

ŠTÚDIUM IMOBILIZOVANEJ A EXTRACELULÁRNEJ DIPEPTIDYLPEPTIDÁZY IV *Chelidonium majus*

MARCELA KOREŇOVÁ^a, JÁN STANO^b,
KAROL MIČIETA^c, ALFRED BARTH^d,
PAVEL NEMEC^e, and VÍŤAZOSLAVA
BLANÁRIKOVÁ^b

^a Záhrada liečivých rastlín, ^b Katedra bunkovej a molekularnej biológie liečiv, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, ^c Katedra botaniky, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Révová 39, 811 02 Bratislava,

^d Ústav biochémie a biotechnológie Univerzity Martina Luthera, K. Mothesa 3, 06120 Halle, ^e Export-Import, Adámiho 24, 841 05 Bratislava
micieta@fns.uniba.sk

Kľúčové slová: imobilizácia, distribúcia, serínová proteáza, dipeptidylpeptidáza IV, *Chelidonium majus* L.

Úvod

Peptidhydrolytické enzýmy selektívne katalyzujú rad anabolických a katabolických procesov, biosyntézu a biotransformáciu rôznych peptidov. Dipeptidylpeptidázu IV (DP IV/CD 26, EC 3.4.14.5) objavili a popísali Hopsu-Havu a spol.¹ Prítomnosť tejto serínovej proteázy sa v rastlinách dokázala neskôr a bolo akceptované, že DP IV/CD 26 je ubiquitárnym enzýmom. DP IV/CD 26 enzýmovovo uvoľňuje z *N*-konca oligo- alebo polypeptidov predovšetkým dipeptidy typu Gly-Pro, Ala-Pro, Ala-Ala resp. Ser-Hyp za predpokladu, že sa za prolínom nenachádza ďalší prolín alebo hydroxyprolín. DP IV/CD 26 sa v rozhodujúcej miere podieľa na inaktivácii inkretínových hormónov, ktoré podporujú metabolizmus glukózy stimuláciou sekrécie inzulínu, čo sa prejaví vznikom diabetes mellitus 2. typu. Inhibítory DP IV/CD 26 sa tak stávajú predstaviteľmi nového typu antidiabetik².

Študovala sa imobilizácia a distribúcia DP IV/CD 26 v kalusových kultúrach lastovičníka s cieľom zachovania katalytickej aktivity tohto enzýmu. Jednoduchá a rýchla metóda dôkazu a stanovenia intra- a extracelulárnej DP IV/CD 26 využíva syntetické substráty: β -naftylamidy a *p*-nitroanilidy (resp. iné chromofóry) príslušných dipeptidov.

Experimentálna časť

Rastlinný materiál

Kalusové a suspenzné kultúry lastovičníka väčšieho (*Chelidonium majus* L.) sa odvodili zo sterilných kľúčnych rastlín a kultivovali podľa Stano a spol.³

Permeabilizácia buniek Tweenom 80

Suspenzne pestované bunky sa po odfiltrovaní a premytí 1,5 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl permeabilizovali 5% Tweenom 80 (20 g/60 ml) 3 hodiny za pomalého miešania (60 otáčok/min) pri 20 °C. Permeabilizované bunky sa premyli 2 l destilovanej vody a 3 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl.

Imobilizácia buniek glutaraldehydom

Permeabilizované bunky sme vložili do 0,15 mol l⁻¹ NaCl (20 g/60 ml), pomaly sa pridalo 6 ml 25% glutaraldehydu a pri laboratórnej teplote sa za pomalého miešania (60 otáčok/min) imobilizovali 2 hodiny. Imobilizované bunky sa premyli 3 l destilovanej vody, 3,5 l 0,15 mol l⁻¹ NaCl a uchovali v 0,15 mol l⁻¹ NaCl pri 4 °C.

Imobilizácia buniek pektátom a alginátom

Suspenzne pestované bunky sa po odfiltrovaní imobilizovali jednotlivo pektátom a alginátom (Na-sol'). 5 g buniek sa resuspendovalo jednotlivo v 20 ml 5% pektátu alebo 5% alginátu a potom sa pomaly pridalo (pomocou kapiláry) do 125 ml 5 · 10⁻² mol l⁻¹ CaCl₂ (za stáleho miešania 50 otáčok/min). Bunky imobilizované enkapsuláciou (obaľovaním) hydrogélom alginátu alebo pektátu sa nachádzajú v homogénnych guľičkách o priemere cca 4 mm. Gélové guľičky (100 guľičiek obsahuje 1 g buniek) s imobilizovanými bunkami sa potom odfiltrovali a premyli 800 ml 0,15 mol l⁻¹ NaCl. Guľičky (3 g) sa potom preniesli do 30 ml kultivačného média a kultivovali v 100 ml Ehrlenmayerových bankách na rotačnej trepačke (80 otáčok/min)^{3,4}.

