

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

BIOMINERALIZACE SRDEČNÍCH CHLOPNÍ

LUCIE COUFALOVÁ^a, ŠTĚPÁNKA KUČKOVÁ^{a,b}, ANTONÍN ZEMAN^c, MICHAL ŠMÍD^d, MARTINA VELČOVSKÁ^a a RADOVAN HYNEK^a

^a Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Katedra chemie a didaktiky chemie, Pedagogická fakulta, Univerzita Karlova v Praze, M. D. Rettigové 4, 116 39 Praha 1, ^c Ústav teoretické a aplikované mechaniky AV ČR, v. v. i., Prosecká 76, 190 00 Praha 9, ^d Fakultní nemocnice Plzeň, kardiologické oddělení, alej Svobody 80, 304 60 Plzeň lucie.coufalova@vscht.cz

Došlo 5.6.12, přijato 14.8.12.

Klíčová slova: aortální stenóza, chlopní tkáň, fosfatáty/kalcifikáty, hmotnostní spektrometrie, biomineralizace, proteiny

Úvod

Aortální stenóza je ve vyspělých státech nejčastěji operovanou srdeční vadou. Ve Spojených státech amerických se náklady na operační léčbu aortálních stenóz odhadují na miliardy dolarů ročně¹. Mezi hlavní příčiny vzniku tohoto onemocnění patří degenerativní (fosfatační/kalcifikační) změny, kdy mineralizuje chlopní tkáň, a tím dochází k jejímu zúžení a ke vzniku překážky při odvodu krve ze srdeční komory². Následkem toho dochází k tlakovému přetížení komory a jejímu postupnému zbytnění, které způsobuje řadu somatických potíží a v pokročilém stádiu může vést až ke smrti.

Na vzniku aortální stenózy se podílí více než 20 různých příčin, např. histokompatibilní antigen B27 či vzácně Fabryho či Pagetova choroba³. Dále pak poruchy lipidového spektra^{4–7}, hromadění vitamínu K v organismu⁸, patogenetické mechanismy kalcifikace cév (např. hyperparatyreóza, hyperfosfatémie, hyperkalcémie). Vitamin K může hrát klíčovou roli, protože podporuje přetváření zbytků kyseliny glutamové na biologicky aktivní gama-karboxyglutamovou matrix kyselinu, karboxylovaný matrix Gla protein (cMGP) a karboxylovaný kostní Gla protein (cBGP). MGP inhibuje cévní kalcifikace, zatímco cBGP má důležitou roli pro správnou mineralizaci kostí⁹. V neposlední řadě je zde také hypotéza, že se na minerali-

zaci srdečních chlopní podílí nadměrný přísun fluoru a fluoridů. Nejčastěji se fluor a jeho sloučeniny dostávají do lidského organismu konzumací léků obsahujících fluor a také z okolního prostředí, kam se dostává uměle nejen fluoridací vody¹⁰, potravin, zubních past, ale také díky zemědělské produkci a neustále se zvyšujícím množstvím používaných minerálních hnojiv¹¹. Fluor se takto dostává do potravních řetězců a tím se postupně zvyšuje jeho koncentrace v organismech (konzumentů II. řádu). Jeho negativní vliv, který na lidský organismus působí již od doby oplození až po stárnutí, od transkripce genů až po kognitivní procesy, popisuje v literatuře A. Strunecká a J. Paťočka¹².

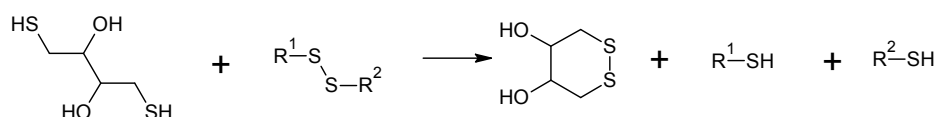
Při výzkumu vzniku aortální stenózy byly použity např. imunohistochemické analýzy¹³ či gelová elektroforéza¹⁴, které byly ale časově náročné a pomocí kterých nebylo možné identifikovat neznámé proteiny. V naší laboratoři byla v nedávné době aplikována metoda peptidového mapování spojená s hmotnostní spektrometrií na pevné nerozpustné vzorky kostí¹⁵, barevné vrstvy uměleckých děl¹⁶ nebo historické malty^{17,18}. Výhoda této metody oproti výše uvedeným spočívá v tom, že vzorky před analýzou není potřeba rozpouštět – demineralizovat, nebo jakkoli jinak upravovat a zároveň tato metoda umožňuje identifikaci neznámých proteinů. Proto byla zvolena k výzkumu chlopní tkáň postížená aortální stenózou¹⁹.

