

Praca oryginalna • Original Article

Oznaczanie stężenia aktywnych form katepsyn D i B w oparciu o biosensory SPRI

Determination of the active form concentration of cathepsins D and B by SPRI biosensors

Ewa Gorodkiewicz¹, Elżbieta Regulska¹, Wiesława Roszkowska-Jakimiec²

¹Zakład Elektrochemii, Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku

²Zakład Analizy Instrumentalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Przedstawiono innowacyjną metodę oznaczania stężenia biomolekuł, jaką jest Powierzchniowy Rezonans Plazmonów w wersji Imaging (SPRI). Oznaczono stężenie katepsyn D (Kat D) oraz B (Kat B) w osoczu krwi i ślinie w oparciu o biosensory SPRI. Oznaczono również aktywność badanych katepsyn. Zaobserwowano wyższe wartości stężeń, jak i aktywności obu katepsyn w przypadku osób cierpiących na białaczkę limfocytową oraz po 70 roku życia w porównaniu do kontroli. Zmiany te występowały zarówno w próbkach osocza, jak i śliny. Porównanie wartości stężeń z wartościami aktywności danego enzymu pozwala stwierdzić, czy wzrost stężenia pochodzi od aktywnych cząsteczek. Metoda SPRI może zostać z powodzeniem wykorzystana do oznaczania stężenia aktywnych form enzymów lizosomalnych w diagnostyce stanów zapalnych w jamie ustnej, jak również stanów nowotworowych.

Summary

Innovative method for determination of biomolecules concentration, which is Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI), was presented. Concentration of cathepsin D and cathepsin B was evaluated in blood and saliva on a base of SPRI biosensors. Activity of above mentioned cathepsins was estimated as well. Higher level of concentration and activity values of both cathepsins was observed in case of people suffering from leukaemia and after age of 70 in compare with the control. Those differences were present in blood plasma, as well as in saliva. Comparing concentration with activity values of appropriate enzyme make it possible to conclude whether increase of concentration comes from active forms of molecules. SPRI method can be successfully used for determining the concentration of active forms of enzymes presented in lysosomes in diagnostic of inflammatory condition in the oral cavity, as well as in the tumor progression.

Słowa kluczowe: katepsyna D, katepsyna B, SPR, osocze, ślina

Key words: cathepsin D, cathepsin B, SPR, blood plasma, saliva

Wstęp

Katepsyny są protezami wewnątrzkomórkowymi, zazwyczaj zlokalizowanymi w lizosomach. Większość katepsyn stanowią proteazy cysteinowe (katepsyna B). Tylko nieliczne są protezami aspartylowymi (katepsyna D i E) i protezami serynowymi (katepsyna A i G). Enzymy lizosomalne dokonują wewnątrzlizosomalnej degradacji zużytych białek komórkowych i białek obcych, które dostały się do komórki drogą endocytozy. Zwiększone uwalnianie katepsyn z lizosomów ma miejsce w stanach patologicznych takich jak niedotlenienie, martwica komórek, powstawanie stwardnienia rozsianego,

w procesach rozrostu i powstawania przerzutów nowotworowych [8].

Aktywność katepsyn oznacza się przy użyciu specyficznego substratu z zachowaniem optymalnych warunków (pH, czas reakcji). Oznaczanie stężenia katepsyn dokonuje się przy użyciu przeciwciał, metodą immunoenzymatyczną lub radioimmunoenzymatyczną. [12]. Pomiar stężenia za pomocą wyżej wymienionych metod dotyczy wszystkich form katepsyny: pre-proenzymu, proenzymu, aktywnego enzymu, enzymu związanego z inhibitorem oraz enzymu zdenaturowanego i częściowo zdegradowanego. Za aktywne biologicznie

formy enzymu uważa się zarówno pośrednie, jak i dojrzałe postaci katepsyn D i B [7].