Dôkaz extracelulárnej DP IV/CD 26

Pri dôkaze extracelulárnej DP IV/CD 26 sa použili syntetické substráty Gly-Pro- β NA alebo Gly-Pro-M β NA. Enzýmovo uvoľnený β NA resp. M β NA kopuluje s Fast Garnet GBC soľou za tvorby odpovedajúceho azofarbiva. Gly-Pro- β NA alebo Gly-Pro-M β NA (2 mg) sa jednotlivo rozpustil v 0,5 ml dimetylformamidu a 4,5 ml 0,1 mol l⁻¹ Na fosfátového tlmivého roztoku pH 6,5 s prídavkom 10 mg Fast Garnet GBC soli. K tomuto roztoku sa pridalo 5 ml 2% agaru v 0,1 mol l⁻¹ Na-fosfátovom tlmivom roztoku (pH 6,5), nalialo do Petriho misky a autoklávovalo. Pripravené agarové platne sa inokulovali bunkami kalusových kultúr a sterilne vypestovanými kľúčnymi rastlinami (4–6 dní starých)⁵ a inkubovali 30–90 minút.

Stanovenie aktivity intra- a extracelulárnej DP IV/CD 26

Príprava enzýmu

Pri stanovení intracelulárnej aktivity enzýmu sa použili bunky suspenzných kultúr. Bunky (10 g) sa premyli 2 l destilovanej vody, zhomogenizovali v predchladenej trecej miske 1:1 (g ml^{-1}) s $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ Na-fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,0 pri 4°C . Homogenát sa prefiltraval cez silonovú tkaninu, centrifúgoval (10 min, $15\,000 \text{ g}$ pri 4°C) a použil ako enzýmový preparát. Pri stanovení extracelulárnej aktivity sa použilo kultivačné médium bez buniek (centrifugácia 10 min, 2000 g).

Stanovenie aktivity DP IV/CD 26

Aktivita DP IV/CD 26 sa stanovila pomocou syntetického substrátu Gly-Pro-pNA⁶. Reakčná sústava pozostáva z 1,7 ml $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ Tris-HCl tlmivého roztoku pH 7,8 a 0,3 ml $6 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ roztoku substrátu. Imobilizované a natívne bunky (0,1–0,3 g) alebo enzýmový preparát (0,1 až 0,3 ml) sa predinkubovali 10 min pri 30°C v tlmivom roztoku a potom sa pridal substrát. V kontrolných pokusoch bol enzýmový preparát tepelne inaktivovaný (5 min pri 100°C). Reakčné sústavy sa inkubovali 30 min pri 30°C a reakcia sa zastavila pridaním 0,5 ml 30% kyseliny octovej. Koncentrácia enzýmovo uvoľneného *p*-nitroanilínu sa hodnotila spektrofotometricky pri 410 nm. Enzýmová aktivita je vyjadrená v kataloch. Obsah bielkovín sa stanovil za použitia štandardnej bielkoviny-hovädzieho sérumalbumínu⁷.

Vplyv pH na aktivitu DP IV/CD 26

Vplyv pH na aktivitu enzýmu sa testoval pomocou $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ Tris-HCl tlmivého roztoku v rozsahu pH 5,0 až 9,5. Reakčná zmes obsahovala Gly-Pro-pNA v $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ Tris-HCl tlmivom roztoku od pH 5,0 po pH 9,5.

Stanovenie čerstvej hmotnosti a sušiny

Čerstvá hmotnosť a sušina suspenznej kultúry a imobilizovaných buniek sa stanovili gravimetricky po vysušení do konštantnej hmotnosti pri 105°C .

Utilizácia glukózy

Utilizácia glukózy suspenznými a imobilizovanými bunkami sa sledovala 60 min. Bunky suspenzných kultúr a imobilizované bunky sa preniesli do roztoku glukózy

200 mg l^{-1} v $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ Na-fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,0 a sledoval sa úbytok glukózy⁸.

