

SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA DE UN PÉPTIDO FLUORESCEINADO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE PROTEASAS

Osvaldo Reyes, Ignacio Figueroa, Hilda E Garay, Luis J González y Luis J Cruz

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. División de Química-Física
Apartado 6162, C. de la Habana, Cuba.

ABSTRACT

Modified peptides with some fluorophores have been widely used in molecular biology. To modify a peptide with fluorescein, the coupling is achieved with some derivatives, such as 5-fluorescein isothiocyanate, 4-(iodoacetamido) fluorescein, 5-carboxyfluorescein succinimidyl ester, etc. Nevertheless, the labeling with fluorescein in solid phase is not reported. In this paper the labeling of a peptide with fluorescein, using TBTU strategy in solid phase is presented. The labeled peptide is applied to the protease contaminant determination. In this case we used trypsin as model enzyme. Different protease solutions were incubated four hours with 3 µg of labeled peptide. The analysis was performed by 0.8 % agarose gel electrophoresis in five minutes of run time and 10 pg of protease were detected.

Key words: peptide synthesis, solid phase synthesis, fluorescein, modified peptides, protease contaminant determination

Biotecnología Aplicada 1996;101-104

RESUMEN

Los péptidos derivatizados con agentes fluoróforos han encontrado un amplio uso en los métodos de la biología molecular. Para modificar un péptido con fluoresceína, el acoplamiento a la secuencia peptídica se realiza generalmente en solución con derivados de esta sustancia, como son: el 5-isotiocianato de fluoresceína, la 4-iodoacetamidofluoresceína, el 5-succinimidil éster de carboxifluoresceína, entre otros. Sin embargo, no se ha reportado el marcaje con este fluoróforo utilizando las estrategias de acoplamiento de la síntesis en fase sólida. En este trabajo se presenta la derivatización de un péptido con fluoresceína libre mediante la estrategia de activación con TBTU en fase sólida. El péptido marcado se aplica a la determinación de bajos niveles de actividad proteolítica en una muestra de tripsina. Diferentes cantidades de tripsina se incubaron con 3 µg del péptido marcado durante cuatro horas. El análisis se realizó por electroforesis en un gel de agarosa 0,8 % con cinco minutos de corrida y se detectaron 10 pg de la proteasa.

Palabras claves: síntesis de péptidos, síntesis en fase sólida, fluoresceína, péptidos modificados, determinación de proteasas contaminantes

Introducción

Las diferentes modificaciones químicas de los grupos de las cadenas laterales de un péptido sintético han diversificado la aplicación en la bioquímica y la biotecnología de estas moléculas. Especial interés se le comenzó a prestar recientemente al marcaje de péptidos con moléculas coloreadas o agentes fluoróforos. Esto se debe al empleo que han encontrado estos derivados peptídicos en los estudios cinéticos y de mecanismos bioquímicos (1, 2), en algunas técnicas de cromatografía (3, 4), en nuevos métodos para el estudio de sustratos peptídicos (5) y en la determinación de proteasas (6).

En la síntesis en fase sólida es conveniente utilizar marcadores coloreados que contengan un grupo -COOH o un -SH para que el acoplamiento se pueda realizar antes de la desprotección final del péptido. Esto permite introducir las moléculas del colorante en posiciones específicas, como el grupo amino terminal, el grupo ε-amino de la lisina o el grupo-SH de la cisteína, mediante reacciones selectivas. Acoplar el colorante a otro grupo funcional

de la secuencia (al carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico, al hidroxilo de la serina y la treonina, al amino de la arginina, etc.) haría muy difícil la síntesis. La limitante fundamental es que no se han encontrado protecciones temporales para estos grupos, que puedan ser eliminadas sin afectar los grupos protectores de las cadenas laterales restantes.

La eficiencia necesaria para el acoplamiento de los aminoácidos durante la síntesis de un péptido se asegura con una gran variedad de compuestos con procedimientos establecidos (7- 11). Entre los más utilizados están la 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y la 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIC). Estos activadores generan subproductos poco solubles; pero su empleo es sencillo y poco costoso. Cuando se emplea el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) con DCC o DIC, el intermediario que resulta es mucho más reactivo que en los casos anteriores. Existen otras vías de activación del grupo carboxilo, como por ejemplo las sales de derivados del benzotriazol: el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris (dimetilamino) fosfonio

1. Kwon G, Remmers AE, Datta S and Neubig RR. Synthesis and characterization of fluorescently labeled bovine brain G protein subunits. *Biochemistry* 1993;32:2401-2408.