W ostatnich latach do oznaczania stężenia związków biologicznych oraz interakcji pomiędzy nimi, zaczęto stosować fizykochemiczną metodę, jaką jest Powierzchniowy Rezonans Plazmonów (SPR). Metoda ta wykorzystuje plazmony powierzchniowe (wolne elektrony metalu), które mogą być wzbudzone na powierzchni metalu, najczęściej złota. Poprzez monitorowanie zmian sygnału SPR, możliwe jest mierzenie wiązania się związków na powierzchni sensora. Biosensorem jest szklana płytka pokryta cienką warstwą złota (ok. 50 nm), który oprócz miejsc aktywnych pokryty jest fotopolimerem oraz hydrofobową maską w celu blokady powierzchni. Przygotowana do badań płytka jest stabilna przez co najmniej tydzień i w tym okresie może być stosowana do oznaczeń katepsyn. Biosensor SPRI do oznaczeń katepsyny D wykazuje liniowość w zakresie stężeń 0,12 – 1 ng/ml, granica wykrywalności wynosi 0,12 ng/ml, odzysk – 118 %, a nieprecyzja (wyrażona jako współczynnik zmienności) – 0,74 % [2]. W przypadku katepsyny B zakres liniowości mieści się w przedziale stężeń 0,39 – 2 ng/ml, granica wykrywalności wynosi 0,39 ng/ml, odzysk – 110 %, zaś nieprecyzja – 10,6%. SPR pozwala na szybkie, zarówno jakościowe, jak i ilościowe, oznaczenia odpowiednich białek poprzez wykorzystanie specyficznego oddziaływania np. enzym-inhibitor. Celem niniejszego doniesienia jest opracowanie nowej metody oznaczania stężenia aktywnych form enzymu proteolitycznego, które są związane z inhibitorem (pro-enzym, enzymatycznie aktywna cząsteczka, denaturowany enzym) w oparciu o zastosowanie biosensorów SPRI. Wykonano także oznaczenia aktywności tych enzymów (katepsyna D i katepsyna B).

Materiał i metody

Katepsyna B z ludzkiej wątroby, cystatyna C z ludzkiego moczu (CALBIOCHEM, Merck group, Merck Sp. z o.o., Warszawa, Polska), katepsyna D z ludzkiej wątroby, Tween 20, chlorowodorek cysteaminy, kwas N-(2-hydroksyetylo) piperazyno-N'-(2-etanosulfonowy) (HEPES), N-etylo-N'-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid (EDC), pepstatyna A, DL-ditiotreitol (DDT), 1-oktadekanotiol (ODM), N-hydroksysukcynimid (NHS) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Niemcy), bufor HBS-ES (Biacore, Uppsala, Szwecja), hemoglobina (Difco Laboratories, Detroit, USA), L-tyrozyna, p-nitroanilina, kwas trichlorooctowy, odczynnik Folina-Cio-

calteau (MERCK, Sp. z o.o., Darmstadt, Niemcy), BZ-DL-Arg-pNA (BACHEM AG, Bubendorf, Szwajcaria). Pozostałe odczynniki POCh, Gliwice, Polska. Roztwory wodne były sporządzane przy użyciu wody dejonizowanej miliQ (Simplicity®MILLIPORE).

W celu oznaczenia stężenia katepsyny D i B za pomocą metody SPR sensory umieszczane były na co najmniej 2 godziny w etanolowym roztworze tiolu - cysteaminy o stężeniu 20 mmol/l w celu utworzenia monowarstwy. Następnie przepłukiwano je kilkakrotnie w etanolu, w wodzie i suszono pod argonem. W celu zimmobilizowania na powierzchni tiolu pepstatyny A (przy oznaczaniu katepsyny D), bądź cystatyny (przy oznaczaniu katepsyny B) zaktywowano grupę karboksylową inhibitora przy użyciu odczynników EDC i NHS. Tak przygotowany inhibitor umieszczano na sensorze i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C. Sensor, na powierzchni, którego został zimmobilizowany inhibitor, ułożono na powierzchni przyzmatu, odczytywano sygnał SPR, a następnie na okres 10 minut umieszczano na nim roztwór wzorcowy katepsyny, bądź próbkę ją zawierającą. Po zajściu interakcji enzym-inhibitor ponownie odczytywano sygnał SPR. Z różnicy sygnałów przed i po interakcji oraz na podstawie krzywej kalibracyjnej określano wartość stężenia danej katepsyny. Oznaczając stężenie katepsyny D w danej próbce doprowadzano pH do wartości 3,5, zaś przy oznaczaniu stężenia katepsyny B – do wartości 6,5.

