

Sarah De Schepper

Professionele Bachelor Biomedische laboratoriumtechnologie

afstudeerrichting Farmaceutische en biologische laboratoriumtechnologie

Academiejaar 2009-2010

Screening op bioactieve peptiden met CCK1-receptoractiviteit als hulpmiddel in de strijd tegen obesitas

UGENT-FACULTEIT BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

Vakgroep Gewasbescherming - Laboratorium Agrozoölogie

Vakgroep Voedselveiligheid en Voedselkwaliteit - Laboratorium Levensmiddelenchemie en Humane Voeding

Coupure Links 653 - 9000 GENT

STAGEGEGEVENS

Stageperiode:	08 februari 2010 t/m 11 juni 2010
Stageplaats:	Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen Vakgroep Gewasbescherming Laboratorium Agrozoölogie & Vakgroep Voedselveiligheid en Voedselkwaliteit Laboratorium Levensmiddelenchemie en Humane Voeding Coupure Links 653, 9000 Gent Tel.: 09/264.61.50 Fax: 09/264.62.39 e-mail: guy.smagghe@ugent.be e-mail: John.VanCamp@UGent.Be
Stageleiding:	ir. Dorien Staljanssens – Prof. Dr. ir. Guy Smagghe – Prof. Dr. ir. John Van Camp
Stagementor:	Dr. Apr. Geert Vergote

SAMENVATTING

Screening op bioactieve peptiden met CCK1-receptoractiviteit als hulpmiddel in de strijd tegen obesitas

Trefwoorden: obesitas, cholecystokinine (CCK), bioactieve peptiden, CCK-receptor

Obesitas of zwaarlijvigheid is een ziekte die in onze Westerse samenleving, maar ook in verschillende ontwikkelingslanden steeds meer voorkomt door overtollige voedselinname en vaak gepaard gaat met hart- en vaatziekten en type 2 diabetes. Uit een aantal studies is bekend dat obesitas geassocieerd is met veranderingen in de concentraties en regulatie van darmhormonen. Uit onderzoek is reeds gebleken dat het neuropeptide cholecystokinine (CCK) een belangrijke rol speelt bij de coördinatie van het gastro-intestinaal stelsel en dat het de omvang van een maaltijd kan beïnvloeden. De werking van CCK kan in eerste instantie beïnvloed worden door de CCK-vrijstelling uit entero-endocriene cellen te stimuleren en in de tweede plaats kan een agonistische of antagonistische ligand rechtstreeks binden op de CCK-receptor en zo een invloed uitoefenen. CCK-receptor liganden zouden dus potentiële therapeutische toepassingen kunnen hebben en peptiden met CCK1-receptoractiviteit zouden gebruikt kunnen worden om sneller een verzadigingsgevoel te induceren. In dit onderzoek wordt gezocht naar specifieke hydrolysaten uit voedingseiwitten of bioactieve peptiden die kunnen binden op cellen met een CCK1-receptor en op die manier dezelfde fysiologische effecten uitlokken als het natuurlijk ligand CCK. In de toekomst zouden dan functionele voedingsmiddelen voor de (preventieve) behandeling van obesitas en eventueel geassocieerde aandoeningen kunnen ontwikkeld worden.

Tijdens dit onderzoek werd in de eerste plaats gebruik gemaakt van opgezuiverde eiwitten (glycinine en β -conglycinine) die bekomen werden na fractionatie van soja-eiwit en van wei-eiwitten uit melk (runderserumalbumine, α -lactalbumine en β -lactoglobuline). Bioactieve peptiden werden na een enzymatische hydrolysereactie vrijgesteld en met behulp van SDS-PAGE werd gecontroleerd of de opzuivering van de eiwitten goed gebeurd was. Aan de hand van de CCK-receptoractivitetest werd dan onderzocht of de geïsoleerde en geïdentificeerde eiwithydrolysaten specifiek inwerkten op de CCK1-receptor. Tijdens het experiment werd gebruik gemaakt van een “chinese hamster ovary” cellijn die functioneel de rat CCK1-receptor tot expressie bracht en van een CHO-K1 cellijn die fungeerde als negatieve controle.

Uit de bekomen resultaten kon vastgesteld worden dat de geteste eiwithydrolysaten niet specifiek de CCK1-receptor activeerden, maar vermoedelijk ook andere receptoren die door CHO-cellen tot expressie worden gebracht.

Verder onderzoek zal dus moeten uitwijzen op welke manier eiwithydrolysaten specifiek de CCK1-receptor kunnen activeren. In de toekomst kan getracht worden om andere hydrolyses op de geïsoleerde eiwitfracties uit sojabonen toe te passen of om de CCK-receptoractivatietest uit te voeren met laag moleculaire fracties, etc.

WOORD VOORAF

Aan het einde van een leerrijke en interessante stageperiode en de opleiding Professionele Bachelor in de Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie wil ik graag enkele mensen bedanken.

Gedurende de stageperiode hebben heel wat mensen mij gesteund, geholpen en begeleid. In de eerste plaats zou ik graag Prof. Dr. ir. Guy Smagghe en Prof. Dr. ir. John Van Camp willen bedanken voor de geboden kans om mijn stage uit te voeren binnen hun vakgroep. Verder wens ik ook een bijzonder woord van dank uit te spreken voor mijn stagebegeleidster, ir. Dorien Staljanssens, voor het vertrouwen, de geboden kansen, de leerrijke ervaring en het verbeterwerk.

Ik wens uiteraard ook mijn stagementor binnen KaHo Sint-Lieven, Dr. Apr. Geert Vergote, te bedanken voor de steun en begeleiding, de opbouwende kritiek en de hulp bij het opstellen van mijn eindwerk. De directie, docenten en personeelsleden van KaHo Sint-Lieven hebben tijdens mijn opleiding ook een belangrijke rol gespeeld en ik wil hen op deze manier dan ook graag bedanken voor de inzet en overtuiging tijdens het lesgeven en de toewijding aan de studenten.

Buiten mijn stageplaats en het domein van de wetenschap wil ik ook heel graag mijn beide ouders en broer bedanken die mij gedurende mijn studentenjaren altijd gesteund hebben bij de keuzes die ik maakte. Ik ben mijn ouders dan ook ontzettend dankbaar voor de kans die ik gekregen heb om te studeren en om mezelf te ontdekken en te ontplooien.

Mijn vriend Jonas is tijdens mijn studie altijd een luisterend oor geweest en heeft mij steeds gesteund toen het af en toe moeilijk ging. Bedankt ook aan alle collega-studenten voor de leuke jaren en de vriendschap die uit onze studententijd is ontstaan. In het bijzonder wil ik Kim Suykerbuyk bedanken voor de ondersteuning, de hulp en de verlossende antwoorden toen ik een belangrijke vraag had. Ik hoop dat we elkaar in de toekomst blijven ontmoeten.

Van harte dank aan allen.

Sarah De Schepper, mei 2010

INHOUDSOPGAVE

STAGEGEGEVENS

SAMENVATTING

WOORD VOORAF

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

1	VOORSTELLING STAGEPLAATS.....	10
2	STAGEOPDRACHT EN PROBLEEMSTELLING	11
3	THEORETISCHE UITWERKING LITERATUURSTUDIE	13
3.1	MEDICAMENTEUZE BEHANDELING VAN OBESITAS.....	13
3.2	FUNCTIONELE VOEDING: FABULESS™.....	14
3.3	BIOACTIEVE PEPTIDEN	15
3.4	CHOLECYSTOKININE (CCK) EN ANDERE DARMHORMONEN.....	16
3.5	CCK SECRETIE	17
3.6	SIGNALISATIE	18
3.7	CCK RECEPTOR (1 EN 2).....	19
3.7.1	Structuur en lokalisatie	19
3.7.2	Weefselexpressie en functie.....	21
4	PRAKTISCHE VOORSTUDIE EN PROEFOPZET	23
4.1	IN VITRO SCREENING NAAR BIOACTIEVE PEPTIDEN MET CCK1- RECEPTORACTIVITEIT	23
4.1.1	Fractionatie van eiwitten.....	23
4.1.2	Vrijstelling van bioactieve peptiden via hydrolyse van eiwitten	23
4.1.3	Testen van liganden in biotoets met CHO-CCK1R-cellen.....	24
4.2	IN VIVO SCREENING NAAR FYSIOLOGISCHE FUNCTIES VAN CCK	24
5	MATERIAAL EN METHODEN	25
5.1	OPZUIVEREN VAN EIWITTEN UIT SOJABONEN	25
5.1.1	Principe	25
5.1.2	Reagentia en materiaal.....	25
5.1.3	Methode	25
5.2	HYDROLYSE VAN EIWITTEN	27
5.2.1	Principe	27
5.2.2	Reagentia en materiaal.....	28
5.2.3	Methode	28

5.3	KARAKTERISATIE VAN OPGEZUIVERDE EN GEHYDROLYSEERDE EIWITTEN	29
5.3.1	Eiwitbepaling volgens Kjeldahl	29
5.3.1.1	Principe	29
5.3.1.2	Reagentia en materiaal.....	30
5.3.1.3	Methode	30
5.3.2	Hydrolysegraad van eiwitten bepalen.....	31
5.3.2.1	Principe	31
5.3.2.2	Reagentia en materiaal.....	31
5.3.2.3	Methode	32
5.3.3	SDS-PAGE.....	33
5.3.3.1	Principe	33
5.3.3.2	Reagentia en materiaal.....	33
5.3.3.3	Methode	34
5.4	CELKWEEK	35
5.4.1	Principe	35
5.4.2	Reagentia en materiaal.....	36
5.4.3	Methode	36
5.5	CCK-RECEPTORACTIVATIETEST	37
5.5.1	Principe	37
5.5.2	Reagentia en materiaal.....	37
5.5.3	Methode	38
5.5.4	Meting met microtiterplaatlezer voor fluorescentie/luminescentie	38
6	RESULTATEN EN DISCUSSIE.....	39
6.1	OPZUIVEREN VAN EIWITTEN UIT SOJABONEN	39
6.2	KARAKTERISATIE VAN OPGEZUIVERDE EN GEHYDROLYSEERDE EIWITTEN	39
6.2.1	Eiwitbepaling volgens Kjeldahl	39
6.2.2	Hydrolysegraad van eiwitten bepalen.....	40
6.2.2.1	Hydrolysegraad van wei-eiwitten: BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline	40
6.2.2.2	Hydrolysegraad van glycinine (11S) en β -conglycinine (7S).....	41
6.2.3	SDS-PAGE.....	43
6.3	CCK-RECEPTORACTIVATIETEST	44
6.3.1	Inleiding	44
6.3.2	Algemene informatie	45
6.3.3	Optimalisatie van de testprocedure	45
6.3.4	Functionaliteit van de CHO-K1 cellen.....	49

6.3.5	Standaardcurve CCK-8S	51
6.3.6	Test van de stalen.....	53
7	ALGEMEEN BESLUIT.....	55

LITERATUURLIJST

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

- APS betekent ammoniumpersulfaat
- BSA betekent albumin from bovine serum of runderserumalbumine
- CCK betekent cholecystokinine
- CCK1R betekent cholecystokinine-1 receptor
- CHO betekent “chinese hamster ovary” cellijn
- CHO-CCK1R-cellen betekent dat een “chinese hamster ovary” cellijn functioneel de rat CCK-1 receptor tot expressie brengt
- DH betekent degree of hydrolysis of hydrolysegraad
- D-MEM/F-12 betekent Dulbecco’s Modified Eagle Medium and Ham’s F12 medium 1:1
- DPBS betekent Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline
- EMEA betekent European Medicines Agency of Europees Geneesmiddelenagentschap
- GIV betekent gastro-intestinale vertering
- HBSS betekent Hanks’ Balanced Salt Solution
- HEPES betekent (4(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethaansulfonzuur)
- SBS betekent sodium bisulphite
- SDS betekent sodiumdodecylsulfaat
- SDS-PAGE betekent sodiumdodecylsulfaat-polyacrylamidegelelektroforese
- TEMED betekent N, N, N’, N’ tetramethylethyleendiamine
- TNBS betekent 2,4,6-trinitrobenzeensulfonzuur of picrylsulfonzuur

1 VOORSTELLING STAGEPLAATS

De stage vond plaats aan de Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen (FBW) van de Universiteit Gent. Tijdens de stageperiode heb ik doctoraatsstudente ir. Dorien Staljanssens, die eveneens mijn stagebegeleidster was, geholpen bij het uitvoeren van wetenschappelijke experimenten. De experimenten stonden in het teken van het onderzoek waar zij momenteel aan werkt en werden zowel in de Vakgroep Gewasbescherming als in de Vakgroep Voedselveiligheid en Voedselkwaliteit uitgevoerd. Voorbereidend werk voor de experimenten gebeurde vooral in het Laboratorium Levensmiddelenchemie en Humane Voeding van de Vakgroep Voedselveiligheid en Voedselkwaliteit. Enkele praktische proeven werden ook uitgevoerd in het Laboratorium Agrozoölogie van de Vakgroep Gewasbescherming en in het Laboratorium Weefselkweek van de Vakgroep Moleculaire Biotechnologie.