2. Permiakov EA, Medvedkin VN, Klimenko LV, Milin YV and Permiakov SE. Kinetics of peptide synthesis studied by fluorescence of fluorophenyl esters. *Int J Peptide Protein Res* 1994;44:472-476.

3. Ball HL. Purification of synthetic peptides using reversible chromatographic probes based on the Fmoc molecule. *Int J Peptide Protein Res* 1992;40:370-379.

4. Jakob K, Veenma L, Venema K and Wolf JH. Automated precolumn fluorescence labeling by carbodiimide activation of N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate applied to an HPLC brain tissue analysis. *Analytical Biochemistry* 1991;196:350-355.

5. Dunn BM, Scarborough PE, Davenport R and Swietnicki W. Analysis of proteinase specificity by studies of peptide substrates. En: *Methods in Molecular Biology. Peptide Synthesis Protocols*. Eds. Pennington MW and Dunn BM 1994;35:225-243.

✉ Autor de correspondencia.

(BOP), el hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y el hexafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) (12-14). Este tipo de activación del grupo carboxilo incrementa los rendimientos de las reacciones, pues resuelve los problemas con la solubilidad de los intermediarios por ser sales iónicas. Además, estos intermediarios son más reactivos.

Sin embargo, para derivatizar un péptido con fluoresceína no se reportan tales procedimientos. En el marcaje químico con este fluoróforo, el acoplamiento se realiza por el grupo amino terminal, el grupo ϵ -amino de la lisina o por el grupo sulfhidrido de la cisteína con derivados de esta sustancia, como el 5-isotiocianato de fluoresceína (1, 15), la 4-iodoacetamido fluoresceína (1), el 5-succinimidil éster de carboxifluoresceína (16), entre otros. Estas moléculas son difíciles de obtener, por lo que el costo de su utilización en una síntesis química es relativamente elevado.

El objetivo de este trabajo fue la derivatización de un péptido con fluoresceína libre, por el grupo ϵ -amino de una lisina, mediante la síntesis en fase sólida. Se presenta también la aplicación de este péptido modificado a la determinación cualitativa, por electroforesis en geles de agarosa, de la actividad proteolítica en una muestra de tripsina.

Materiales y Métodos

Diseño del péptido

Se eligió un péptido con la siguiente secuencia:

Secuencia	Código
Ac-K(-flu)PLSRTLVAAK-NH ₂	p1f

Esta secuencia contiene los sitios de cortes de varias proteasas (17), entre las que se encuentra la tripsina. Esta proteasa fue la escogida como modelo para los ensayos de determinación de actividad proteolítica con el péptido marcado como sustrato. Para disminuir los problemas de impedimentos estéricos de la reacción del grupo carboxilo de la fluoresceína, se escogió el acoplamiento de la molécula del fluoróforo por el grupo ϵ -amino de la lisina. El grupo amino terminal se acetila previamente.

Síntesis del péptido

El péptido se sintetizó por el método en fase sólida, siguiendo la estrategia Boc- en bolsas de polipropileno (Biotech. Instruments, USA) (18). Se utilizaron 100 mg de la resina 4-metilbencilhidrilamina (MBHA) (100-200 mesh, 1-1,2 mmol/g, Fluka, Suiza). Los aminoácidos protegidos con el grupo Boc-

(BACHEM, Suiza) se utilizaron a una concentración de 0,2 mol/L. Todos los solventes (diclorometano, 2-propanol, N,N'-dimetilformamida) y los reactivos empleados (N-etildiisopropilamina, ácido trifluoroacético, p-cresol, anisol, dimetilsulfuro) fueron puros para síntesis (Merck, Alemania) y se utilizaron sin ningún tratamiento previo.

Las reacciones de acoplamiento se realizaron por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido con cantidades equivalentes de DIC 0,2 mol/L en diclorometano (DCM). La eficiencia del acoplamiento de los aminoácidos protegidos se verificó con ayuda del ensayo de ninhidrina. En la síntesis se utilizó la Boc-Lys(Fmoc)-OH (BACHEM, Suiza) en la posición amino terminal del péptido, para la derivatización por el grupo de la cadena lateral de este residuo. La eliminación de la protección temporal (Boc-), incluyendo la del NH₂-terminal, se realizó por un tratamiento con ácido trifluoroacético al 37,5 % en DCM. En la acetilación del amino terminal del péptido se utilizó ácido acético 0,2 mol/L en DCM siguiendo la metodología de acoplamiento de activación con DIC.