Metoda peptidového mapování může zejména poskytnout odpověď na otázku, jaká je role jednotlivých proteinů v procesu geneze mineralizátů v chlopní tkáni. Znalosti mechanismu jejich tvorby mohou napomoci předcházet vzniku onemocnění a také při volbě vhodné medikace pro zmírnění jeho průběhu. V rámci této práce byly analyzovány a identifikovány proteiny v explantovaných fosfatovaných chlopních metodou peptidového mapování. V některých vzorcích se podařilo nalézt proteiny, jejichž výskyt má souvislost s procesem fosfatace a tvorbou kostí.

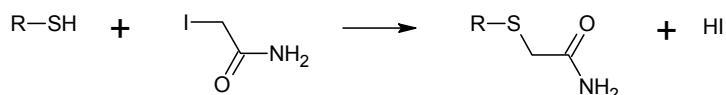
Experimentální část

Vzorky dvaceti aortálních chlopní poskytla Chirurgická klinika Fakultní nemocnice v Plzni. Chlopně byly explantovány postiženým pacientům, omyty destilovanou vodou a uskladněny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. U vzorků byla rozdílná stadia tvorby mineralizátů, jejichž majoritní složkou jsou sloučeniny fosforu²⁰.

Pro zjištění vhodných podmínek (úprava vzorků, zjištění nejvhodnější délky doby pro štěpení vzorků trypsinem) k získání co největšího počtu proteinů vyskytujících se ve vzorku byly vzorky chlopních tkání rozděleny do dvou skupin¹⁴. První skupina vzorků byla podrobena redukci disulfidických můstků a alkylovaní SH-skupin. Druhá skupina vzorků byla podrobena enzymovému štěpení bez jakýchkoli úprav.



Rovnice 1. Redukce disulfidových vazeb pomocí dithiotreitolu

Rovnice 2. Reakce jodacetamidu s thiolovou skupinou²¹

U první skupiny vzorků bylo nutno zpřístupnit peptidové vazby proteolytickému štěpení. Pomocí dithiotreitolu (60 μl dithiotreitolu na cca 10 mg vzorku chlopenní tkáně) byla přerušena terciární a kvartérní struktura proteinů a to redukcí disulfidových vazeb mezi fragmenty spojenými disulfidovými můstky (rovnice 1). Takto zpracovaný vzorek byl vložen na dobu 1 h do termostatu s teplotou 50 °C.

Poté, co byly disulfidové vazby redukovány, byl roztok dithiotreitolu ochlazen na laboratorní teplotu a bylo přidáno 60 μl roztoku jodacetamidu (rovnice 2), a to z důvodu zabránění možné reoxidaci vzorku vzdušným kyslíkem. Reakce probíhala ve tmě za laboratorní teploty po dobu jedné hodiny.

K takto ošetřeným vzorkům byl přidán štěpící roztok trypsinu (1 μl roztoku trypsinu o koncentraci 1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ v 50 μl 50mM NH_4HCO_3 pufru) o objemu 60 μl . Štěpení probíhalo při laboratorní teplotě (24 °C) po dobu 0,5; 1; 2; 4 a 12 hodin. Ke vzorkům, u kterých nebyly provedeny žádné úpravy, byl přidán štěpící roztok trypsinu o stejném objemu a koncentraci, jako v případě vzorků první skupiny. Stejně tak byla shodná teplota i časové intervaly štěpení.

Vzniklé peptidové směsi byly přečištěny a zkoncentrovány reverzní fází ZipTip a ponechány vyschnout. Připravené vzorky mineralizovaných chlopní z obou skupin byly poté analyzovány metodou LC-MS/MS a měření probíhalo s použitím UPLC Acquity systému (Ultra Performance Liquid Chromatography – ultraúčinná kapalinová chromatografie) spojeného s mikrotandemovým hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF (Waters, UK). Proteiny byly identifikovány softwarem PLGS 2.3 (Waters, UK) a vyhledány v proteinové databázi Uniprot.

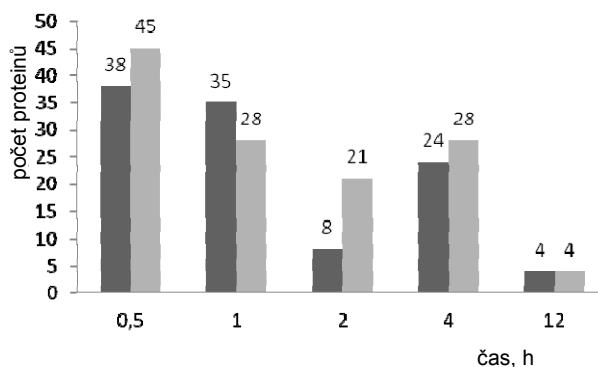
Za použití UHPLC Dionex Ultimate3000 RSLC nano (Dionex, Germany) spojeného s hmotnostním spektrometrem ESI-Q-TOF Maxis Impact (Bruker Daltonics, Germany) byly v laboratoři aplikované proteomiky na VŠCHT v Praze analyzovány vzorky přímo štěpené trypsinem. Výčet hodnot m/z byl ze změřených dat extrahován programem Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics, Germany) a dále pak identifikovány softwarem Mascot verze 2.2.04 (Matrix Science, UK) a vyhledány v proteinové databázi Uniprot verze 2010-12 s přesností 50 ppm v MS modu a MS/MS s přesností přiřazení hmotností peptidových štěpů 0,05 Da.