2 STAGEOPDRACHT EN PROBLEEMSTELLING

Obesitas of zwaarlijvigheid is een ziekte die in onze Westerse samenleving, maar ook in verschillende ontwikkelingslanden steeds meer voorkomt door overtollige voedselinname en een ernstige risicofactor vormt in verschillende lifestyle-gerelateerde ziekten. Omdat de aandoening in bepaalde gevallen een epidemische vorm aanneemt en ook vaak gepaard gaat met hart- en vaatziekten en type 2 diabetes, vormt dit een zware last voor de gezondheidszorg. Bij obesitas en andere aanverwante ziektebeelden speelt de voedselinname en het glucose- en vetmetabolisme een prominente rol. Uit een aantal studies is bekend dat obesitas geassocieerd is met veranderingen in de concentraties en regulatie van darmhormonen [1]. Controle van de eetlust en voedselinname heeft belangrijke gevolgen voor het leiden van een gezond leven en het voorkomen van toenemende bedreigingen van medische complicaties.

Uit onderzoek is reeds gebleken dat het neuropeptide cholecystokinine (CCK) een belangrijke rol speelt bij de coördinatie van het gastro-intestinaal stelsel en dat het de omvang van een maaltijd kan beïnvloeden [2]. Bovendien is CCK betrokken bij tal van fysiologische processen zoals galblaascontractie, darmmotiliteit, maaglediging, insulinesecretie en postprandiale stimulatie van de exocriene pancreas [1-3].

De werking van CCK kan in theorie op twee verschillende manieren worden beïnvloed. In eerste instantie kan de CCK-vrijstelling uit entero-endocriene cellen gestimuleerd worden en in de tweede plaats kan een agonistische of antagonistische ligand rechtstreeks binden op de CCK-receptor en zo een invloed uitoefenen. In een recente studie van Foltz et al. (2008) werd voordien al aangetoond dat hydrolysaten, afkomstig uit verschillende voedingseiwitten, de CCK-vrijstelling uit entero-endocriene cellen stimuleren [4].

In eerder onderzoek werd ook reeds aangetoond dat β -conglycinine pepton uit sojabonen en varkensvlees pepton de voedselinname en maaglediging in ratten onderdrukken. Het β -conglycinine en het varkensvlees pepton stimuleren CCK-vrijstelling doordat ze rechtstreeks binden aan componenten van de rat intestinale celmembraan. Het vrijgestelde CCK onderdrukt op die manier de voedselinname via perifere CCK-receptoren [5-6]. CCK-receptor liganden zouden dus potentiële therapeutische toepassingen kunnen hebben en peptiden met CCK-receptoractiviteit zouden gebruikt kunnen worden bij obese patiënten om sneller een verzadigingsgevoel te induceren.

In dit onderzoek wordt niet getracht om de CCK-vrijstelling uit entero-endocriene cellen te stimuleren, maar wordt gezocht naar specifieke hydrolysaten uit voedingseiwitten of bioactieve peptiden die kunnen binden op cellen met een CCK1-receptor en op die manier dezelfde fysiologische effecten uitlokken als het natuurlijk ligand CCK. In de toekomst zouden dan functionele voedingsmiddelen voor de (preventieve) behandeling van obesitas en eventueel geassocieerde aandoeningen kunnen ontwikkeld worden.

De doelstelling van dit onderzoek is isolatie en karakterisatie van bioactieve peptiden die rechtstreeks inwerken op de CCK1-receptor. De CCK1-receptor is vooral aanwezig op cellen in het gastro-intestinaal kanaal en kan door peptiden dus bereikt worden. Bioactieve peptiden met CCK1-receptoractiviteit worden uit eiwitten van plantaardige en dierlijke bronnen vrijgesteld, geïsoleerd en geïdentificeerd. Om het isolatieproces van bioactieve peptiden in dit onderzoek te vereenvoudigen, wordt gebruik gemaakt van opgezuiverde eiwitten, bekomen na bv. fractionatie van soja-eiwit.

3 THEORETISCHE UITWERKING LITERATUURSTUDIE

3.1 MEDICAMENTEUZE BEHANDELING VAN OBESITAS

Zwaarlijvige mensen vragen vaak naar geneesmiddelen om te vermageren, eerder omwille van cosmetische redenen dan om gezondheidsredenen. Omdat obesitas gepaard gaat met een toename van de morbiditeit, is het belangrijk om in de eerste plaats niet-medicamenteuze en later medicamenteuze of chirurgische interventies te ondernemen. Een belangrijk probleem echter in de behandeling van obesitas is het gebrek aan therapietrouw bij de meeste patiënten.

Bij patiënten met obesitas is het in de eerste plaats belangrijk om zowel een energiearm als een vet- of koolhydraatarm dieet te volgen omdat dit het gewicht op korte en middellange termijn (tot 12 maanden) kan doen dalen. Door gelijktijdig met het dieet het activiteitsniveau te doen toenemen en eventueel gedragstherapie te volgen, kan het gewichtsverlies stijgen.

Omdat de prevalentie van obesitas steeds meer toeneemt en de huidige aanpak van obesitas geen indrukwekkend gewichtsverlies oplevert, is het vaak noodzakelijk om over te stappen op een medicamenteuze behandeling.

Sibutramine is het actieve bestanddeel van het geneesmiddel Reductil[®] en is een eetlustremmer en structureel verwant met amfetamines. Het remt de heropname van serotonine en noradrenaline. Sibutramine heeft volgens een meta-analyse een effect op de HDL-cholesterol en op de triglyceriden. De meest frequente nevenwerkingen van sibutramine die gerapporteerd werden zijn obstipatie, monddroogte, slapeloosheid, hoofdpijn, duizeligheid, paresthesieën en nervositas. In een aantal studies werd ook een verhoging van de bloeddruk en de hartfrequentie waargenomen. De specialiteit op basis van sibutramine (Reductil[®]) werd in België op 25 januari 2010 uit de handel genomen op basis van een aanbeveling van het Europees Geneesmiddelenagentschap (European Medicines Agency of EMEA). Aan artsen wordt gevraagd om geen voorschriften meer te verstrekken voor sibutramine en de behandeling van patiënten die momenteel sibutramine nemen, te herzien.

Orlistat wordt aangetroffen in de geneesmiddelen Alli[™] en Xenical[®] die op de Belgische markt verkrijgbaar zijn. Orlistat is een inhibitor van de gastro-intestinale lipasen die nodig zijn voor de hydrolyse van triglyceriden. Orlistat verhindert hierdoor dus de absorptie van triglyceriden uit de voeding. Uit onderzoek is gebleken dat behandeling met orlistat gedurende twee jaar een significante verbetering geeft van totaal cholesterol, LDL-cholesterol en glycemie, maar niet van HDL-cholesterol en triglyceriden. De voornaamste nevenwerkingen van orlistat zijn van gastro-intestinale aard.

In studies werden vooral fecale urgentie en vette stoelgang gerapporteerd. De gastro-intestinale ongewenste effecten van orlistat kunnen ook aanleiding geven tot falen van hormonale anticonceptie.

Rimonabant tot slot, dat bekend is onder de merknaam Acomplia[®], is een antagonist ter hoogte van de cannabinoïdreceptoren en werd aanvaard door het EMEA voor de behandeling van obesitas ($BMI \geq 30$) en de behandeling van overgewicht ($BMI \geq 27$) in aanwezigheid van risicofactoren zoals type 2 diabetes en hyperlipidemie. Reeds gerapporteerde nevenwerkingen van rimonabant zijn misselijkheid, duizeligheid, diarree, slapeloosheid, angst en depressie. Op 23 oktober 2008 heeft het EMEA aanbevolen om de vergunning voor het in de handel brengen van Acomplia[®] te schrappen. De risico-batenverhouding werd negatief bevonden. Acomplia[®] werd in januari 2008 op de Belgische markt gebracht.

Als conclusie kan gesteld worden dat de medicamenteuze aanpak van obesitas niet altijd de verhoopte sensationele vermagering teweegbrengt en dat een gezond dieet en meer lichaamsbeweging de belangrijkste maatregelen blijven. Geneesmiddelen hebben in de behandeling van obesitas slechts een beperkte plaats omdat de winst vaak verloren gaat bij stopzetten van de medicamenteuze interventie. De ontwikkeling van een voedingseiwit als bron van bioactieve peptiden dat inwerkt op de CCK1-receptor zou dus een vooruitgang kunnen betekenen in de behandeling van obesitas en zou als hulpmiddel kunnen aangewend worden naast een goede gewoonte van voldoende lichaamsbeweging en een gezond en gevarieerd dieet. Uit bovenstaande informatie van het BCFI (Belgisch Centrum voor Farmacotherapeutische Informatie) en het Farmacotherapeutisch Kompas kan dus afgeleid worden dat een huidig voedingseiwit nog niet bestaat op de Belgische of Europese markt [7-8].

3.2 FUNCTIONELE VOEDING: FABULESS[™]

Fabules[™] is een voorbeeld van functionele voeding dat patiënten met overgewicht of obesitas helpt om de eetlust onder controle te houden. Fabules[™]/Olibra[™] is een nieuw natuurlijk ingrediënt van DSM dat ontwikkeld werd voor gebruik in voedingsmiddelen en supplementen. Het product helpt de consument om actief het lichaamsgewicht in balans te houden en activeert het controlemechanisme van de natuurlijke eetlust.

FabulesTM/OlibraTM is een gepatenteerde olie-in-water emulsie die in zuivelproducten of voedingssupplementen kan worden geïntegreerd. De fijne druppeltjes zijn opgebouwd uit lipiden die van nature in onze voeding voorkomen (bijvoorbeeld palmolie) en zijn gecoat met galactolipiden (polaire lipiden) van haverolie [9]. De microstructuur van FabulesTM zou de vertering van de palmoliekern vertragen in de maag en de dunne darm. De druppeltjes gaan relatief onverstoord doorheen het eerste deel van het spijsverteringskanaal naar het laatste deel van de dunne darm. Onverteerd vet in de dunne darm wordt herkend als een signaal dat het lichaam verzadigd is. De hersenen worden op die manier geïnformeerd dat er geen noodzaak is om meer voedsel in te nemen. Het vet zal vervolgens op een natuurlijke manier verteerd worden in het gastro-intestinaal stelsel [9].

Het product is op de Belgische markt niet verkrijgbaar, maar werd in Nederland wel al geïntegreerd in Optimel Control, een eetlustremmende zuiveldrink. Het ondertussen van de markt gehaalde zuivelproduct werd in 2006 geïntroduceerd, maar stond al meteen ter discussie omdat critici twijfelden aan de werking van het eetlustremmende ingrediënt FabulesTM. Er werden reeds verschillende onderzoeken uitgevoerd aan de Universiteit van Ulster naar FabulesTM/OlibraTM maar de resultaten van de onderzoeken zijn niet eensluidend [9-12].

3.3 BIOACTIEVE PEPTIDEN

In de laatste 10 tot 15 jaar is de wetenschappelijke interesse in voedingseiwitten met een bioactieve functie sterk toegenomen. Uit onderzoek is reeds gebleken dat bioactieve peptiden, naast tal van andere fysiologische functies, ook een lokaal effect kunnen uitoefenen op het maag-darmstelsel.

In het verleden werden reeds veel fysiologisch actieve peptiden geïdentificeerd, maar er moet een onderscheid gemaakt worden tussen bioactieve proteïnen die van nature aanwezig zijn in voedsel zoals bv. groeifactoren en immunoglobulines in melk, of bioactieve peptiden die pas na vertering of enzymatische hydrolyse van intacte proteïnen werkzaam worden.

Bioactieve peptiden hebben meestal een lengte van 3-20 aminozuurresidu's en ze zijn inactief zolang ze deel uitmaken van een grotere molecule. De methoden die gebruikt worden voor het bestuderen van bioactieve peptiden variëren sterk, hoewel de meeste methoden toch vertrouwen op in vitro onderzoek voor het aantonen van de biologische activiteit.

Bioactieve peptiden kunnen vrijgesteld worden door toepassen van hydrolysemethoden met digestieve enzymen (in vivo of in vitro) of via voedselverwerking. Zodra bioactieve peptiden worden geproduceerd, beschikken ze in theorie over de mogelijkheid om o.a. gastro-intestinale, hormonale, immunologische, neurologische, vasoregulatorische, nutritionele of andere fysiologische effecten uit te oefenen. Omwille van voorgaande redenen zijn bioactieve peptiden dus zeer geschikt voor een verscheidenheid aan voedingstoepassingen.

In praktijk blijkt de werking van bioactieve peptiden op het metabolisme echter veel complexer te zijn. Ten eerste is het belangrijk dat bioactieve peptiden via het normale verteringsproces worden vrijgesteld uit de ingenomen grotere molecule waar ze deel van uitmaken. Indien bioactieve peptiden rechtstreeks aan voedsel worden toegevoegd, moeten de peptiden het verteringsproces overleven en mogen ze niet verder afgebroken worden in de darm. Bioactieve peptiden zijn in grote mate resistent aan enzymatische hydrolyse. Ten tweede kunnen bioactieve peptiden pas een effect uitoefenen als ze in actieve vorm hun “target site” bereiken.