Para la reacción selectiva de la fluoresceína por el grupo ϵ -amino de la lisina en la posición NH₂-terminal, se requirió la eliminación del grupo protector (Fmoc-) con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida durante 30 min. El acoplamiento selectivo se realizó por la vía de activación con TBTU según se describe en (10) (aminoácido/ TBTU/HOBT/N-etildiisopropilamina), con la diferencia de que se adiciona fluoresceína en vez de un residuo aminoácido (fluoresceína/ TBTU/ HOBT/N-etildiisopropilamina). El TBTU y el HOBT se adicionaron equivalente a equivalente con respecto a la fluoresceína, mientras que de la N-etildiisopropilamina se utilizaron tres equivalentes. Todas las soluciones se prepararon 0,2 mol/L en DCM, excepto la de N-etildiisopropilamina (0,6 mol/L). El completamiento de la reacción se verificó por el ensayo de ninhidrina. El tiempo de reacción fue de ocho horas.

El procedimiento empleado para la desprotección final fue el conocido como "Low-High HF". Para este fin se utilizó HF (fluoruro de hidrógeno) puro para análisis (Fluka, Suiza) con las mezclas correspondientes de agentes nucleofílicos (19). Posteriormente la bolsa se lavó con éter dietílico y se secó al vacío. Al producto final crudo se le realizó la extracción del péptido con ácido acético al 30 %. El extracto final se diluyó con agua y se liofilizó.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El péptido fue analizado por HPLC (LKB, Pharmacia) con una columna RP C18 VYDAC (4,6 x 100 mm). Se utilizó un gradiente de 5-60 % de acetonitrilo (0,05 % de TFA) en agua (0,1 % de TFA) en 30 min. La purificación se realizó con un gradiente similar en una columna RP C18 VYDAC (10 x 250

6. White D, Stevens J and Shults J. *Pep-Tag Protease Assay: A simple and rapid method for the detection of very low amounts of protease*. *Promega Notes* 1993;44:2-5.

7. Bodansky M. In search of new methods in peptide synthesis. *Int J Pept Res* 1985;25:449-474.

8. Hudson D. Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. Comparison of different coupling procedures. *J Org Chem* 1988;53:617-624.

9. Thaler A, Seebach D and Cardenau F. Conditions for the use of lithium salts in couplings reactions. *Helvetica Chimica Acta* 1991;74:617-627.

10. Pennington MW and Byrnes ME. Procedures to improve difficult couplings. En: *Methods in Molecular Biology. Peptide Synthesis Protocols*. Eds. Pennington MW and Dunn BM 1994;35:1-16.

11. Bodansky M. *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. GDR 1984.

12. Castro B, Dormoy JR, Ervin G and Selvy C. Peptide coupling reactions with BOP. *Tet Lett* 1975;14:1219-1222.

13. Fields CG, Lloyd DH, McDonald RL, Otteson KM and Noble RL. HBTU activation for automated solid-phase peptide synthesis. *Peptide Res* 1991; 4:95-101.

14. Knorr R, Trezciak A, Bannwarth W and Gillissen D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tet Lett* 1988;30:1269-1272.

15. Mann KG and Fish WW. H Protein labeling for gel chromatography. *Methods in Enzymology* 1972;26:28.

16. Vigers GP. Preparation of fluorescent derivatives of tubulin. *J Cell Biol* 1988;107:1011.

17. Promega. Technical Bulletin No. 185. Instructions for use of product V5880 1994.

18. Houghten RA. Simultaneous multiple peptide synthesis: The rapid preparation of large numbers of discrete peptides for biological, immunological and methodological studies. *BioTechniques* 1986;4:522-526.

19. Applied Biosystems. *Introduction to Cleavage Techniques* 1990.

mm). El péptido derivatizado se detectó a una longitud de onda de 226 nm.

Espectrometría de masas

El espectro de masas se obtuvo en un equipo de doble sector (JEOL HX-110HF). La fuente de ionización fue un cañón FABMS-FAB11. Se utilizó xenón ultrapuro como gas de bombardeo.

Determinación cualitativa de la actividad proteolítica por electroforesis

Para la determinación de la actividad proteolítica se incubaron varias muestras con diferentes cantidades de tripsina (1 ng; 0,5 ng; 0,1 ng; 0,05 ng y 0,01 ng) y 3 µg del péptido marcado. El tiempo de incubación fue de cuatro horas a temperatura ambiente. El volumen total de cada muestra fue de 20 µL. Las corridas electroforéticas se realizaron en geles de agarosa al 0,8 % bajo una diferencia de potencial de 100 V en cinco min. Como buffer de corrida se empleó Tris-HCl a una concentración de 50 mmol/L con pH = 8. Las bandas electroforéticas se detectaron en una lámpara UV de 265 nm de longitud de onda.