Viabilita buniek

Viabilita buniek sa sledovala podľa Dixona⁵ za použitia trifenylnitrotetrazólium chloridu (TTC), fluoresceín diacetátu a kyslíkovej elektródy.

Výsledky a diskusia

Imobilizácia buniek resp. biokatalyzátorov reprezentuje veľmi dôležitý spôsob uchovávanania (stabilizácie) vysoko účinných biokatalyzátorov (enzýmov), ktoré sú dôležité pre biotransformačné procesy⁹.

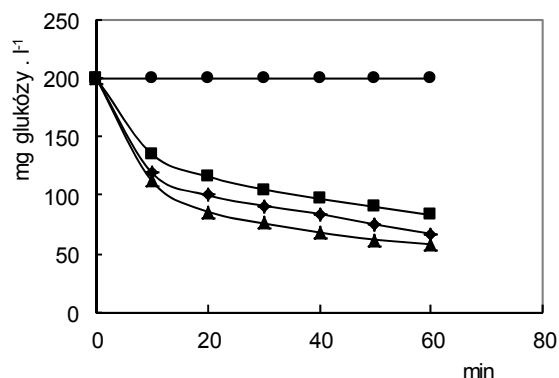
Encapsulácia buniek resp. enzýmov prírodnými alebo syntetickými hydrogélmi má široké uplatnenie^{8,10}. Glutaraldehydom imobilizované bunky neutilizujú glukózu, kým alginátom a pektátom imobilizované bunky sú viabilné a utilizujú glukózu (obr. 1). Imobilizácia testovaných buniek hydrogélmi alginátu a pektátu (tab. I) naznačuje, že pre početné biokatalyzátory (peptidhydrolázy) a bunky je táto metóda oveľa vhodnejšia než imobilizácia glutaraldehydom^{5,11}. Výsledky potvrdzujú, že imobilizácia glutaraldehydom vedie k vnútornému zosieťovaniu testovaného materiálu, čo spôsobuje významný pokles aktivity DP IV/CD 26 a aminopeptidáz. Z tohto dôvodu je aplikácia hydrogélom oveľa vhodnejšia. Imobilizované bunky majú v porovnaní s bunkami suspenzných kultúr tieto výhody: zabezpečenie nepretržitého prístoku, zlepšenie separácie biokatalyzátora, predĺženie počasu biokatalyzátora, fyzikálnu ochranu voči strižným silám, ochranu pred zhlukovaním, stimuláciu produkcie sekundárnych metabolitov, konzerváciu multifunkčného enzýmového systému^{5,9,12,13}.

Pri dôkaze a stanovení intra- a extracelulárnej aktivity DP IV/CD 26 sa použili chromogénne substráty¹⁴: Gly-Pro- β NA a Gly-Pro-pNA. Na kultivačné médium (agarové platne) s prídavkom substrátu Gly-Pro- β NA a s Fast Garnet GBC soľou (v prípade porovnávacieho pokusu substrát nebol prítomný)^{15,16} sa preniesli bunky rastúcich kalusov. Kalusy sa na kultivačných médiách ponechali 30–60 minút. Extracelulárna DP IV/CD 26 sa detegovala pomocou hnedočerveného zafarbenia, ktoré vzniká simultánnou azokopoláciou Fast Garnet GBC soli a zo substrátu enzý-

Tabuľka I

Aktivita DP IV/CD 26 v 14dňových bunkách suspenznej kultúry lastovičníka imobilizovanej obaľovaním alginátom a pektátom

Bunky	Proteíny [mg g^{-1} sušiny]	Aktivita [nkat g^{-1} sušiny]	Špecifická aktivita [nkat mg^{-1} proteínov]
Suspenzia	12,6±0,1	29,6±0,09	2,35
Imobilizované alginátom	12,6±0,1	8,9±0,08	0,71
Imobilizované pektátom	12,6±0,1	9,1±0,1	0,72



Obr. 1. Časový priebeh využitia glukózy v bunkách lastovičníka imobilizovaných glutaraldehydom a v bunkách suspenznej kultúry (10 g buniek, 20 ml tlmivého roztoku s glukózou); ● glutaraldehyd, ■ suspenzná kultúra, ◆ pektát, ▲ alginát

movo uvoľneného β -naftolu pod a okolo inokula na agarovej platni. Po prenesení kalusu na kultivačné médium bez substrátu resp. so substrátom a s tepelne inaktivovaným kalusom (10 min pri 100 °C) sa žiadne farebné zmeny nepozorovali.