Dat bioactieve peptiden een doorbraak kunnen betekenen in de preventie en mogelijke behandeling van ziekten is via studies reeds duidelijk geworden. Door vooruitstrevende ontwikkelingen in de voedingstechnologie en wetenschap, neemt de mogelijkheid tot het ontwikkelen van een functioneel voedingsproduct toe. Verder onderzoek via in vitro en in vivo studies zal in de toekomst belangrijk zijn om de veiligheid en efficiëntie van nieuwe voedingsproducten te testen en om de voordelen van bioactieve peptiden op de gezondheid te bevestigen [13].

3.4 CHOLECYSTOKININE (CCK) EN ANDERE DARMHORMONEN

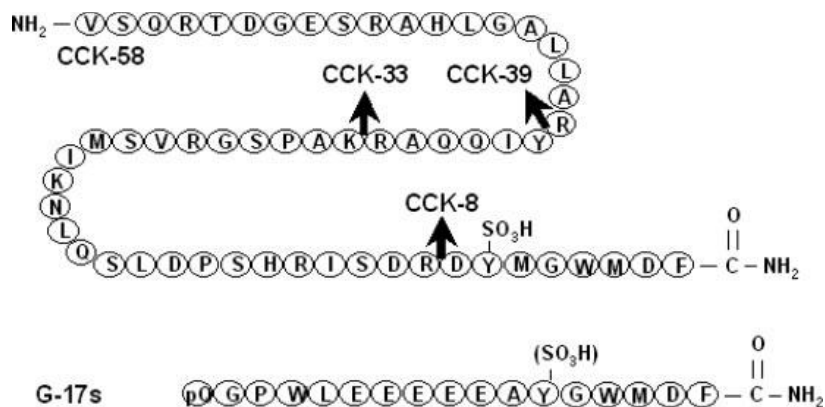
Het gastro-intestinaal stelsel staat in voor de vertering van voedsel, de opname van alle voedingsstoffen en is tevens een belangrijke bron van gewichtregulerende peptidhormonen zoals ghreline, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), oxyntomoduline (OXM), peptide YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆) en cholecystokinine (CCK).

Ghreline stimuleert de honger en de andere darmhormonen kunnen via neuronen in de hypothalamus de voedselinname remmen doordat er een intensieve interactie bestaat tussen het gastro-intestinaal stelsel en de hersenen [1].

CCK is een belangrijk hersenen-darm hormoon dat zowel in het gastro-intestinaal stelsel als in het centraal zenuwstelsel gelokaliseerd is. In de hersenen werkt CCK als neurotransmitter en speelt het hormoon vooral een belangrijke rol bij de gemoedstoestand en het gedrag.

De precursor van alle CCK-peptiden, preprocholecystokinine, werd geïdentificeerd als een 115 aminozuurbevattend hormoon. Preprocholecystokinine is de precursormolecule van alle verschillende CCK-peptiden die geproduceerd worden door posttranslationale modificaties [4].

CCK is een lineair polypeptide dat oorspronkelijk ontdekt werd als een 33 aminozuurbevattend peptide (CCK-33) in de darm van een varken en nadien ook in verschillende perifere organen en in het centraal zenuwstelsel [4, 14-16]. Er werden reeds verschillende moleculaire varianten van de 33-aminozuurbevattende sequentie geïdentificeerd (CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-47, CCK-8, CCK-7, CCK-5 en CCK-4) [4, 15]. De primaire structuur van CCK en in het bijzonder van CCK-5 is nauw verwant met gastrine, dat werkt als een fysiologische mediator van de maagzuursecretie na een maaltijd. CCK en gastrine hebben dezelfde COOH-terminale pentapeptide amidesequentie, maar verschillen van elkaar in sulfatatie aan het zesde (gastrine) of zevende (CCK) tyrosylresidu [15-16]. Figuur 1 illustreert de primaire structuur van CCK en gastrine [14].



Figuur 1 Primaire structuur van CCK en gastrine

3.5 CCK SECRETIE

Entero-endocriene cellen, ook aangeduid als I-cellen, produceren CCK als reactie op voedselinname. Basale CCK-plasmaconcentraties bedragen ongeveer 1 pmol/l in de meeste species, maar kunnen stijgen tot 5-8 pmol/l als reactie op voedselinname.

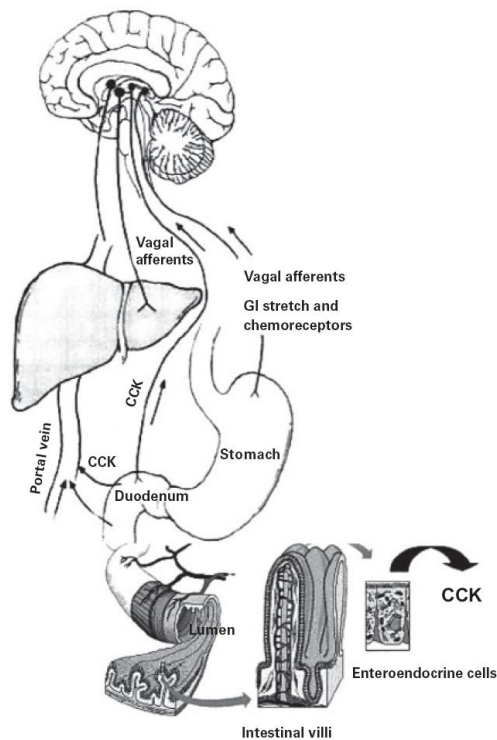
CCK-plasmaconcentraties stijgen gedurende 10-30 minuten na aanvang van de maaltijd en blijven gedurende 3-5 uur na de maaltijd verhoogd. Voornamelijk vet in de voeding en eiwitten stimuleren de CCK vrijstelling [2-3, 16]. Om een efficiënte vrijstelling van CCK te bekomen, moeten eiwitten gehydrolyseerd zijn tot korte peptiden en aminozuren [17] en triglyceriden moeten gehydrolyseerd zijn tot vetzuren [2, 16].

In het gastro-intestinaal stelsel komt CCK vooral voor in de mucosa van het duodenum en het jejunum en de neuro-endocriene cellen, de pancreas, de galblaas, de dunne en dikke darm en in het ileum [2, 4].

3.6 SIGNALISATIE

Een deel van de CCK-moleculen oefenen hun effect rechtstreeks uit doordat ze de neuronen in de nucleus arcuatus in de hypothalamus bereiken via passage van de semi-permeabele bloed-hersenbarrière onderaan de nucleus arcuatus. De meerderheid van de intestinale feedback met tussenkomst van CCK zou echter gebeuren door activatie van neurale pathways via de nervus vagus. De nervus vagus is een zenuw die delen van het hoofd bezenuwt, maar die ook naar de borst- en buikholte loopt en zich daar in de ingewanden vertakt. CCK bindt aan CCK-receptoren die aanwezig zijn op de afferente nervus vagus en kan zo via de hersenstam op de hypothalamus projecteren [1].

In figuur 2 worden de endocriene en paracriene acties van CCK schematisch voorgesteld. CCK kan door endocriene cellen rechtstreeks in de bloedbaan worden vrijgesteld en via de circulatie bereikt CCK dan specifieke interactieplaatsen in de hersenen (endocriene actie). CCK kan ook lokaal interageren met specifieke receptoren die gelokaliseerd zijn op vagale afferente axonen en zo een signaal doorgeven aan de hersenen (paracriene actie) [18].



Figuur 2 Endocriene en paracriene acties van CCK [18]

3.7 CCK RECEPTOR (1 EN 2)

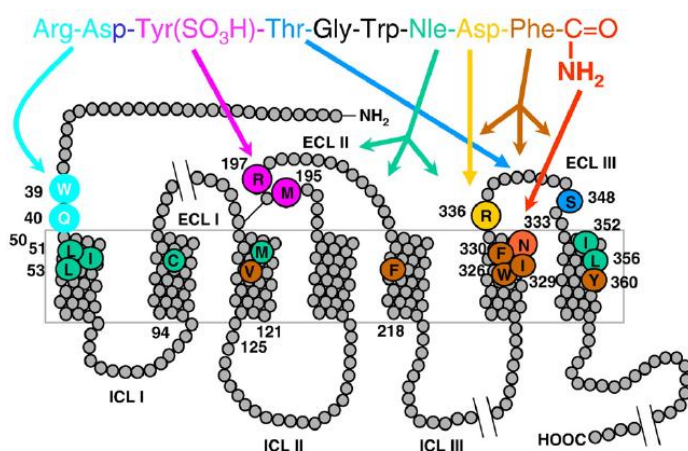
3.7.1 Structuur en lokalisatie

CCK-receptoren zijn G-proteïne gekoppelde membraanreceptoren (GPCR) of ook 7-transmembranaire receptoren [2, 4]. Er werden reeds meerdere types CCK-receptoren ontdekt, maar de twee voornaamste CCK-receptoren (CCKR) die geïdentificeerd werden, zijn de CCK-A en de CCK-B receptor. De CCK-A receptor speelt in dit onderzoek een belangrijke rol. Beide types CCK-receptoren worden op basis van hun affiniteit voor de endogene peptide-agonisten CCK en gastrine farmacologisch geclassificeerd [15].

De initiële nomenclatuur van de receptoren zoals aangeduid met CCK-A en CCK-B is algemeen aanvaard door farmacologen en moleculair biologen. De afkorting A wijst op alimentary en de afkorting B verwijst naar brain. Volgens de richtlijnen gedefinieerd door de International Union of Pharmacology (IUPHAR) Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, wordt de CCK-A receptor ook aangeduid met CCK1 en de CCK-B receptor met CCK2 [15].

De CCK1- en CCK2-receptor hebben een verschillende distributie in het menselijk lichaam, een gedeeltelijk verschillende moleculaire structuur en ze vertonen een andere relatieve affiniteit voor de natuurlijke liganden.

De CCK1-receptor bindt en reageert op gesulfateerd CCK met een 500 tot 1000 maal hogere affiniteit dan gesulfateerd gastrine of niet-gesulfateerd CCK [15, 19]. Het gesulfateerde C-terminale octapeptide (CCK-8) schijnt de minimale sequentie te zijn die noodzakelijk is voor een totale biologische activiteit van de CCK1-receptor. Studies van de structuur-activiteitsrelatie met synthetische CCK-analogen hebben aangetoond dat sulfatatie van het tyrosine op positie 2 in CCK-8 noodzakelijk is voor binding op de CCK1-receptor [14]. De CCK2-receptor bindt en reageert op gastrine en CCK met ongeveer dezelfde affiniteit en maakt slechts in beperkte mate onderscheid tussen gesulfateerde en niet-gesulfateerde peptiden [15, 19]. Het natuurlijk ligand met de hoogste affiniteit voor de CCK2-receptor is naast CCK-8 ook gastrine. CCK-4 en gastrine zijn de minimale sequenties die noodzakelijk zijn voor een totale biologische activiteit van de CCK2-receptor. De twee belangrijkste interacties die ervoor zorgen dat het gesulfateerde CCK-8S een hogere affiniteit heeft voor de CCK1-receptor t.o.v. het niet-gesulfateerde CCK-8 zijn Met en Arg in de tweede extracellulaire lus van de CCK1-receptor [19]. In figuur 3 wordt een voorstelling gegeven van hoe CCK-8S zou binden met de CCK1-receptor. In een serpentine voorstelling wordt de primaire structuur en bindingsplaats van de humane CCK1-receptor weergegeven. De aminozuren die deel uitmaken van de bindingsplaats voor CCK zijn aangeduid. De aminozuren van CCK en van de CCK1-receptor worden gekleurd voorgesteld om specifieke interacties tussen beide moleculen duidelijk te illustreren.