Resultados y Discusión

Síntesis del péptido derivatizado con fluoresceína

El acoplamiento del colorante inicialmente se realizó por la vía de activación con DIC y posteriormente en la presencia de HOBt. El ensayo de ninhidrina en ambos casos demostró una elevada presencia de grupos aminos libres y por tanto, el rendimiento del acoplamiento fue muy bajo. Esto podría explicarse si se tiene en cuenta que el grupo carboxilo de la fluoresceína está impedido estéricamente. Además, es conocido (20) que esta molécula puede estar formando un ciclo que incluye al grupo carboxilo. Por esta razón es posible que esté poco accesible a una activación.

Debido a la baja reactividad del grupo carboxilo de la fluoresceína, para lograr su acoplamiento se recurrió a la vía de activación con TBTU. Con este agente es mucho más fuerte la activación del grupo carboxilo y por tanto el intermediario que se forma es significativamente más reactivo. El completamiento de la reacción se estimó en más de un 95 %, según los resultados del ensayo de ninhidrina.

En la Figura 1 se presenta el cromatograma del péptido p1f (producto crudo de la síntesis) detectado a 226 nm de longitud de onda. El péptido se purificó y el pico principal se analizó por espectrometría de masas. Del resultado del análisis por bombardeo con átomos rápidos se demostró que la relación M/Z calculada (igual a 1 626,1) se correspondió con la señal pseudomolecular M + 1 (M/Z experimental igual a 1 626,1).

Determinación cualitativa de actividad proteolítica con el péptido fluoresceinado en una muestra modelo

El análisis cualitativo se basa en el seguimiento por electroforesis de la proteólisis de un péptido sintético. Este al ser degradado modifica su carga y longitud, por lo que su desplazamiento en un gel de agarosa en condiciones preestablecidas, será diferente. Las bandas son detectadas por la coloración (o fluorescencia) del marcador acoplado al péptido. En dependencia de la secuencia específica del corte de la proteasa, puede diseñarse un péptido para cada contaminante de este tipo. También existe la posibilidad de que una secuencia diseñada sea capaz de de-

20. Indicadores, papeles indicadores y reactivos. Productos químicos para el laboratorio y la planta de fabricación. Riedel de Haën.

Figura 1. Cromatograma del péptido p1f derivatizado con fluoresceína. Se utilizó una columna de fase reversa C18 VY-DAC (4,6 x 100 mm) con un gradiente de 5-60 % de acetonitrilo (0,05 % de TFA) en agua (0,1 % de TFA) en 30 min. El péptido derivatizado se detectó a una longitud de onda de 226 nm.

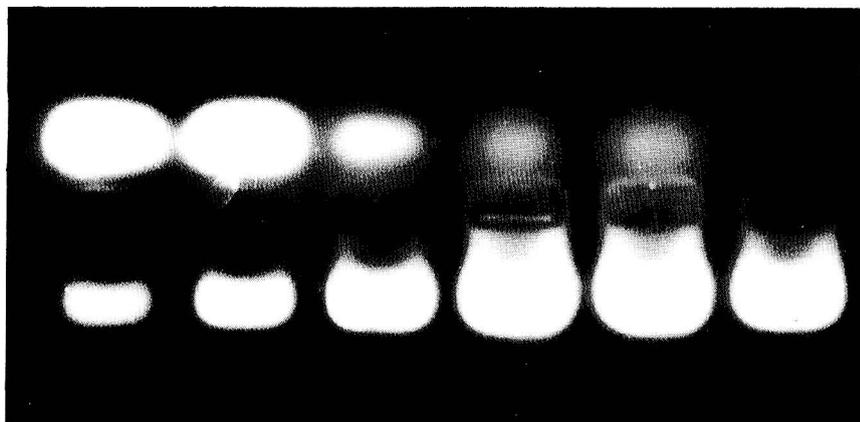
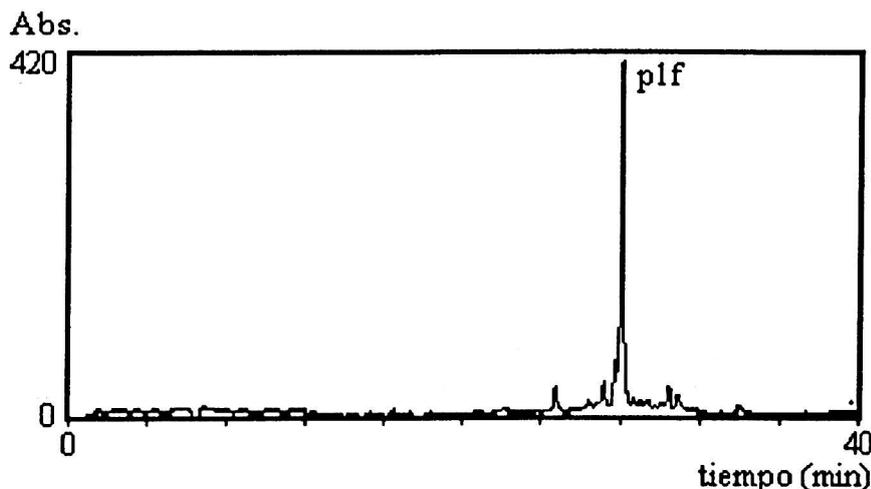


