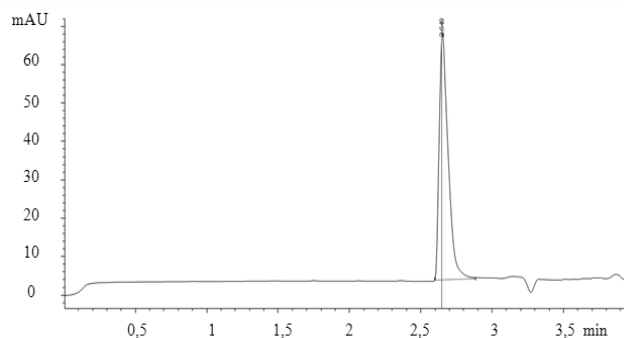
### Immobilizacja kowalencyjna syntetycznego inhibitora proteaz serynowych

W celu immobilizacji syntetycznego inhibitora AEBSF odmierzano 1 g nośnika i przepłukiwano go wodą destylowaną, a następnie 0,1 M buforem fosforanowym o wartości  $pH$  7. Proces aktywacji nośników i immobilizacji z zastosowaniem aldehydu glutarowego przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną wcześniej przez Bryjak *i in.* [2007]. Aktywowane nośniki zawieszano w roztworze inhibitora o stężeniu wynoszącym odpowiednio 2,5; 5,0 i 10,0 mM. Niezwiązane po procesie immobilizacji cząsteczki inhibitora usuwano przez płukanie nośnika roztworami o różnej sile jonowej i wartości  $pH$ : 0,1 M buforem fosforanowym o  $pH$  7; 0,5 M NaCl; 0,1 M buforem fosforanowo-cytrynianowym o  $pH$  4,5; 0,5 M buforem Tris-HCl o  $pH$  7; wodą destylowaną oraz ponownie 0,1 M buforem fosforanowym o  $pH$  7.

### Oznaczanie stężenia inhibitora AEBSF z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej

Elektroforezę kapilarną wykonano za pomocą elektroforezera Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis. Rozdział prowadzono w kapilarze krzemionkowej o całkowitej długości 60 cm (50 cm do okienka detekcji) i o średnicy 50  $\mu$ m. Do rozdziału stosowano napięcie 25 kV, a temperatura kapilary była utrzymywana na poziomie 20°C. Próbkę dozowano hydrodynamicznie przez 4 s, a ich detekcję prowadzono przy długości fali 230 nm. Do płukania kapilary przed każdym pomiarem stosowano bufor fosforanowy (50 mM roztwór wodorofosforanu disodu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O w wodzie MilliQ o wartości  $pH$  9,5), który był świeżo sporządzany przed każdą serią pomiarów. Czas analizy wynosił 4 minuty.

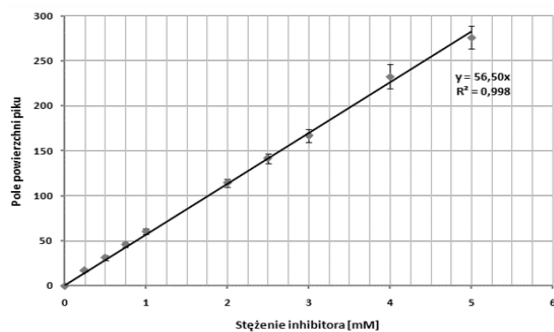
Na rys. 2 przedstawiono charakterystyczny pik pochodzący z procesu rozdziału syntetycznego inhibitora AEBSF.



Rys. 2. Elektroforogram przedstawiający pik pochodzący z rozdziału syntetycznego inhibitora AEBSF o stężeniu 5 mM techniką elektroforezy kapilarnej (czas retencji wynosił 2,649 min)

### Wykonanie krzywej kalibracyjnej

Krzywą kalibracyjną do oznaczania stężenia syntetycznego inhibitora proteaz serynowych AEBSF wykonano dla roztworów wzorcowych inhibitora w zakresie wartości 0,25÷5,0 mM (Rys. 3). Graficzną zależność powierzchni piku od stężenia inhibitora przedstawiono na rys. 4. Wszystkie pomiary zostały wykonane w trzech niezależnych powtórzeniach ( $n = 3$ ), a prezentowane na rys. 3 wyniki poddano analizie statystycznej. Za istotne statystycznie wyniki uznano jedynie te, dla których poziom istotności  $p$  nie przekraczał wartości 0,05.



Rys. 3. Krzywa wzorcową oznaczania stężenia syntetycznego inhibitora proteaz serynowych AEBSF z zastosowaniem elektroforezy kapilarniej