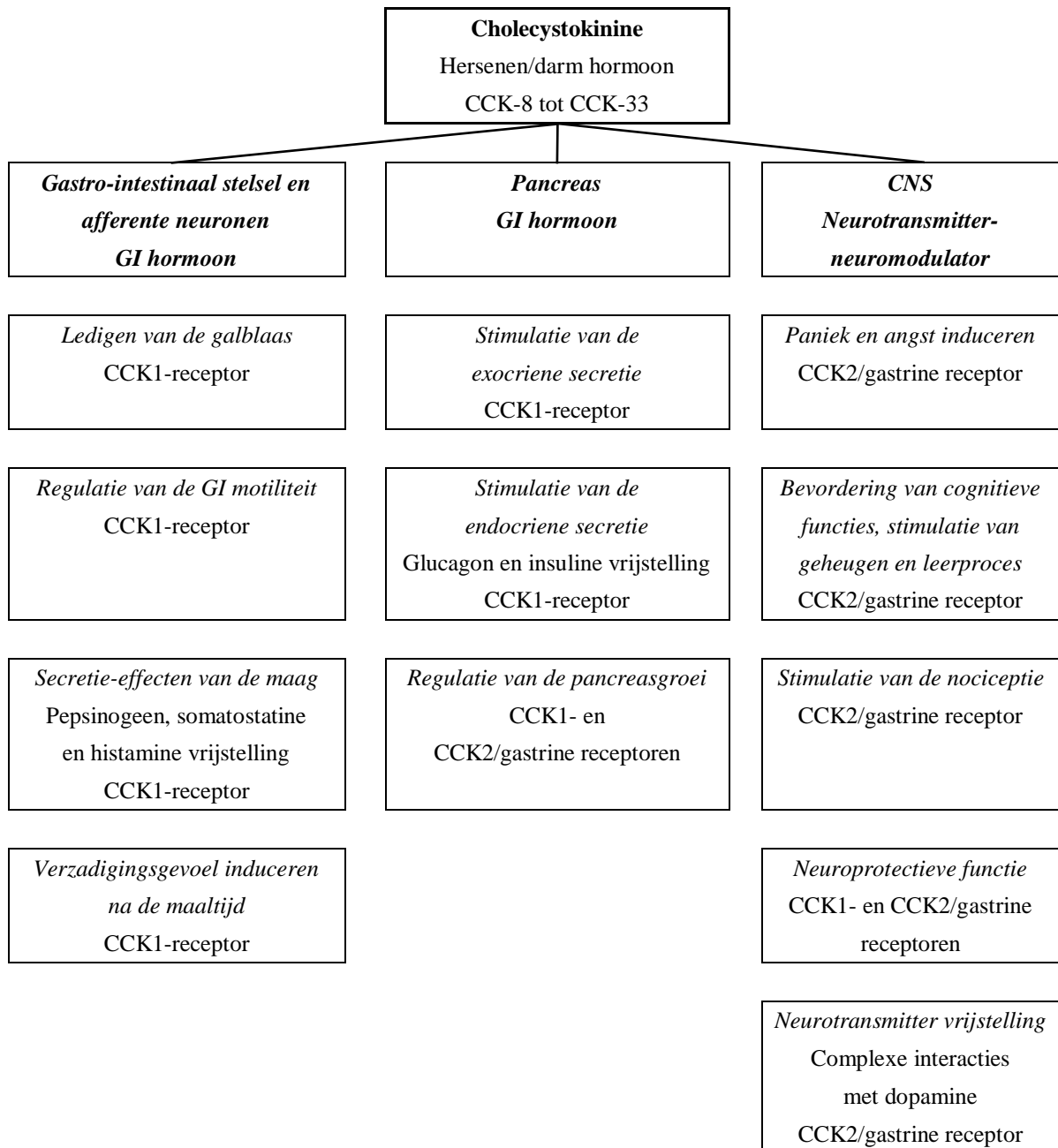
Figuur 3 Serpentine voorstelling van de primaire structuur en bindingsplaats van de humane CCK1-receptor. ICL = intracellulaire lus, ECL = extracellulaire lus [19]

3.7.2 Weefselexpressie en functie

Zowel de CCK1 als de CCK2-receptor is aanwezig in het perifeer- en centraal zenuwstelsel, maar de CCK1-receptor is vooral aanwezig in het gastro-intestinaal stelsel. De humane CCK1-receptor wordt op eiwitniveau voornamelijk tot expressie gebracht in de hoofdcellen, de D-cellen van het maagslijmvlies, in het gladde spierweefsel van de galblaas, in de pylorus, in de sfincter van Oddi, de exocriene pancreas en de gastro-intestinale afferente neuronen. Aanwezigheid van de CCK2-receptor werd in het gastro-intestinaal stelsel reeds aangetoond in de pariëtale, ECL- (enterochromaffiene-achtige), D-, en hoofdcellen van de maagmucosa, in de humane exocriene en endocriene pancreas en in cellen van het glad spierweefsel doorheen het gastro-intestinaal stelsel [4, 17-18].

De CCK1-receptor blijkt vooral betrokken te zijn in de regulatie van exocriene en endocriene pancreasfuncties. Daarnaast speelt de CCK1-receptor ook een belangrijke rol bij de regulatie van het verzadigingsgevoel, de vrijstelling van enzymen uit het maagslijmvlies, de motiliteit van het gastro-intestinaal stelsel en contractie van de galblaas. In het gastro-intestinaal stelsel is de CCK2-receptor vooral betrokken bij de groei van het maagslijmvlies, bij zuurproductie door pariëtale cellen en bij de histaminesecretie door de enterochromaffiene-achtige cellen van de maag [4].

In figuur 4 wordt een overzicht gegeven van de belangrijkste locaties en fysiologische functies van CCK. Er wordt ook weergegeven via welke receptor het natuurlijk ligand CCK een biologisch effect uitvoert.



Figuur 4 Belangrijkste locaties en fysiologische functies van CCK via een bepaalde receptor (CCK1R of CCK2R) [4]. CZS betekent centraal zenuwstelsel en GI betekent gastro-intestinaal

4 PRAKTISCHE VOORSTUDIE EN PROEFOPZET

4.1 IN VITRO SCREENING NAAR BIOACTIEVE PEPTIDEN MET CCK1-RECEPTORACTIVITEIT

4.1.1 Fractionatie van eiwitten

Tijdens dit onderzoek zal getracht worden om de mengsels van eiwitten die aanwezig zijn in verschillende voedingsbronnen te fractioneren zodanig dat met zuiverdere eiwitten kan worden gewerkt. Op die manier wordt de karakterisatie en doelgerichte productie van bioactieve peptiden vergemakkelijkt. De eiwitten waarop in deze stage verder onderzoek wordt gedaan, zijn afkomstig uit sojabonen of *Glycine max*. De twee grootste eiwitcomponenten die voorkomen in sojabonen zijn glycinine (11S) en β -conglycinine (7S) [20]. Voor de fractionatie van sojaproteïne wordt een aangepaste procedure uitgevoerd die steunt op een studie van Liu et al. (2007). De procedure is een nieuwe en geoptimaliseerde methode voor de extractie en isolatie van de 11S en 7S fractie uit sojabonen die gebaseerd is op een eerder ontwikkelde methode door Nagano et al. (1992) [21] en Thanh en Shibasaki (1976) [20, 22]. Na fractionatie van het sojaproteïne kunnen de eiwitfracties via SDS-PAGE gekarakteriseerd worden.

Een andere eiwitbron die in het onderzoek gebruikt wordt is wei-eiwit uit melk. De voornaamste eiwitten in wei zijn β -lactoglobuline, α -lactalbumine en runderserumalbumine (BSA) [13]. Deze drie eiwitten zijn commercieel beschikbaar.

4.1.2 Vrijstelling van bioactieve peptiden via hydrolyse van eiwitten

In dit onderzoeksproject worden bioactieve peptiden uit gekozen eiwitten vrijgesteld door een in vitro enzymatische hydrolyse met industrieel gebruikte enzymen en/of combinaties van enzymen in optimale condities. Via een simulatie van de gastro-intestinale vertering kunnen met de commercieel beschikbare enzymen pepsine, trypsine en α -chymotrypsine hydrolysaten geproduceerd worden uit de 11S en 7S fractie van sojabonen en uit de wei-eiwitten β -lactoglobuline, α -lactalbumine en BSA.

Na uitvoeren van de enzymatische hydrolysereactie kan de hydrolysegraad van een eiwit bepaald worden om te achterhalen in welke mate de peptidenbindingen van het eiwit gehydrolyseerd zijn.

Vervolgens kan dan de CCK1-receptoractiviteit van de bekomen hydrolysaten geëvalueerd worden aan de hand van het experiment dat beschreven wordt in onderstaande paragraaf.

4.1.3 Testen van liganden in biotoets met CHO-CCK1R-cellen

Tijdens dit deel van het onderzoek zal de biologische activiteit van peptiden, die bekomen werden na enzymatische hydrolysereactie, bestudeerd worden aan de hand van biotoetsen uitgevoerd op gecultiveerde CHO-CCK1R-cellen. De CHO-CCK1R-cellen zijn cellen van een “chinese hamster ovary” cellijn (CHO) die functioneel de rat CCK1-receptor tot expressie brengen. Zodra de celweek voldoende matuur is (24-32 uur) wordt een peptidenstaal aangebracht op de cellen. De intracellulaire Ca^{2+} -concentratie zal stijgen indien een peptide bindt met de CCK1-receptor op de gecultiveerde cellen. Na activatie van de CCK1-receptor wordt de wijziging in de Ca^{2+} -concentratie gevisualiseerd door een toename in fluorescentie van de cellen omdat Ca^{2+} bindt met de fluorescente probe, Fluo-4AM. De fluorescentie van de cellen kan gemeten worden in een TECAN microtiterplaatlezer voor fluorescentie en luminescentie.

Aan de hand van de in vitro biotoetsen kan onderzocht worden in welke mate de specifieke hydrolysaten uit voedingseiwitten die binden op de CCK1-receptor hetzelfde fysiologische effect uitlokken als het natuurlijk ligand CCK. Een aantal commercieel beschikbare CCK1-receptor-agonisten zoals bv. het natuurlijke ligand CCK-8S worden bij de optimalisatie van de testprocedure en ter controle bij de in vitro evaluatie gebruikt. Met de in vitro biotoetsen kan dan uiteindelijk de concentratieafhankelijke activiteit van receptorliganden en de diversiteit in receptor-ligandinteractie worden bepaald.

4.2 IN VIVO SCREENING NAAR FYSIOLOGISCHE FUNCTIES VAN CCK

Na evaluatie van de in vitro activiteit van de bekomen hydrolysaten en opgezuiverde peptiden kan een selectie gemaakt worden van een aantal hydrolysaten en peptiden die voor de in vivo testen worden gebruikt.

Om de in vivo fysiologische activiteit van de geselecteerde preparaten en het effect op voedingspatroon en gewichtsverlies te evalueren, zullen mannelijke Sprague-Dawley ratten tussen 10 en 14 weken oud met een gewicht van 230 tot 300 g gebruikt worden als model voor de mens. Tijdens de studies zal het staal oraal, via gavage, aan de ratten worden toegediend.

5 MATERIAAL EN METHODEN

5.1 OPZUIVEREN VAN EIWITTEN UIT SOJABONEN

5.1.1 Principe

Glycinine (11S) en β -conglycinine (7S) zijn de twee grootste eiwitcomponenten die voorkomen in sojabonen. De 11S en 7S globulines bedragen ongeveer 70 % van het totaal aan opslageiwitten in sojabonen. Glycinine en β -conglycinine kunnen opgezuiverd worden uit sojabonen door uitvoeren van een pH-precipitatie. De eiwitcomponenten hebben de eigenschap om neer te slaan bij een verschillende pH en kunnen op die manier dus geïsoleerd en gescheiden worden uit sojabonen.

5.1.2 Reagentia en materiaal

Voor het experiment zijn sojabonen en een koffiemachine nodig.

De producten technisch hexaan, NaCl, 25 % HCl en NaOH worden aangekocht bij firma Chem-Lab, Zedelgem. Tijdens het experiment wordt de pH van de oplossingen aangepast met een 2 mol/l NaOH- of een 2 mol/l HCl-oplossing. Tris-HCl wordt aangekocht bij firma Acros Organics, Geel. Voor het experiment is 500 ml van 0,03 mol/l Tris HCl-buffer met pH 8,5 nodig. De oplossing wordt op pH gebracht met een 25 % HCl-oplossing. NaHSO₃ (SBS of sodium bisulphite) wordt aangekocht bij firma Janssen Chimica, Beerse. De dialysemembraan wordt aangekocht bij firma Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, US met volgende kenmerken en eigenschappen: 5 Spectra/Por® Membrane, MWCO 12-14 000, Flat Width: 75 mm, Diameter: 41 mm, Vol/Length: 13 ml/cm, Length: 15 m/50 ft, Reorder no.: 132 754

5.1.3 Methode

Ontvette sojabloem

Voor het bereiden van ontvette sojabloem, worden de sojabonen fijn gemalen met een koffiemachine. Vervolgens wordt 100 g van het bekomen poeder afgewogen en gemengd met 1 liter technisch hexaan. Het mengsel wordt gedurende 1 uur geschud bij kamertemperatuur. Aangezien het sojameel niet oplost in hexaan, wordt het mengsel gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur geplaatst.

Vervolgens wordt de bovenstaande vloeistof (hexaan) afgegoten en wordt het precipitaat opnieuw met 1 liter hexaan geëxtraheerd. Het precipitaat wordt dan gedurende een nacht gedroogd.