Figura 2. Determinación cualitativa de la presencia de tripsina en una muestra modelo. En un volumen de 20 µL se incubaron cantidades diferentes de tripsina con 3 µg/muestra del péptido marcado. El tiempo de incubación fue de cuatro horas a temperatura ambiente. Para la detección de la migración electroforética de las bandas fueron suficientes 5 min bajo una diferencia de potencial de 100 V. Como control negativo se utilizó el péptido incubado en el buffer 50 mmol/L de Tris.HCl. El péptido intacto está representado por F y el fragmento F1 es el subproducto marcado de la proteólisis.

terminar dos tipos de proteasas. Lo planteado anteriormente demuestra la versatilidad del método.

El péptido intacto tiene carga +1, ya que la fluoresceína en solución a pH 8,0 está cargada negativamente y el grupo carboxilo terminal está en forma de amida. Por lo tanto la molécula intacta debe migrar hacia el cátodo. De acuerdo a las características del corte de la tripsina (en el grupo carboxilo terminal de K o R), el resultado de la proteólisis del péptido marcado debe ser el siguiente:

- *péptido intacto: Ac-K(flu)PLSRTLVAAK-NH₂*
- *carga total: +1*
- *fragmento F1: Ac - K(flu)PLSR - COOH*
- *carga total: -1*

Los resultados de la determinación para cuatro horas de incubación se muestran en la Figura 2.

El fragmento F1 resultante de la proteólisis migra hacia el ánodo. La intensidad de la banda del fragmento F1 depende de la cantidad de proteasa presente en las condiciones establecidas de reacción. Por otra parte, mientras que el proceso de la proteólisis no sea completo, deben aparecer las bandas del péptido intacto. Para detectar niveles de contaminación por debajo de los 10 pg de proteasa, la reacción de incubación debe extenderse a mayores tiempos.

La muestra que contiene 1 ng de tripsina funciona como control positivo, ya que la degradación proteolítica de la cantidad del péptido aplicada es prácticamente completa. El control negativo es una incubación del buffer con el péptido sin tripsina.

La metodología de la utilización de un péptido derivatizado con fluoresceína para el estudio de la actividad proteolítica en una muestra modelo de tripsina es aplicable a soluciones y a liofilizados.

Este tipo de análisis es útil tanto para la determinación cualitativa de los niveles de contaminación como para establecer los requerimientos de almaceñaje y conservación de diferentes preparados. Los resultados del diseño de nuevos péptidos marcados y la aplicación al estudio de muestras proteínicas de algunos de los procesos más importantes de nuestro centro, se encuentran en preparación para una próxima publicación.

Conclusiones

Con el empleo del TBTU como agente activador del grupo carboxilo de la fluoresceína libre, se logró acoplar este fluoróforo al péptido en fase sólida. Según los resultados del ensayo de ninhidrina, el análisis por RP HPLC y espectrometría de masas, el acoplamiento en fase sólida se efectúa de manera eficiente similar a cualquier residuo aminoacídico que se emplea en la síntesis de péptidos. Esto último constituye la ventaja fundamental sobre los demás métodos de obtención de péptidos derivatizados con fluoresceína.

Se demostró la utilidad del péptido marcado en la determinación cualitativa de la presencia de una proteasa contaminante. Se detectaron por la metodología presentada hasta 10 pg de tripsina en cuatro horas de incubación con 3 µg del péptido derivatizado.

Agradecimientos

Agradecemos la ayuda muy profesional del Sr. Jesús Seoany en los detalles precisos de la fotografía y la atención especial de la Dra. Lila Castellanos en la revisión de este artículo.