Po vysadení sterilných kľúčnych rastlín lastovičníka na agarové platne so substrátom a Fast Garnet GBC soľou je na koreňku, koreňových vláskoch, ako aj na platni

v mieste ich kontaktu s ňou pozorovateľné hnedočervené zafarbenie. Porovnanie distribúcie intracelulárnej a extracelulárnej DP IV/CD 26 poukazuje na minoritné zastúpenie extracelulárnej a majoritné zastúpenie intracelulárnej DP IV/CD 26 (tab. II). Distribúcia intracelulárnej DP IV/CD 26, aminopeptidáz a invertázy je podobná. Je zaujímavé, že aktivita extracelulárnej α - a β -galaktozidázy je oveľa vyššia než DP IV/CD 26, invertázy a aminopeptidáz^{3,4,17}.

DP IV/CD 26 podobne ako aminopeptidázy je vhodnejšie imobilizovať pomocou hydrogélom než glutaraldehydom. Pri imobilizácii glutaraldehydom – bifunkčným reagens dochádza k tvorbe kovalentných väzieb medzi aminoskupinami a glutaraldehydom. Pretože aminoskupiny sú v oboch prípadoch v aktívnom centre, po tejto imobilizácii dochádza k výraznému poklesu aktivity oboch enzýmov¹⁰. Hladinu glukózy v krvi regulujú aj inkretíny GLP-1 a glukóza – dependentné inzulínotropné peptidy (GIP), ktoré spolu s rastovými hormónmi otvárajú novú cestu terapie diabetu. DP IV/CD 26 však zapríčiňuje degradáciu GLP-1 a GIP. Po aplikácii špecifického inhibítora DP IV/CD 26 izoleucyl tiazolidínu možno túto degradáciu celkom zablockovať¹⁸. Porovnanie distribúcie intra- a extracelulárnej aktivity študovaného enzýmu poukazuje, že jeho prevažná časť (82,2 %) sa nachádza v bunke a iba malá časť (17,8 %) je v kultivačnom médiu. Distribúcia intra- a extracelulárnej DP IV/CD 26, aminopeptidáz a invertázy je podobná^{6,17}. Aktivita extracelulárnej α - a β -galaktozidázy je oveľa vyššia (3–4 krát) než DP IV/CD 26, aminopeptidáz a invertázy^{17,18}. Metóda skriningu DP IV/

Tabuľka II

Aktivita DP IV/CD 26 v 14dňových bunkách suspenznej kultúry lastovičníka permeabilizovanej Tweenom 80 a imobilizovaných glutaraldehydom

Bunky	Proteíny [mg g ⁻¹ sušiny]	Aktivita [nkat g ⁻¹ sušiny]	Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínov]
Suspenzia	12,6±0,1	29,6±0,09	2,35
Permeabilizované	5,4±0,1	32,7±0,09	6,05
Imobilizované	5,5±0,1	2,3±0,07	0,42

Tabuľka III

Aktivita DP IV/CD 26 v bunkách a médiu 14dňovej suspenznej kultúry lastovičníka

Frakcia	Objem [ml]	Proteíny [mg g ⁻¹ čerstvej hmoty]	Aktivita [nkat g ⁻¹ čerstvej hmoty]	Špecifická aktivita [nkat mg ⁻¹ proteínov]
Intracelulárna aktivita (homogenát z izolovaných buniek)	0,2	0,65±0,08	1,96±0,08	3,01
Extracelulárna aktivita (kultivačné médium bez buniek) ^a	1,0	0,26±0,06	0,42±0,06	1,61

^a Zodpovedajúca obsahu izolovaných buniek

CD 26 umožní jednoduchý a nenáročný výber zdrojov študovaného enzýmu. Cieľom bolo získanie dostupného zdroja DP IV/CD 26 potrebného pri štúdiu jeho vhodných inhibítorov ako aj ďalších dipeptidáz, v snahe zvýšiť účinnosť inkretínových hormónov. Najznámejšími a do terapie zaradenými inhibítormi dipeptidáz patria sitagliptín, vildagliptín, saxagliptín, izoleucyl tiazolid a izoleucyl pyrrolidid^{2,18}.