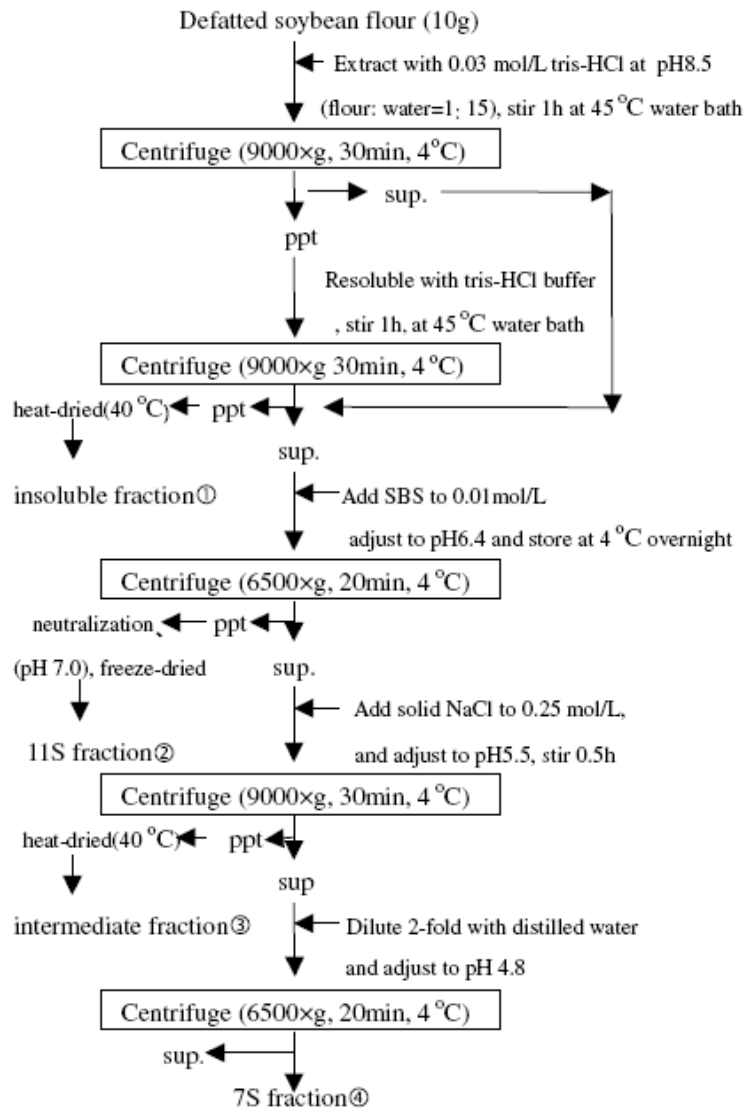
Isolatie van 11S en 7S

Om een extractie van 11S en 7S globulines uit ontvette sojabloem uit te voeren, wordt 10 g van de ontvette sojabloem afgewogen en gemengd met 150 ml 0,03 mol/l Tris HCl-buffer pH 8,5 gedurende 1 uur bij 45 °C. Vervolgens wordt het mengsel gecentrifugeerd (9000 g, 30 minuten, 4 °C) en na centrifugatie wordt het bekomen precipitaat opnieuw geëxtraheerd. Het precipitaat is niet meer nodig in het experiment, er wordt verder gewerkt met het supernatans.

Het supernatans wordt samengevoegd en SBS wordt toegevoegd tot een concentratie van 0,01 mol/l. Praktisch betekent dit dat aan 300 ml supernatans, 312 mg SBS wordt toegevoegd. De pH van de oplossing wordt ingesteld op 6,4 met 2 mol/l HCl. De oplossing wordt gedurende een nacht bij 4 °C bewaard. Nadien wordt het mengsel opnieuw gecentrifugeerd (6500 g, 20 minuten, 4 °C) en het precipitaat bevat dan de **11S fractie**. Het precipitaat wordt 3 keer met gedestilleerd water gewassen en dan opgelost in gedestilleerd water. De pH wordt ingesteld op 7 met 2 mol/l NaOH. De oplossing wordt gedialyseerd over water, ingevroren en tot slot gelyofiliseerd. Het supernatans wordt behandeld door NaCl toe te voegen tot een concentratie van 0,25 mol/l. Praktisch betekent dit dat aan 300 ml supernatans, 4,38 g NaCl wordt toegevoegd. De pH van de oplossing wordt ingesteld op 5,5 met 2 mol/l HCl. De oplossing wordt dan gedurende 30 minuten geroerd bij kamertemperatuur en vervolgens gecentrifugeerd (900 g, 30 minuten, 4 °C). Het precipitaat is een intermediaire fractie en is niet meer nodig.

Het supernatans wordt 2 keer verdund met gedestilleerd water. Praktisch betekent dit dat aan 300 ml supernatans, 300 ml gedestilleerd water wordt toegevoegd. De pH van de oplossing wordt ingesteld op 4,8 met 2 mol/l HCl en de oplossing wordt gecentrifugeerd (6500 g, 20 minuten, 4 °C). Het precipitaat bevat dan de **7S fractie**. Het proces wordt nu herhaald zoals eerder beschreven voor de 11S fractie. Het precipitaat wordt dus 3 keer met gedestilleerd water gewassen en dan opgelost in gedestilleerd water. De pH wordt ingesteld op 7 met 2 mol/l NaOH. De oplossing wordt dan gedialyseerd over water, ingevroren en tot slot gelyofiliseerd.

In figuur 5 wordt een schema weergegeven voor de isolatie van 11S en 7S eiwitfracties uit sojabonen volgens de geoptimaliseerde methode van Liu et al. (2007) [20].



Figuur 5 Schema voor de isolatie van 11S en 7S eiwitfracties uit sojabonen [20]

5.2 HYDROLYSE VAN EIWITTEN

5.2.1 Principe

Eiwitten zijn opgebouwd uit ketens van aminozuren die aan elkaar geschakeld zijn via peptidenbindingen. Door gebruik te maken van enzymen en optimale reactieomstandigheden, kunnen de peptidenbindingen tussen aminozuren verbroken worden en kunnen eiwitten dus op specifieke plaatsen gesplitst worden. Na hydrolysereactie van een eiwit ontstaan kleinere (poly)peptiden of vrije aminozuren.

Bioactieve peptiden zullen in dit experiment vrijgesteld worden uit de gekozen eiwitten door een in vitro enzymatische hydrolyse met industrieel beschikbare enzymen en/of een combinatie van enzymen (o.a. pepsine, trypsine, α -chymotrypsine).

5.2.2 Reagentia en materiaal

De eiwitten BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline en de enzymen papaïne, peptidase, trypsine en α -chymotrypsine, die gebruikt worden tijdens het experiment, worden aangekocht bij firma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US. Het enzym pepsine wordt aangekocht bij firma Biocatalysts, UK.

5.2.3 Methode

De wei-eiwitten BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline en de opgezuiverde soja-eiwitten glycine en β -conglycinine worden afzonderlijk gehydrolyseerd met een gekozen enzym. De verhouding substraat/water bedraagt 4 g staal per 100 ml en de verhouding enzym/substraat bedraagt 0,004 (m/m %).

De pH van de oplossing wordt ingesteld met behulp van een 1 mol/l HCl- of een 1 mol/l NaOH-oplossing. De pH die moet worden ingesteld voor aanvang van de hydrolyse is afhankelijk van de pH waarbij het gebruikte enzym optimaal werkzaam is. In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de optimale pH- en temperatuurinstelling bij incubatie voor de gebruikte enzymen. De oplossing wordt na pH-instelling gedurende 5 uur in een schuddend warmwaterbad geplaatst.

Tabel 1 Overzicht van de optimale pH- en temperatuurinstelling voor de gebruikte enzymen

Enzym	Optimale pH	<u>Optimale temperatuur</u> °C
Papaïne	6,5	65
Pepsine	2	37
Peptidase	7	37
Thermolysine	8	70
Trypsine	6,5	37
α -chymotrypsine	6,5	37

Na afloop van de incubatie wordt de oplossing gedurende 15 minuten verwarmd tot een temperatuur van 80 °C om de enzymreactie stop te zetten. Nadien wordt de oplossing op pH 5 gesteld omdat bij deze pH de eiwitten goed oplosbaar zijn in gedestilleerd water. De oplossing wordt ingevroren en zodra de oplossing bevroren is, kunnen de eiwitten gelyofiliseerd worden en kan de hydrolysegraad bepaald worden.

De enzymen pepsine, trypsine en α -chymotrypsine worden gebruikt voor een simulatie van de gastro-intestinale vertering. Tijdens dit experiment wordt opnieuw gebruik gemaakt van de eerder opgesomde eiwitten, maar verloopt de hydrolyse in 2 fasen. Aan het eiwitstaal wordt eerst pepsine toegevoegd en de pH van de oplossing wordt ingesteld op 2 met behulp van een 1 mol/l HCl-oplossing. De eiwitoplossing wordt gedurende 2 uur in een schuddend warmwaterbad van 37 °C (lichaamstemperatuur) geplaatst. In deze eerste fase wordt dus de gastro-intestinale vertering in de maag gesimuleerd.

Na incubatie, wordt aan de eiwitoplossing trypsine en α -chymotrypsine toegevoegd en de oplossing wordt gedurende 2,5 uur in een schuddend warmwaterbad van 37 °C geplaatst. In de tweede fase van het experiment wordt de pH van de eiwitoplossing aangepast tot 6,5 met behulp van een 1 mol/l NaOH-oplossing en wordt de gastro-intestinale vertering in de dunne darm gesimuleerd. Na incubatie wordt de oplossing behandeld zoals hierboven reeds vermeld staat, ingevroren en gelyofiliseerd.

5.3 KARAKTERISATIE VAN OPGEZUIVERDE EN GEHYDROLYSEERDE EIWITTEN

5.3.1 Eiwitbepaling volgens Kjeldahl

5.3.1.1 Principe

In de eiwitbepaling volgens Kjeldahl wordt het N-gehalte bepaald en hieruit wordt dan het eiwitgehalte afgeleid.

Organisch materiaal wordt vrijgesteld en/of vernietigd met geconcentreerd zwavelzuur bij hoge temperatuur en in aanwezigheid van een katalysator. Het stikstof dat hierbij ontstaat wordt gebonden als NH_4^+ in een overmaat zwavelzuur.

NH_4^+ in de oplossing wordt daarna omgezet tot NH_3 met NaOH en het vrije NH_3 wordt afgescheiden via destillatie en getitreerd met HCl. Het gebruikte volume HCl is een maat voor de hoeveelheid NH_3 waaruit dan het eiwitgehalte kan worden berekend.

5.3.1.2 Reagentia en materiaal

Kjeltabs (5 g K_2SO_4 en 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) worden aangekocht bij firma Thompson & Capper Ltd, Cheshire, UK. Geconcentreerd zwavelzuur wordt aangekocht bij firma Chem-Lab, Zedelgem. Voor de titratie is een oplossing van 0,05 mol/l HCl nodig. De gebruikte toestellen voor vrijstellen en/of vernietigen van organisch materiaal zijn FOSS Tecator™ Scrubber en FOSS Tecator 2020 Digester. Het toestel FOSS 2200 Kjeltec Auto Distillation zal de oplossing in de proefbuis neutraliseren. Uit 25 % HCl (Chem-Lab, Zedelgem) wordt een 0,05 mol/l HCl-oplossing aangemaakt.

5.3.1.3 Methode

Aan elke proefbuis wordt 50 mg eiwitstaal, 1 Kjeltab en 100 ml geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd. De proefbuizen worden gedurende 1,5 uur in het toestel FOSS Tecator 2020 Digester in de trekkast geplaatst en aangesloten op de FOSS Tecator™ Scrubber zodat organisch materiaal vrijgesteld en/of vernietigd kan worden. De Kjeltab fungeert hier als katalysator van de reactie.

Omzetting van NH_4^+ tot NH_3 in de oplossing gebeurt met behulp van het toestel FOSS 2200 Kjeltec Auto Distillation en de geneutraliseerde oplossing wordt opgevangen in een erlenmeyer en vervolgens getitreerd met 0,05 mol/l HCl. Het eiwitgehalte kan dan na titratie berekend worden via volgende formule:

$$\% \text{ eiwit} = \frac{V_{\text{HCl}} (\text{ml}) \times T_{\text{HCl}} (\text{mol/l}) \times 14 (\text{g N/mol}) \times 6,25 \times 100}{1000 \text{ ml/l} \times M_{\text{staal}} (\text{g})}$$

V_{HCl} = volume HCl nodig om omslagpunt te bereiken tijdens de titratie

T_{HCl} = concentratie van HCl waarmee getitreerd wordt

6,25 = conversiefactor van N naar onbekend eiwit (N maakt gemiddeld 16 % (m/m %) uit van de eiwitfractie)

M_{staal} = massa van het eiwitstaal

5.3.2 Hydrolysegraad van eiwitten bepalen

5.3.2.1 Principe

Indien de hydrolysegraad van een eiwit wordt bepaald, geeft dit een idee over de mate waarin de peptidenbindingen van een eiwit gehydrolyseerd zijn na uitvoeren van een enzymatische hydrolyse-reactie. Een % DH (degree of hydrolysis) van 50 betekent dat een gebruikt enzym 50 % van de beschikbare peptidenbindingen heeft gehydrolyseerd. Picrylsulfonzuur (TNBS of 2,4,6-trinitrobenzeensulfonzuur) bindt met eindstandige NH_2 -groepen en dit zorgt voor een kleurreactie. Indien er meer eindstandige aminogroepen aanwezig zijn, zal dit resulteren in een hogere absorbantie.

5.3.2.2 Reagentia en materiaal

Voor het bepalen van de hydrolysegraad van eiwitten is een 0,21 mol/l natriumfosfaatbuffer met pH 8,2 nodig. Er wordt 25 ml van 0,21 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (product aangekocht bij firma Merck, Darmstadt, Germany) en 500 ml van 0,21 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (product aangekocht bij firma Chem-Lab, Zedelgem) aangemaakt en beide oplossingen worden samengevoegd. De totale oplossing wordt dan op pH 8,2 gebracht.

De TNBS stockoplossing (5 %) wordt aangekocht bij firma Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US en wordt verdund met gedestilleerd water tot een 0,05 % oplossing. De bereide TNBS-oplossing wordt bewaard op een donkere plaats.

Uit 25 % HCl (Chem-Lab, Zedelgem) wordt een 0,1 mol/l HCl-oplossing gemaakt.