Výsledky a diskuse

Dva různé postupy štěpení byly zvoleny z důvodu porovnání a analyzování co největšího počtu proteinů ve vzorcích. Vzhledem k tomu, že počet nalezených proteinů bez použití redukce a alkylace ku počtu proteinů identifikovaných postupem obsahujícím tento krok byl v průměru 30:20, bylo pro další experimenty zvoleno štěpení pouze trypsinem bez dalších úprav vzorků (obr. 1, 2) (cit. ¹⁴).

Pro vyhodnocení závislosti doby štěpení vzorků trypsinem bylo kritériem získání co největšího množství identifikovaných proteinů. Byl brán v úvahu poměr všech identifikovaných proteinů k množství identifikovaných proteinů rozpustných v krvi, přičemž byl hledán co nejvyšší počet nerozpustných proteinů (obr. 1, 2) (cit. ¹⁴).

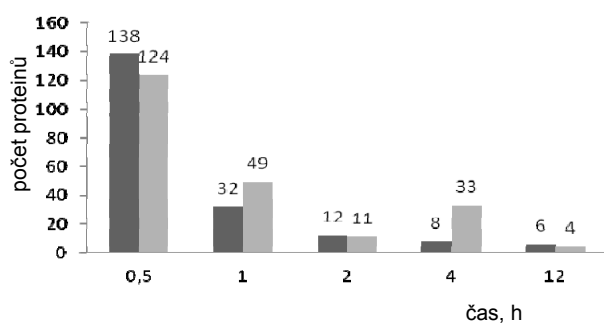
Pro další postup zpracování chlopní byla zvolena čtyřhodinová doba štěpení trypsinem bez použití redukce a alkylace.



Obr. 1. Počty nalezených proteinů v chlopní 1 s použitím redukce disulfidických můstků a alkylace SH-skupin (RA) ■ a bez použití redukce a alkylace (bez RA) ■ v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4 a 12 hodin

Tabulka I
Nejčastěji nalezené proteiny v biomineralizovaných chlopních

Protein	Funkce
Alkalická fosfatasa	role v procesu mineralizace
Asporin	vazba vápníku, biomineralizační osteoblastní aktivita
Biglykan	shromažďování kolagenových vláken
Dekoron	součástí pojivové tkáně
Fibromodulin	fibrinogeneze
Filamin A	protein vážící aktin
Galektin	může regulovat apoptózu a buněčnou proliferaci a diferenciaci
Gelsolin	regulátor vápníku, shromažďování monomer do vláken
Laminin	migrace a organizace buněk do tkání během embryonálního vývoje v interakci s jinými složkami extracelulární matrice
Lumikan	vazba na laminin
Mimekan	indukuje tvorbu kostní hmoty ve spojení s TGF-beta-1 nebo TGF-beta-2
Osteopontin	vazba na hydroxyapatit
Periostin	váže se na heparin, indukuje buněčnou adhezi, pravděpodobně hraje roli v extracelulární mineralizaci tkání
Periostin osteoblast (specifický faktor)	adheze preosteoblastů a pravděpodobně je zahrnut také do získávání osteoblastů, jejich připojení a rozšiřování
Proteoglykan 4	ukládání synoviálních tekutin v chrupkách, inhibice a růst chrupavky
Sérový albumin	hlavní protein plazmy, dobře se váže s Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , mastnými kys., hormony, léky, bilirubinem; regulátor osmotického tlaku krve
Serpin	specificky se váže na kolagen



Obr. 2. Počty nalezených proteinů v chlopni 1 s použitím redukce disulfidickým můstků a alkylace SH-skupin (RA) ■ a bez použití redukce a alkylace (bez RA) ■ v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4 a 12 hodin

Závěr

Metodou peptidového mapování, která byla aplikována přímo na fosfatované části chlopni, bylo hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS nalezeno přibližně 200 různých proteinů. Převážně se jednalo o proteiny rozpustné v krvi, např. komplement C3, sérový albumin, apolipoprotein A-I, vitronektin a klusterin, které byly přítomné ve všech analy-

zovaných chlopních. Podařilo se ovšem identifikovat i proteiny, které pravděpodobně přímo souvisejí s mineralizací chlopni např. alkalickou fosfatasa, biglykan, mimekan, osteopontin, proteoglykan a periostin. V tab. I jsou uvedeny některé z nejvýznamnějších proteinů spolu s jejich funkcí v organismu.