Aktywność katepsyny D oznaczono przy użyciu 6% hemoglobiny denaturowanej kwasem solnym [3], zaś aktywność katepsyny B przy użyciu syntetycznego substratu [4].

Pobierano 5 ml próbki krwi na cytrynian jako antykoagulant od 10 osób zdrowych i 10 osób z przewlekłą białaczką limfocytową-CLL. Próbkę osocza otrzymywano przez odwirowanie pełnej krwi (1000 x g, 15 min, 4°C). Natomiast ślinę pobierano na czczo (ok. 3 ml) od 9 osób w wieku 21-23 lat i 9 osób po 70. roku życia i wirowano przez 15 minut (1500 x g).

Wyniki i dyskusja

W tabeli I przedstawiono aktywność i stężenie aktywnych form enzymu lizosomalnego w osoczu krwi ludzi zdrowych i chorych na białaczkę limfocytową. Wykazano znaczny wzrost zarówno aktywności jak i stężenia katepsyny B, natomiast mniejszy wzrost aktywności i stężenia katepsyny D. Oznaczając stężenie i aktywność katepsyn D i B w ślinie, otrzymano zdecydowanie wyższe wartości w przypadku śliny osób po 70. roku życia, podczas gdy w ślinie osób kontrol-

Tabela I.
Aktywność oraz stężenie katepsyny B i katepsyny D w osoczu krwi

Oznaczany enzym	Stężenie enzymu związanego z inhibitorem [ng/ml]		Aktywność	
			KatB (pNA), [nmol/ml/24 h]	
	Grupa kontrola	Grupa badana	Grupa kontrola	Grupa badana
Katepsyna B	0,7 ± 0,1	62,0 ± 20,0	130,0 ± 30,0	524,0 ± 96,0
Katepsyna D	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,4	83,0 ± 25,0	175,0 ± 24,0

Tabela II.
Aktywność oraz stężenie Katepsyny B i Katepsyny D w ślinie

Oznaczany enzym	Stężenie enzymu związanego z inhibitorem [ng/ml]		Aktywność	
	Grupa kontrola	Grupa badana	KatB (pNA), [nmol/ml/24 h]	KatD (tyr), [nmol/ml/6h]
Katepsyna B	0,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	52,0 ± 10,0	72,0 ± 40,0
Katepsyna D	0,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	46,0 ± 22,0	117,0 ± 66,0

nych uzyskano nieco niższe wartości (tabela II).

Wzrost aktywności Katepsyny D i jej stężenia był obserwowany w płynach ustrojowych i w osoczu pacjentów z nowotworami [6,13]. Wzrost aktywności lub zawartości tego enzymu w cytozolu i we krwi może wystąpić poprzez znany mechanizm, w którym uszkodzeniu ulegają błony lizosomów, w trakcie niedotlenienia lub martwicy. Alternatywną drogą jest wzrost ekspresji genu kodującego Katepsynę D i jej nadprodukcja. Nadprodukcja proenzymu prowadzi bezpośrednio do niewydolności receptora mannozo-6- fosforowego, niezbędnego w transporcie enzymu z aparatu Golgiego do lizosomów [9]. Efektem tego jest wzrost stężenia prokatepsyny D w cytozolu komórki, a potem ewentualnie w macierzy międzykomórkowej. W wyniku zdolności komórek nowotworowych do tworzenia przecznie kwaśnego środowiska, następuje autoaktywacja prokatepsyny D. Wzrost aktywności i/lub ekspresji Katepsyny D zwiększa ryzyko powstawania przerzutów [11].