Natriumdodecylsulfaat (SDS of sodiumdodecylsulfaat) wordt aangekocht bij firma Acros Organics, Geel. Voor het experiment is een 1 % (m/m %) SDS-oplossing nodig.

De leucine standaard wordt aangekocht bij firma Nutritional Biochemicals Corporation (NBC), Cleveland, Ohio, US. Er wordt een stockoplossing van 3 mmol/l leucine gemaakt ($M_{\text{leucine}} = 131,2 \text{ g/mol}$) en de afgewogen hoeveelheid leucine wordt opgelost in 1 % SDS. De stockoplossing wordt nu $20 \times$, $10 \times$, $4 \times$ en $2 \times$ verdund. Respectievelijke concentraties leucine die dan worden bereid zijn: 0,15 mmol/l, 0,30 mmol/l, 0,75 mmol/l en 1,5 mmol/l.

5.3.2.3 Methode

Als blanco-oplossing wordt niet-gehydrolyseerd staal verdund in 1 % SDS tot een eiwitconcentratie van 0,5 mg/ml. De gehydrolyseerde eiwitstalen worden verdund in 1 % SDS tot een eiwitconcentratie van 0,5 mg/ml.

Er wordt 15 μ l staal (leucine standaard of eiwitstaal) in een well van de microtiterplaat gepipetteerd en vervolgens wordt 45 μ l 0,21 mol/l natriumfosfaatbuffer pH 8,2 toegevoegd aan elke well. Nadien wordt 45 μ l 0,05 % TNBS-oplossing in de well gepipetteerd en de microtiterplaat wordt afgedekt met aluminiumfolie en gedurende 1 uur bij 50 °C geïncubeerd. Na incubatie wordt 90 μ l 0,1 mol/l HCl toegevoegd aan elke well en de absorbantie van de oplossingen kan dan gemeten worden bij 340 nm met behulp van een microtiterplaat spectrofotometer.

In een eerste fase van het experiment wordt een kalibratielijijn opgesteld met behulp van 4 standaardoplossingen van leucine en in een tweede stap kunnen dan de gemeten absorbantiewaarden van de eiwitstalen met behulp van de kalibratielijijn omgezet worden tot NH₂-equivalenten.

Aan de hand van de kalibratielijijn kan dus de concentratie aan terminale aminogroepen in de stalen bepaald worden door het meten van de absorbantie. Volgens onderstaand voorbeeld kan dan de hydrolysegraad van het eiwit uitgerekend worden.

Voorbeeld:

BSA na hydrolyse:	absorbantie equivalent met 0,444 mmol/l leucine NH ₂
Blanco:	0,0470 mmol/l leucine NH ₂
NH ₂ te wijten aan hydrolyse:	0,444 mmol/l - 0,0470 mmol/l = 0,397 mmol/l leucine NH ₂

Volume eiwitstaal: 15 μ l

$$0,397 \text{ mmol/l} \times 15 \times 10^{-6} \text{ l} = 5,96 \times 10^{-6} \text{ meq} \approx 6,0 \times 10^{-6} \text{ meq}$$

De eiwitconcentratie in het staal was gelijk aan 0,5 mg/ml, dus 15 μ l eiwitstaal bevatte 7,5 μ g eiwit.

$$h = 5,96 \times 10^{-6} \text{ meq} / 7,5 \times 10^{-6} \text{ g} = 0,795 \text{ meq/g} \approx 0,8 \text{ meq/g}$$

$$h \text{ tot-wei} = 8,8 \text{ meq/g (waarde is afhankelijk van eiwit)}$$

$$\% \text{ DH} = (0,795/8,8) \times 100 \% = 9,0 \%$$

5.3.3 SDS-PAGE

5.3.3.1 Principe

SDS-PAGE of sodiumdodecylsulfaat-polyacrylamidegelelektroforese wordt gebruikt om eiwitten te scheiden op basis van grootte. Bij deze elektroforesetechniek hebben de eiwitten een negatieve lading en bewegen ze onder invloed van een elektrisch veld van de negatieve (kathode) naar de positieve pool (anode).

Bij SDS-PAGE wordt een stacking gel of concentratiegel en een running gel of scheidingsgel gebruikt. Polymerisatie van de gel wordt geïnitieerd door toevoegen van ammoniumpersulfaat (APS) en N, N, N', N' tetramethylethyleendiamine (TEMED) wordt toegevoegd om het polymerisatieproces te versnellen.

In dit experiment wordt gebruik gemaakt van een denaturerend buffersysteem en de eiwitten zullen dus uiteenvallen in hun individuele polypeptidenketens. Het proteïnemengsel wordt voor elektroforese bovendien ook nog verwarmd tot 90 °C en er wordt 2-mercaptoethanol aan toegevoegd zodat mogelijke disulfidebruggen verbroken worden.

Er wordt een discontinu buffersysteem gebruikt (de samenstelling en pH van de buffer in de gels is verschillend van de buffer in de elektroforesetanks) en het eiwitstaal wordt geladen op een wijdmazige concentratiegel. Doordat de eiwitten eerst gecomprimeerd worden tot een smalle zone in de concentratiegel, alvorens ze gescheiden worden op basis van grootte in het eigenlijke scheidingsgel, wordt een goede resolutie bekomen.

5.3.3.2 Reagentia en materiaal

In dit experiment wordt een 12 % acrylamidegel gebruikt omdat met eiwitten van middelmatige grootte wordt gewerkt. Acrylamide/Bis solution, Nanopur water en APS worden aangekocht bij firma Bio-Rad, CA, US. Tris-HCl wordt aangekocht bij firma Acros Organics, Geel en TEMED wordt aangekocht bij firma Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US.

Voor het bereiden van een 12 % acrylamide scheidingsgel wordt gebruikt gemaakt van 30 % Acrylamide/Bis solution, 0,75 mol/l Tris-HCl buffer pH 8,8, Nanopur water, 20 % SDS, 10 % APS en TEMED.

Voor het bereiden van een 4,02 % acrylamide concentratiegel wordt 30 % Acrylamide/Bis solution, 1,25 mol/l Tris-HCl buffer pH 6,8, Nanopur water, 20 % SDS, 10 % APS en TEMED gebruikt.

De Laemlli buffer (Bio-Rad, CA, US) die nodig is voor het verdunnen van de stalen wordt bereid door 62,5 mmol/l Tris-HCl buffer pH 6,8 samen te voegen met 25 % glycerol, 2 % SDS en 0,01 % bromofenolblauw. De oplossing wordt gestockeerd in aliquots van 475 μ l.

De moleculaire merker wordt aangekocht bij Bio-Rad onder de productnaam Precision Plus Protein Dual Color Standards.

Butanol (\pm 50 μ l) wordt aangekocht bij firma Chem-Lab, Zedelgem en wordt gebruikt om de luchtbellen en het schuim te verwijderen na het gieten van de scheidingsgel.

De running buffer wordt klaargemaakt door 100 ml van de 10 \times geconcentreerde TGS-buffer aan te lengen met ultra puur water (aangekocht bij firma Chem-Lab, Zedelgem) tot 1 liter. De 10 \times TGS-buffer (Bio-Rad, CA, US) heeft pH 8,3 en bevat 250 mmol/l Tris, 1,92 mol/l glycine en 1 % SDS.

Het toestel dat gebruikt wordt om de SDS-PAGE uit te voeren is het Mini Protean Tetra System dat aangekocht wordt bij firma Bio-Rad, CA, US.

Na elektroforese wordt de gel gekleurd met Coomassie Blauw. Dit product wordt aangekocht bij Bio-Rad, CA, US.

5.3.3.3 Methode

Gieten van de gel

Een kleine glasplaat en een spacer glasplaat worden samen in een houder geplaatst en de scheidingsgel wordt klaargemaakt. APS en TEMED worden pas op het einde toegevoegd aangezien de polymerisatie dan wordt gestart.

Wanneer de scheidingsgel klaar is, wordt deze tussen de twee glasplaten gepipetteerd. Vervolgens wordt een kleine hoeveelheid butanol (\pm 50 μ l) toegevoegd op de bovenkant van de scheidingsgel om luchtbellen en schuim te verwijderen. De gel moet nu gedurende 15 tot 20 minuten polymeriseren.

De bovenkant van de gel wordt dan met een stuk filterpapier droog gemaakt en de concentratiegel wordt bereid. Zodra de concentratiegel klaar is, wordt de lege ruimte boven de scheidingsgel hiermee opgevuld. De kam wordt in de concentratiegel geplaatst terwijl deze nog vloeibaar is. De concentratiegel moet gedurende 15 tot 20 minuten polymeriseren.

Preparatie van de te testen eiwitstalen

De eiwitstalen worden eerst verdund in 0,75 mol/l Tris-HCl buffer pH 8,8 tot een concentratie van 1 mg/ml. Vervolgens worden de eiwitstalen $2 \times$ verdund in reducerende Laemlli buffer (aan 475 μ l gewone Laemlli buffer wordt 25 μ l 2-mercaptoethanol toegevoegd). Bij 10 μ l reducerende Laemlli buffer wordt 10 μ l eiwitstaal gepipetteerd. De geprepareerde stalen worden nu gedurende 5 minuten bij 90 °C in een warmwaterbad geplaatst en vervolgens gecentrifugeerd bij 10 000 tpm (short spin).

Laden van de gels

De kam wordt eerst uit de concentratiegel verwijderd en de gel wordt in het Mini Protean Tetra System gemonteerd. Het toestel wordt nu gevuld met running buffer. In de eerste laan wordt 10 μ l van de moleculaire merker gepipetteerd en in de volgende lanen wordt nu telkens 10 μ g eiwit aangebracht. Het toestel wordt ingesteld op 150 V en de elektroforese duurt ongeveer 2 uur.

Na afloop van de elektroforese wordt de gel uit het toestel gehaald en worden de glasplaten voorzichtig verwijderd. De gel wordt dan 3 keer schuddend in gedestilleerd water gewassen gedurende 5 minuten. Na de wasstap wordt de gel gekleurd met Coomassie Blauw gedurende 24 uur. Ten slotte wordt de gel gedurende 1 uur gespoeld met gedestilleerd water en vervolgens ingescand.

5.4 CELKWEEK

5.4.1 Principe

Voor dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van CHO-CCK1R-cellen, die werden verkregen bij Prof. R. Smeets (Universiteit van Nijmegen) en van CHO-K1 cellen die werden verkregen bij Prof. Leclercq (UZ Gent, Departement van klinische biologie, microbiologie en immunologie).

De CHO-CCK1R-cellen worden gekweekt in Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium and Ham's F12 medium 1:1 (D-MEM/F-12) met G-418. G-418 of het antibioticum geneticine doodt de cellen die geen CCK1-receptor tot expressie brengen. De CHO-cellen die wel een CCK1-receptor tot expressie brengen, kunnen groeien in aanwezigheid van geneticine in het kweekmedium omdat de getransfecteerde cellen ook het resistentiegen voor geneticine bezitten. De CHO-K1 cellen worden gekweekt in Advanced D-MEM/F-12 zonder additie van geneticine.

5.4.2 Reagentia en materiaal

Voor de celkweek worden Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) zonder Ca en Mg, 0,05 % Trypsine-EDTA oplossing, Advanced D-MEM/F-12 en G-418 aangekocht bij firma Invitrogen™, Paisley, UK. Advanced D-MEM/F-12 wordt aangevuld met 1 % L-glutamine, 10 % foetaal kalfserum (aangekocht bij firma Invitrogen™, Paisley, UK), 500 µg/ml penicilline en 500 U/ml streptomycine.

5.4.3 Methode

Het medium wordt uit de T25 kweekfles weggehaald en vervolgens wordt met een steriele pipet 2 ml PBS toegevoegd aan de kweekfles. De fles wordt gekanteld zodat de cellen goed gewassen worden, maar de cellen mogen niet van de bodem gespoeld worden. De PBS wordt na de wasstap weggenomen met de pipet zonder de cellen te verstoren. De cellen worden nu losgemaakt door 1 ml trypsine toe te voegen en de kweekfles gedurende 1 minuut bij 37 °C in een incubator te plaatsen die 5 % CO₂ bevat. Na de korte incubatietijd, wordt een kloppje op de zijkant van de fles gegeven om zeker te zijn dat de cellen van de bodem zijn losgekomen. Dan wordt er 4,5 ml medium toegevoegd om de cellen te "blussen". Het flesje wordt een paar keer gespoeld met dit medium (vooral de bodem) en het geheel wordt opgezogen en overgebracht naar een gelabelde falcontube van 15 ml. De falcontube wordt nu gedurende 5 minuten bij 1000 tpm en bij kamertemperatuur gecentrifugeerd.

Ondertussen wordt een nieuwe kweekfles (T25) klaargezet en cellijn, passagenummer, datum en verdunning worden vermeld. Aan de kweekfles wordt vers medium toegevoegd en na centrifugatie wordt met een steriele pipet het supernatans opgezogen, zonder de pellet te verstoren.