Záver

Výsledky poukazujú, že pri imobilizácii DP IV/CD 26 sú hydrogély alginátu a pektátu oveľa výhodnejšie než aplikácia glutaraldehydu. Majoritná časť DP IV/CD 26 (82,2 %) sa nachádza v intracelulárnej frakcii a iba minoritná časť (17,8 %) v extracelulárnej frakcii. Špecifická aktivita intracelulárnej frakcie je 1,87krát vyššia než špecifická aktivita extracelulárnej frakcie. Pomocou syntetického substrátu β -naftylamidú Gly-Pro- β NA a Fast Garnet GBC soli sa vypracovala jednoduchá, rýchla a spoľahlivá metóda dôkazu extracelulárnej DP IV/CD 26. Študovaný enzým DP IV/CD 26 je perspektívnym modelom pre štúdium potenciálnych farmák.

Práca bola vypracovaná v rámci riešenia grantového projektu VEGA 1/0182/09.

LITERATÚRA

- Hopsu-Havu V. K., Glenner G. G.: *Histochemie* 7, 197 (1966).
- Ilavská A.: *Via pract.* 4, 27 (2007).
- Stano J., Mičieta K., Koreňová M., Blanáriková V.: *Chem. Listy* 101, 65 (2007).
- Stano J., Neubert K., Roos W., Mičieta K., Koreňová M., Blanáriková V.: *Chem. Listy* 104, 1040 (2010).
- Dixon R. A.: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1991.
- Stano J., Mičieta K., Tintemann H., Neubert K.: *Chem. Biodiv.* 3, 414 (2006).
- Doumas T. B., Bayse D. D., Carter R. J., Peters T., Schaffer R.: *Clin. Chem.* 27, 1642 (1981).
- Trinder P.: *J. Clin. Pathol.* 22, 158 (1969).
- Gill I., Ballesteros A.: *Trends Biotechnol.* 18, 282 (2000).
- Elcin Y. M., Sacak M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60, 9 (1996).
- Trelles J. A., Bentancor L., Schoijet A., Porro S., Lewkowicz E. S., Sinisterra J., Iribarren A. M.: *Chem. Biodiv.* 1, 280 (2004).
- Mittal A., Khurana S., Singh H., Kamboj R. C.: *Enzyme Microb. Technol.* 37, 318 (2005).
- Hasal P., Vojtišek V., Čejková A., Kleczek P., Kofroňová O.: *Enzyme Mikrob. Technol.* 14, 211 (1992).
- Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T. H.: *Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual*. Springer, Berlin 1979.
- Stoward P. J., Pearse A. G. E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Vol. 3. Churchill Livingstone, Edinburgh 1991.
- Stano J., Mičieta K., Tintemann H., Kovács P.: *Pharmazie* 59, 323 (2004).
- Marques M. R., Stüker C., Kichik N., Tarragó T., Giralt E., Morel A. F., Dalcó I. I.: *Fitoterapia* 81, 552 (2010).
- White J.R.: *Diabet. Spectrum* 1, 24 (2011).

M. Koreňová^a, J. Stano^b, K. Mičieta^c, A. Barth^d, P. Nemeč^e, and V. Blanáriková^b (^a Medicinal Plants Garden, ^b Department of Cellular and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, Slovakia, ^c Department of Botany, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia, ^d Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin Luther University, Halle/Saale, Germany, ^e Export-Import Ltd, Bratislava, Slovakia): **Study of Immobilized and Extracellular Dipeptidylpeptidase IV in *Chelidonium maius***

Cells in suspension culture of celandine (*Chelidonium maius* L.) were permeabilized with Tween 80 and immobilized with glutaraldehyde, alginate or pectinate. Glutaraldehyde-immobilized celandine cells lost their viability. Celandine cells immobilized with pectinate or alginate have retained the high activity of dipeptidylpeptidase (DP) IV/CD 26 with a pH optimum at 7.8. The immobilized cells showed a good activity, fair stability and convenient physicochemical properties. The extracellular activity of DP IV/CD 26 estimated in cell suspension accounts for 82.2 % of the total activity the rest being due to the intracellular activity. The latter activity is 1.87 times higher than the extracellular one. Secretion of DP IV/CD 26 by root tips, root hairs, callus and suspension cells was detected histologically. The method permits a rapid, simple and specific identification of DP IV/CD 26.