W wielu typach nowotworów obserwuje się nadekspresję i zwiększenie aktywności także Katepsyny B i występowanie zwiększonych ilości w cytozolu, w błonach komórkowych lub w przestrzeniach międzykomórkowych [1,14]. Zwiększona aktywność Katepsyny B w komórkach nowotworowych znajduje odbicie w podwyższonej aktywności we krwi.

Zmiany stężenia oznaczanych w ślinie Katepsyn mogą odgrywać ważną rolę w patobiochemii i diagnostyce chorób śluzówki, dziąseł oraz gruczołów ślinowych. Mogą być objawem chorób jamy ustnej. Oznaczenie Katepsyn w ślinie można uznać za dobrą metodę oceny ryzyka danej osoby na zachorowanie na paradontozę [5,9]. Analiza śliny może pomóc w określeniu bieżącego stanu uzębienia pacjenta, co pozwoli zapobiec rozwojowi poważniejszych chorób.

Wnioski

1. Metoda SPRI jest innowacyjną, efektywną i prostą metodą oznaczania stężenia enzymów lizosomalnych, takich jak Katepsyna D i B.
2. Porównanie wartości stężeń z wartościami aktywności danego enzymu pozwala stwierdzić, czy tendencje zmian obu wartości są takie same.

Piśmiennictwo

1. Budihna M, Strojanić P, Smid L i wsp. Prognostic value of cathepsin B, H, L, D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and Neck carcinoma. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1996; 377:385-390

2. Gorodkiewicz E, Regulska E, SPR Imaging Biosensor for Aspartyl Cathepsins: Sensor Development and Application for Biological Material. *PPL* 2010; 17: 1148-1154.
3. Greczaniuk A, Roszkowska-Jakimiec W, Gacko M i wsp. Oznaczanie aktywności Katepsyny D w osoczu krwi przy użyciu hemoglobiny denaturowanej kwasem solnym. *Diagn Lab* 2000; 36: 97-101
4. Keilová H, Tomášek V, Effect of papain inhibitor from chicken egg white on cathepsin B₂. *Biochim Biophys Acta* 1974; 334: 179-186
5. Król K, Grocholewicz K, Some salivary proteins as biomarkers of local and general diseases. Literature Review, *Ann Acad Med Stetinensis* 2007; 53: 78-82
6. Kuester D, Lippert H, Roessner A i wsp. The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2008; 204: 491-500
7. Lah TT, Hawley M, Rock KL i wsp. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsin B and L, in macrophages. *FEBS Lett* 1995; 363: 85-89
8. Olszewska D, Drewa T, Makarewicz R i wsp. Znaczenie Katepsyn B i D w procesach fizjologicznych i patologicznych. *Pol Mer Lek* 2001; 10: 65-70
9. Ozmeric N, Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 2004; 343: 1-16
10. Rochefort H, Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur J Cancer* 1992; 28: 178-183
11. Roger P, Motcourrier P, Maudelonde T i wsp. Cathepsin D immunostaining in paraffin-embedded breast cancer cells and macrophages: correlation with cytosolic assay. *Hum Pathol* 1994; 25: 863-873
12. Rudovsky A, Locher L, Zeyner A i wsp. Measurement of immunoglobulin concentration in goat colostrums. *Small Rumin Res* 2008; 74: 265-269
13. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Wincewicz A i wsp. Evaluation of serum cathepsin B and D in relation to clinicopathological staging of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4225-4229
14. Warwas M, Haczyńska H, Gerber J i wsp. Cathepsin B-role in cancer invasion and diagnosis. *Postępy Hig Med Dośw* 1994; 48: 729-743

Adres Autorów:

Zakład Elektrochemii
 Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku
 Al. J. Piłsudskiego 11/4,
 15-443 Białystok

(Praca wpłynęła do Redakcji: 2010.03.22)

Praca przekazana do opublikowania: 2010.05.25)