De cellen (aanwezig in de pellet) worden nu geresuspendeerd in een hoeveelheid medium. Het toegevoegde medium en de pellet worden meerdere malen krachtig opgezogen met een steriele pipet en terug uitgeduwd. Indien de cellen worden gesplitst, zal een deel van de geresuspendeerde cellen overgebracht worden naar de kweekfles, afhankelijk van de gewenste verdunning. Indien de cellen worden verhuisd, zullen alle cellen overgebracht worden naar een grotere kweekfles. Aan de kweekflessen met CHO-CCK1R-cellen wordt 10 µl G-418 per ml medium toegevoegd.

5.5 CCK-RECEPTORACTIVATIETEST

5.5.1 Principe

Via de CCK-receptoractivatietest zal de biologische activiteit van peptiden (mengsels) bestudeerd worden aan de hand van biotoetsen uitgevoerd op gecultiveerde CHO-CCK1R-cellen. Indien een peptide bindt met een CCK1-receptor, zal de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie wijzigen. Als gevolg van de wijziging van de Ca^{2+} -concentratie ontstaat er een fluorescent signaal door binding met Fluo-4AM, dat een maat is voor de activatie van de CCK1-receptor. Het fluorescente signaal kan gemeten worden met een TECAN microtiterplaatlezer voor fluorescentie/luminescentie. De gecultiveerde CHO-K1 cellen worden tijdens de test gebruikt als negatieve controle.

5.5.2 Reagentia en materiaal

Een zwarte, 96-well, steriele microtiterplaat voor weefselkweek met transparante bodem wordt aangekocht bij firma Greiner, Frickenhausen, Germany. HEPES, probenecide en BSA worden aangekocht bij firma Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US. Voor dit experiment is een 1 mol/l HEPES-oplossing met pH 7,4 nodig. De bereide oplossing wordt bewaard bij 4 °C. Er wordt ook een 250 mmol/l probenecide-oplossing aangemaakt.

D-MEM/F-12 (Ham) met L-glutamine en 15 mmol/l HEPES, 10 × Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) + $CaCl_2$ + $MgCl_2$, Fluo-4AM en Pluronic-F127 worden aangekocht bij firma Invitrogen™, Paisley, UK.

De cellen worden geteld met behulp van de Bürker-telkamer en er wordt berekend hoeveel cellen aanwezig zijn per ml medium. Vervolgens wordt een verdunning van 200 000 cellen/ml gemaakt en wordt in elke well van de microtiterplaat 200 µl cellen uitgezaaid.

Kleurmedium wordt bereid door D-MEM/F-12 aan te vullen tot 4 $\mu\text{mol/l}$ Fluo-4AM, 0,07 % BSA, 1,6 mmol/l probenecide en 0,02 % Pluronic F-127.

De buffer bevat 1 \times HBSS, 20 mmol/l HEPES, 2,5 mmol/l probenecide en 1 mg/ml BSA. De bufferoplossing wordt op pH 7,4 gebracht.

De commercieel beschikbare CCK1-receptor-agonist CCK-8S en de thrombine-receptor-agonist TRAP-7 worden aangekocht bij firma Bachem, Weil am Rhein, Germany.

5.5.3 Methode

De cellen, uitgezaaid in microtiterplaten, worden gedurende 24-32 uur geïncubeerd in een broedstuf bij 37 °C en 5 % CO₂. Na incubatie wordt het medium in een snelle en korte beweging weggegoten en wordt 50 μl van het bereide kleurmedium toegevoegd aan elke well van de microtiterplaat. De cellen worden gedurende 1 uur bij kamertemperatuur en in een donkere omgeving geïncubeerd. Ondertussen worden de te testen stalen klaargemaakt en verdund in bufferoplossing. Na incubatie wordt het kleurmedium weggegoten en wordt elke well 2 \times met 150 μl buffer gewassen. Tot slot wordt 100 μl buffer toegevoegd aan elke well en kan de meting starten.

5.5.4 Meting met microtiterplaatlezer voor fluorescentie/luminescentie

Wijzigingen in de intracellulaire Ca²⁺-concentraties worden geregistreerd door veranderingen in fluorescentiesignalen te meten met een microtiterplaatlezer voor fluorescentie (Tecan i-control, infinite M200).

De golflengte voor excitatie (λ_{exc}) bedraagt 480 nm en voor emissie (λ_{em}) 520 nm. Het aantal flashes wordt vastgelegd op 10, de meetpunten op 120. Injectie van het staal of CCK-8S gebeurt na 20 meetpunten of ongeveer 8 seconden. Het pipetteervolume bedraagt 100 μl en de pipetteersnelheid wordt ingesteld op 100 $\mu\text{l}/\text{seconde}$. Meting van de fluorescentie gebeurt om de 0,3 à 0,4 seconden en de totale meettijd voor 1 well bedraagt ongeveer 42 seconden. De meettijd die vereist is voor een volledige microtiterplaat bedraagt dan 67 seconden.

6 RESULTATEN EN DISCUSSIE

6.1 OPZUIVEREN VAN EIWITTEN UIT SOJABONEN

De isolatie van de 11S en 7S globulinefractie uit sojabonen werd tijdens de stageperiode drie keer uitgevoerd aan de hand van een pH-precipitatie. De eiwitcomponenten hebben de eigenschap om neer te slaan bij een verschillende pH en konden op die manier dus geïsoleerd worden. In tabel 2 wordt het rendement met standaardafwijking van glycine (11S) en β -conglycine (7S) na isolatie uit ontvette sojabloem weergegeven. Het rendement werd berekend door het gemiddelde te bepalen van de drie experimenten.

Tabel 2 Rendement en standaardafwijking van de 11S en 7S globulinefractie

Gelyofiliseerd poeder 11S =	2 ± 2	m/m %
Gelyofiliseerd poeder 7S =	$5,7 \pm 0,4$	m/m %

Het rendement van de 11S globulinefractie uit ontvette sojabloem bedroeg 2 ± 2 m/m % en het rendement van de 7S globulinefractie uit ontvette sojabloem bedroeg $5,7 \pm 0,4$ m/m %.

6.2 KARAKTERISATIE VAN OPGEZUIVERDE EN GEHYDROLYSEERDE EIWITTEN

6.2.1 Eiwitbepaling volgens Kjeldahl

De eiwitbepaling volgens de methode van Kjeldahl werd uitgevoerd op ontvette sojabloem en op de 11S en 7S globulinefractie in drie herhalingen. In tabel 3 wordt een overzicht gegeven van het gemiddeld eiwitgehalte per eiwit met vermelding van de standaardafwijking.

Tabel 3 Gemiddeld eiwitgehalte per eiwit en standaardafwijking

Eiwitstaal	<u>Eiwitgehalte en standaardafwijking</u> m/m %
Ontvette sojabloem	37 ± 1
11S fractie	$89,2 \pm 0,8$
7S fractie	82 ± 5

Uit bovenstaande gegevens kan afgeleid worden dat er in de 11S en 7S globulinefractie meer eiwit aanwezig was dan in de onvette sojabloem.

De resultaten tonen aan dat de eiwitgehalten van de 11S en 7S globulinefracties uit sojabonen voldoende groot waren, maar geven geen informatie over het soort eiwit. Uit een combinatie van de resultaten van de eiwitbepaling volgens Kjeldahl en SDS-PAGE kan dan besloten worden of de opzuivering al dan niet goed gelukt is.

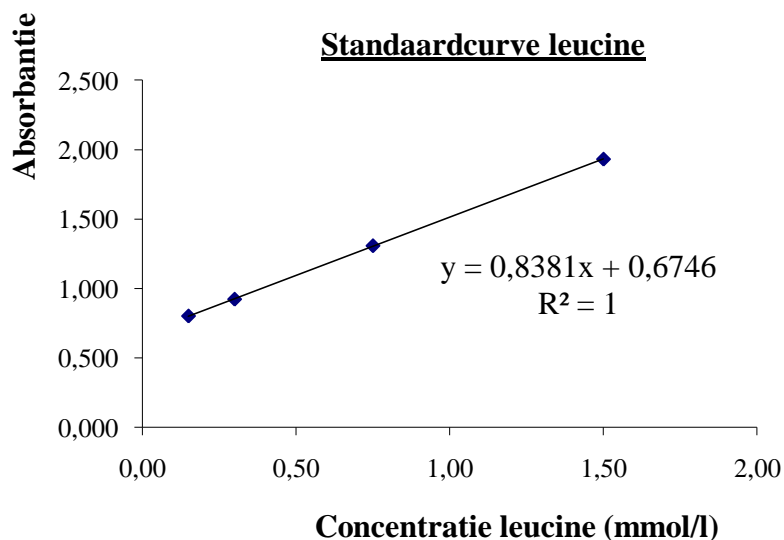
6.2.2 Hydrolysegraad van eiwitten bepalen

Voor het bepalen van de hydrolysegraad van eiwitten werd eerst een kalibratielijn met leucinestandaardoplossingen opgesteld. Uit de kalibratielijn kon dan de concentratie aan terminale aminogroepen in de stalen bepaald worden door het meten van de absorbantie.

6.2.2.1 Hydrolysegraad van wei-eiwitten: BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline

De commercieel verkrijgbare wei-eiwitten BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline werden afzonderlijk gehydrolyseerd via een simulatie van de gastro-intestinale vertering (GIV) door gebruik te maken van de enzymen pepsine, trypsine en α -chymotrypsine zoals eerder vermeld onder 5.2.

In figuur 6 wordt een kalibratielijn van leucine weergegeven. De kalibratielijn werd opgesteld met 4 standaardoplossingen met concentraties van 0,15 mmol/l, 0,30 mmol/l, 0,75 mmol/l en 1,5 mmol/l leucine in 1 % SDS.



Figuur 6 Kalibratielijn van leucine met vergelijking

De absorbanties werden spectrofotometrisch bepaald bij 340 nm met een microtiterplaat spectrofotometer. De absorbantie wordt weergegeven in functie van de concentratie leucine. De R^2 -waarde van de leucine standaardreeks bedraagt 1. Hieruit blijkt dat voor de leucine standaard een lineair verband werd bekomen tussen de gemeten absorbantiewaarden en de concentraties.

De vergelijking van de standaardcurve werd gebruikt om de gemeten absorbantiewaarden om te zetten naar NH_2 -equivalenten. De hydrolysegraad van de eiwitstalen werd dan uitgerekend volgens het voorbeeld dat vermeld staat onder 5.3.2.3.

De metingen voor het bepalen van de hydrolysegraad van BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline, na simulatie van de GIV, werden in viervoud uitgevoerd. In tabel 4 wordt een overzicht gegeven van de hydrolysegraad die bekomen werd voor de vier metingen en de gemiddelde hydrolysegraad per eiwit met standaardafwijking.

Tabel 4 Hydrolysegraad voor BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline na GIV

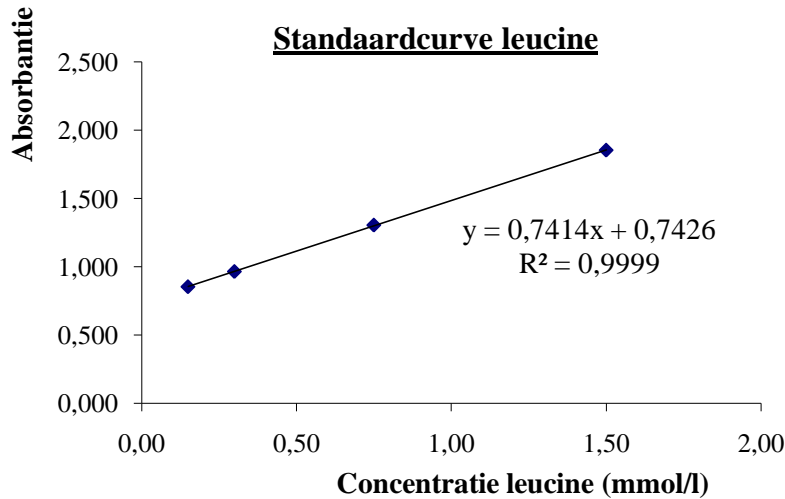
Eiwit	<u>Hydrolysegraad</u>				<u>Gemiddelde hydrolysegraad</u>	<u>Standaardafwijking</u>
	%				%	%
BSA	9,0	10	10	9,9	9,7	0,5
α -lactalbumine	8,8	9,7	9,6	8,7	9,2	0,6
β -lactoglobuline	8,4	8,0	8,3	7,4	8,0	0,5

Uit bovenstaande gegevens kan afgeleid worden dat de hydrolysegraad van de wei-eiwitten BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline, zich na uitvoeren van een simulatie van de gastro-intestinale vertering rond 10 % situeerde. Dit betekent dat de peptiden een gemiddelde lengte van 10 aminozuren hadden.

6.2.2.2 Hydrolysegraad van glycinine (11S) en β -conglycinine (7S)

De opgezuiverde soja-eiwitten glycinine (11S) en β -conglycinine (7S) werden afzonderlijk gehydrolyseerd via een simulatie van de gastro-intestinale vertering door gebruik te maken van de enzymen pepsine, trypsine en α -chymotrypsine zoals eerder vermeld onder 5.2.

In figuur 7 wordt een kalibratielijne van leucine weergegeven. De R^2 -waarde van de leucine standaardreeks bedraagt 0,9999. Hieruit blijkt dat voor de leucine standaard een lineair verband werd bekomen tussen de gemeten absorbantiewaarden en de concentraties.