V případě nálezu většího výskytu osteopontinu a alkalické fosfatasy, jakožto faktorů podporujícího růst kostí, lze polemizovat o možnosti vzniku fosfatátů v aortálních chlopních stejným procesem jako je růst kostí. Kvantifikace zmíněných proteinů je předmětem dalšího výzkumu.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21/2012).

Poděkování p. Mgr. Peteru Konikovi (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích) za analýzu zpracovaných vzorků.

LITERATURA

1. Čerbák R.: Interv. Akut. Kardiol. 4, 203 (2005).
2. Šteiner I., Krbal L., Dominik J.: Čes.-Slov. Patol. 46, 33 (2010).
3. Rajamannan N. M.: Expert. Rev. Cardiovasc. Ther. 2, 845 (2004).
4. Rosenhek R., Rader F., Loho N.: Circulation 110,

- 1291 (2004).
5. Antonini Canterin F., Popescu B. A., Huang G.: *Ital. Heart J.* 6, 119 (2005).
 6. Borer J. S.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 476 (2005).
 7. Peltier M., Enriquez-Sarano M., Slama M., Tribouilloy Ch.: *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 97, 327 (2004).
 8. Fusaro M., Crepaldi G., Maggi S., Galli F., D'Angelo A., Calo L., Giannini S., Miozzo D., Gallieni M.: *J. Endocrinol. Invest.* 34, 317 (2011).
 9. Theuwissen E., Smit E., Vermeer C.: *Adv. Nutr.* 3, 166 (2012).
 10. Brázda O.: *Medical Tribune* 12, C7 (2008).
 11. Strunecká A., Patočka J., Limeback H.: *Klinická farmakologie a farmacie.* 19, 49 (2005).
 12. Strunecká A., Patočka J., v knize: *Structure and Bonding. New Developments in Biological Aluminum Chemistry – Book 2.* (Atwood D., Roesky C., ed.), str. 139. Springer-Verlag, Berlin 2003.
 13. Lehmann S., Walther T., Kempfert J., Rastan J. A., Garbage Dhein S., Mohr F. W.: *Ann. Thorax. Surg.* 88, 1476 (2009).
 14. Kadena J., Dempfle C. E., Grobholza R., Fischera C. S., Vockea D. C., Kılıça R., Sarikoça A., Piñola R., Hagla S., Langa S., Brueckmanna M., Borggreffea M.: *Cardiovasc. Pathol.* 14, 80 (2005).
 15. Hynek R., Kuckova S., Konik P., Prchlikova R., Kodicek M.: *J. Surf. Anal.* 17, 310 (2011).
 16. Hynek R., Kuckova S., Hradilova J., Kodicek M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1896 (2004).
 17. Kuckova S., Crhova M., Vankova L., Hnizda A., Hynek R., Kodicek M.: *Int. J. Mass Spectrom.* 284, 42 (2009).
 18. Kuckova S., Hynek R., Kodicek M.: *J. Cultural Heritage* 10, 244 (2009).
 19. Velčovská M.: *Bakalářská práce.* VŠCHT, Praha 2011.
 20. Zeman A., Šmíd M., Kučková Š., Hájek T., Rokyta R.: *GEOMED 2011 – 4th international conference on medical geology 20.-25.9.2011 Bari, Italy.* (bez editora) str. 267.
 21. http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/exercise_01.pdf, staženo 10.5. 2011.

L. Coufalová^a, Š. Kučková^{a,b}, A. Zeman^c, M. Šmíd^d, M. Velčovská^a, and R. Hynek^a (^a Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Department of Teaching and Didactics of Chemistry, Charles University, Prague, ^c Institute of Theoretical and Applied Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ^d Cardiology Unit, University Hospital, Plzeň): **Biom mineralization of Aortic Valves**

Aortic stenosis is one of the most common heart diseases that occur in developed countries. The disease has many causes; among the most discussed is excessive intake of fluorides. The aim of our work is to clarify the biochemical nature of biom mineralizations in cardiac tissue as well as to select an appropriate medication and to mitigate the disease. Peptide mapping combined with UHPLC and MS were used in the study of the mineralized cardiac tissue. We managed to identify proteins such as alkaline phosphatase, biglycan, mimecan, osteopontin, periostin and proteoglycan, which are probably related to mineralization of the valves.