### Wyniki

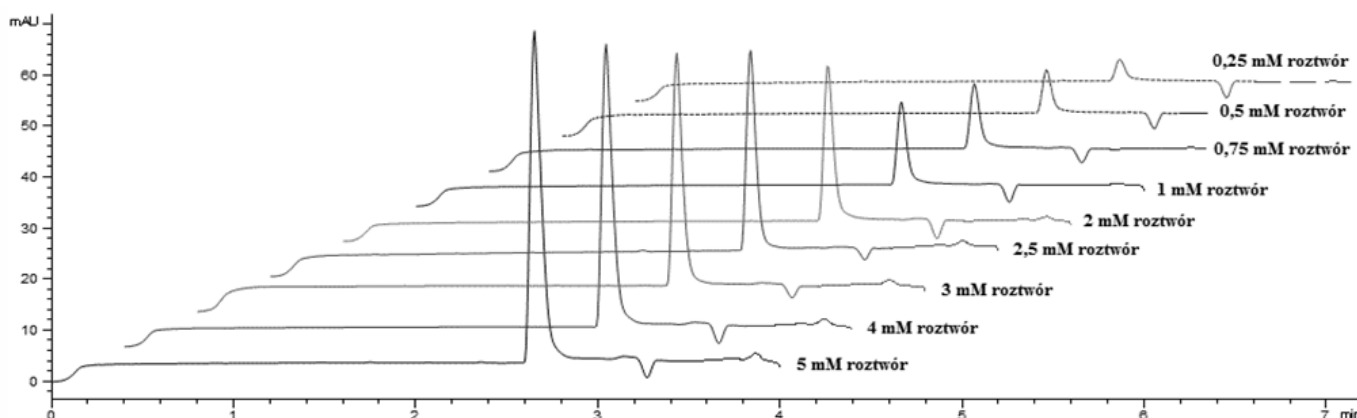
Na podstawie wyników uzyskanych po procesie unieruchamiania syntetycznego inhibitora AEBSF obliczono jego wydajność immobilizacji dla opisanego wcześniej nośnika (Tab. 1).

Tab. 1. Wydajność kowalencyjnej immobilizacji syntetycznego inhibitora proteaz serynowych AEBSF na szkle o kontrolowanej porowatości

Stężenie inhibitora przeznaczanego do immobilizacji [mM]	A	25	5	10
Stężenie inhibitora niezwiązanego z nośnikiem [mM]	B	1,5	3,4	6,2
Stężenie inhibitora przyłączonego do nośnika [mM]	A-B	1	1,6	3,8
Wydajność immobilizacji [%]		40	32	38

Dane te pozwalają stwierdzić, że syntetyczny inhibitor AEBSF we wszystkich przypadkach uległ efektywnej immobilizacji na powierzchni porowatej matrycy. Jednak wydajność immobilizacji w żadnym z preparatów nie przekroczyła 40%, co skłania do przeprowadzenia nowej serii doświadczeń, w której zoptymalizowane zostałyby wybrane parametry wpływające na skuteczność procesu unieruchamiania.

W celu sprawdzenia, czy syntetyczny inhibitor AEBSF jest wiązany z porowatym nośnikiem wyłącznie poprzez wiązania kowalencyjne, przeprowadzono analizę stężenia inhibitora w eluatach, które zostały zebrane w wyniku procesu odmywania nośnika po immobilizacji kowalencyjnej. Dane te zostały zaprezentowane w tab. 2.



Rys. 4. Graficzna prezentacja zależności powierzchni piku od stężenia syntetycznego inhibitora AEBSF

Tab. 2. Stężenia uwolniającego się syntetycznego inhibitora proteaz serynowych AEBSF związanego niespecyficznie z porowatym nośnikiem w poszczególnych eluatach zebranych po immobilizacji

Roztwór zastosowany do wypłukiwania nośnika	Stężenie uwolnionego inhibitora [mM]
0,1 M bufor fosforanowy pH 7	0,24
0,5 M NaCl	0
0,1 M bufor fosforanowo-cytrynianowy pH 4,5	0
0,5 M bufor Tris-HCl	0
woda destylowana	0,03
0,1 M bufor fosforanowy pH 7	0,01

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że inhibitor AEBSF wiąże się do porowatej matrycy również poprzez wiązania inne niż kowalencyjne (tzw. wiązania niespecyficzne). Obecność cząsteczek syntetycznego inhibitora proteaz serynowych potwierdzono w trzech eluatach. Uwolnienia syntetycznego inhibitora AEBSF z nośnika do 0,1 M buforu fosforanowego, świadczy o tym, że był on związany z nośnikiem wiązaniami adsorpcyjnymi, natomiast obecność inhibitora w wodzie destylowanej świadczy o związaniu z matrycą poprzez wiązania hydrofobowe.

### Wnioski

Przeprowadzone w ramach pracy badania pozwoliły na opracowanie efektywnej, wysoce specyficznej i szybkiej metody oznaczania stężenia syntetycznego inhibitora proteaz serynowych.

Dzięki zastosowaniu tej metody analitycznej wykazano, że syntetyczny inhibitor proteaz serynowych efektywnie wiąże się do porowatego nośnika, a najwyższą wydajność procesu immobilizacji (40%) uzyskano podczas unieruchamiania preparatu o stężeniu 2,5 mM.

Ponadto zaobserwowano, że poza wytworzeniem specyficznego wiązania kowalencyjnego, powstającego podczas procesu immobilizacji, cząsteczki inhibitora wiążą się z nierozpuszczalną matrycą krzemionkową za pomocą wiązań adsorpcyjnych oraz hydrofobowych.

### LITERATURA

- Bryjak J., Kruczkiewicz P., Rekuć A., Peczyńska-Czoch W., 2007. Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate. *Biochem. Eng., J.*, **35**, 325-332. DOI: 10.1016/j.bej.2007.01.031.
- Citron M., Diehl T. S., Capell A., Haass C., Teplow D. B., Selkoe D. J., 1996. Inhibition of amyloid  $\beta$ -protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron*, **17**, 171-179
- Giedroń J., Bielawiec M., 1996. Experimental studies on the anticoagulant and antithrombotic effects of Pefabloc FXa, a synthetic factor Xa inhibitor. *Cor et Vasa* **38**, nr 4, 192-195
- Whatley H., 2001. *Basic principles and modes of capillary electrophoresis* [in:] Petersen J.R., Mohammad A.A. (Eds) Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. 21-58). Humana Press Inc., Totowa, NJ