Figuur 7 Kalibratielijn van leucine met vergelijking

De hydrolysegraad van de soja-eiwitten werd op analoge wijze berekend als bij de wei-eiwitten. De metingen voor het bepalen van de hydrolysegraad van glycine (11S) en β -conglycine (7S), na simulatie van de GIV, werden zesvoudig uitgevoerd. In tabel 5 wordt een overzicht gegeven van de hydrolysegraad die bekomen werd voor de zes metingen en de gemiddelde hydrolysegraad per eiwit met standaardafwijking.

Tabel 5 Hydrolysegraad voor glycine (11S) en β -conglycine (7S) na GIV

Eiwit	<u>Hydrolysegraad</u>						<u>Gemiddelde hydrolysegraad</u>	<u>Standaardafwijking</u>
	%						%	%
Glycine	5,7	5,9	5,7	5,2	5,6	5,4	5,6	0,3
β -conglycine	6,2	5,6	5,9	6,0	6,0	6,1	6,0	0,3

Uit bovenstaande gegevens kan afgeleid worden dat de hydrolysegraad van de soja-eiwitten glycine (11S) en β -conglycine (7S), na uitvoeren van een simulatie van de gastro-intestinale vertering, varieerde tussen 5,2 % en 6,2 %. De hydrolysegraad voor glycine (11S) bedroeg $5,6 \pm 0,3$ % en voor β -conglycine $6,0 \pm 0,3$ %. Uit deze resultaten kan afgeleid worden dat de soja-eiwitten een gemiddelde lengte hadden van 20 aminozuren.

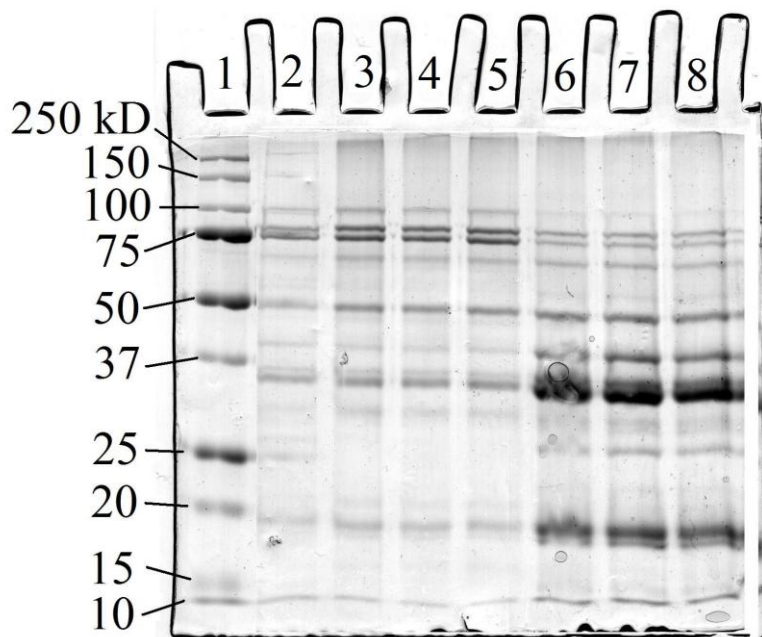
Na bepaling van de hydrolysegraad van melkeiwitten en soja-eiwitten kan besloten worden dat de melkeiwitten een hogere hydrolysegraad hadden dan de soja-eiwitten. De melkeiwitten zijn beter oplosbaar dan de soja-eiwitten omdat de aminozuren meer hydrofiele restgroepen bevatten. Hierdoor kunnen de melkeiwitten dus gemakkelijker gehydrolyseerd worden dan de soja-eiwitten.

6.2.3 SDS-PAGE

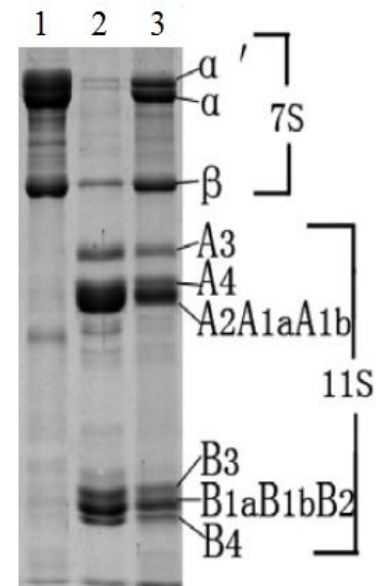
Na opzuivering en isolatie van de twee grootste eiwitcomponenten, glycinine (11S) en β -conglycinine (7S) uit ontvette sojabloem, werd gebruik gemaakt van SDS-PAGE om de eiwitfracties te karakteriseren en te scheiden op basis van grootte.

In figuur 8 a) wordt het resultaat van SDS-PAGE op gel weergegeven. In laan 1 werd de gebruikte moleculaire merker (Precision Plus Protein Dual Color Standards van Bio-Rad) aangebracht, in laan 2 de ontvette sojabloem, in laan 3, 4 en 5 de 7S fractie en in laan 6, 7 en 8 de 11S fractie. In figuur 8 b) wordt het resultaat weergegeven nadat de 11S en 7S fracties geïsoleerd werden uit sojabonen met de geoptimaliseerde isolatiemethode volgens Liu et al. (2007) [20]. In laan 1 bevond zich de 7S fractie, in laan 2 de 11S fractie en in laan 3 bevond zich het totale sojabooneiwit.

a)



b)



Figuur 8 a) Resultaten op gel na uitvoering van SDS-PAGE: bandenpatronen van de ontvette sojabloem en de 7S en 11S fractie zijn zichtbaar, b) resultaat van SDS-PAGE met 7S en 11S fractie en het totale sojabooneiwit volgens Liu et al. (2007) [20]

Uit de bandenpatronen in figuur 8 is zichtbaar dat de moleculaire merker een duidelijke ladder vormde en dat de elektroforese dus goed is doorgegaan.

In laan 3, 4 en 5 zijn de α , α' en β subunits van de 7S fractie zichtbaar, maar uit de onderste bandenpatronen kan geconcludeerd worden dat de 7S fractie toch licht gecontamineerd was met de 11S fractie. In lanen 6, 7 en 8 kunnen de A_3 , $A_4A_2A_{1a}A_{1b}$, B_3 , $B_{1a}B_{1b}B_2$ en B_4 subunits van de 11S fractie onderscheiden worden en kan ook vastgesteld worden dat de 11S fractie licht gecontamineerd was met de 7S fractie.

Aan de hand van bovenstaande resultaten en gegevens kan besloten worden dat de opzuivering en isolatie van de 11S en 7S fractie uit sojabonen volgens de methode beschreven onder 5.1.3 goed verlopen is, maar dat er toch nog enige contaminatie werd vastgesteld.

Afgezien van de iets hogere contaminatie van de eigen opgezuiverde eiwitten uit ontvette sojabloem, leek het bekomen bandenpatroon op gel toch goed op datgene dat bekomen werd door Liu et al. (2007).

6.3 CCK-RECEPTORACTIVATIETEST

6.3.1 Inleiding

Fluo-4AM bestaat in zijn natieve vorm als een celdoordringende acetoxymethyl (AM) ester die via passieve diffusie doorheen de celmembraan de cel kan binnendringen. Zodra Fluo-4AM in de cel is binnengedrongen, wordt de esterbinding door esterases gehydrolyseerd en krijgt het een negatieve lading.

Op die manier kan de fluorescente component de cel niet meer verlaten via passief transport en is het dus in staat om met positief geladen moleculen te binden. Alleen de gehydrolyseerde vorm van Fluo-4AM kan binden met het intracellulair aanwezige Ca^{2+} en door deze binding ontstaat dan een fluorescent signaal. De test is gebaseerd op het “Calcium Reporter Assay for the Determination of CCK1R activation” by Foltz et al. (2008).

In een eerste fase van de CCK-receptoractivatietest werd getracht om de testprocedure te optimaliseren door gebruik te maken van de commercieel beschikbare CCK1-receptoragonist, het natuurlijk ligand CCK-8S. In een latere fase van het onderzoek kon dan aan de hand van de in vitro biotoetsen onderzocht worden in welke mate de hydrolysaten uit voedingseiwitten bonden aan de CCK1-receptor en een gelijkaardige celrespons uitlokten als het natuurlijk ligand CCK.

Het uiteindelijke doel van de CCK-receptoractivatietest was de concentratieafhankelijke activiteit van receptorliganden te bepalen.

6.3.2 Algemene informatie

De fluorescentie (f_i) werd well per well kinetisch gemeten. De meetwaarden na injectie (hierna respons genoemd) werden gedeeld door het gemiddelde van de meetwaarden voor injectie (f_0) om te corrigeren voor de hoeveelheid cellen.

6.3.3 Optimalisatie van de testprocedure

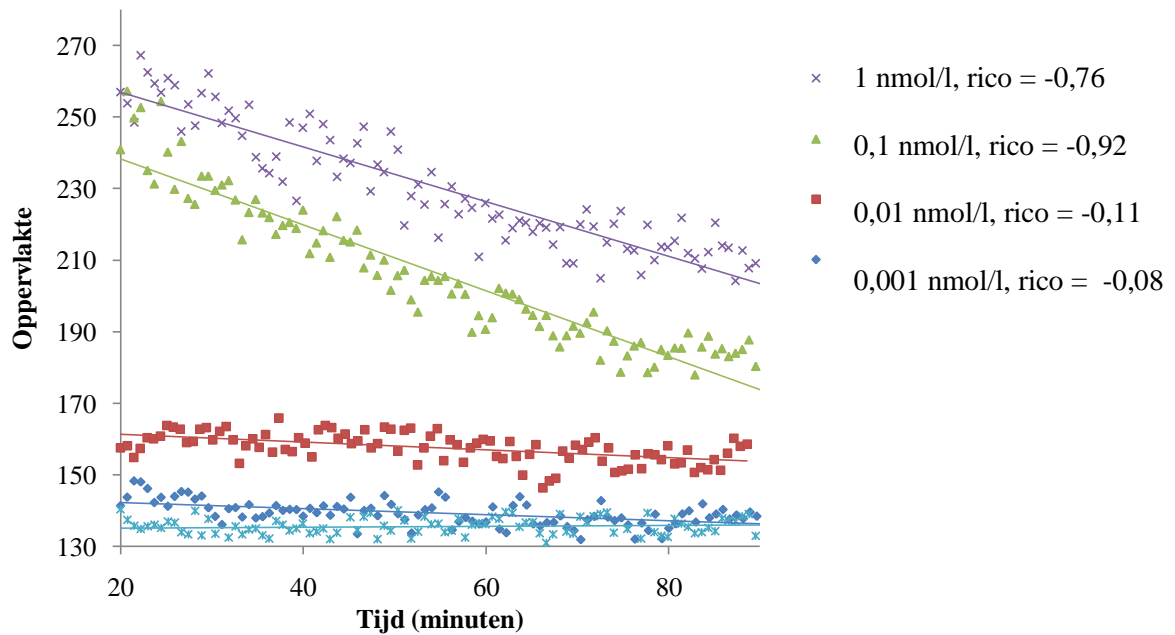
Omdat de cellen zich gedurende het experiment niet in optimale condities bevonden, is het dus mogelijk dat de cellen doorheen de tijd een deel van hun responsiviteit verloren. Het doel van deze fase van het experiment was om een stabiele respons te bekomen voor alle concentraties van het natuurlijk ligand (CCK-8S) doorheen de tijd. Volledige microtiterplaten werden uitgezaaid met CHO-CCK1R-cellen en getest met één concentratie CCK-8S. De bufferoplossing werd gebruikt als blanco. Bij aanvang van het experiment werden de condities voor de meettemperatuur (T_m) en de concentraties aan probenecide (C_p) in de bufferoplossing, zoals beschreven door Foltz et al. (2008), gebruikt. De oppervlaktes onder de bekomen curves (tijd in functie van f_i/f_0) werden uitgezet in functie van de tijd.

De microtiterplaat werd voorbereid zoals beschreven onder 5.5.3 en vervolgens gedurende 10 minuten geïncubeerd in de TECAN microtiterplaatlezer voor fluorescentie/luminescentie op meettemperatuur. De fluorescentiemeting startte telkens 20 minuten na het wassen van de plaat.

Omdat bij de geteste condities voor T_m en C_p , zoals beschreven door Foltz et al. (2008), een grote daling in fluorescentierespons vastgesteld werd doorheen de tijd, werden verschillende combinaties van temperatuur en concentraties aan probenecide getest voor een concentratie van 10 nmol/l CCK. Op die manier werd een ruw idee bekomen van betere testcondities voor T_m en C_p .

In figuur 9 wordt de verandering in respons voor verschillende concentraties CCK bij 37 °C en bij 2,5 mmol/l probenecide doorheen de tijd weergegeven. Op elk tijdstip werd de respons (uitgedrukt als oppervlakte onder de curve) van een nieuwe well gemeten.

37 °C



Figuur 9 Verandering in respons voor verschillende concentraties CCK, gemeten bij 37 °C en 2,5 mmol/l probenecide

De testcondities en resulterende richtingscoëfficiënten van de verandering in respons doorheen de tijd voor verschillende combinaties van temperatuur en concentraties aan probenecide in de bufferoplossing, worden weergegeven in tabel 6.

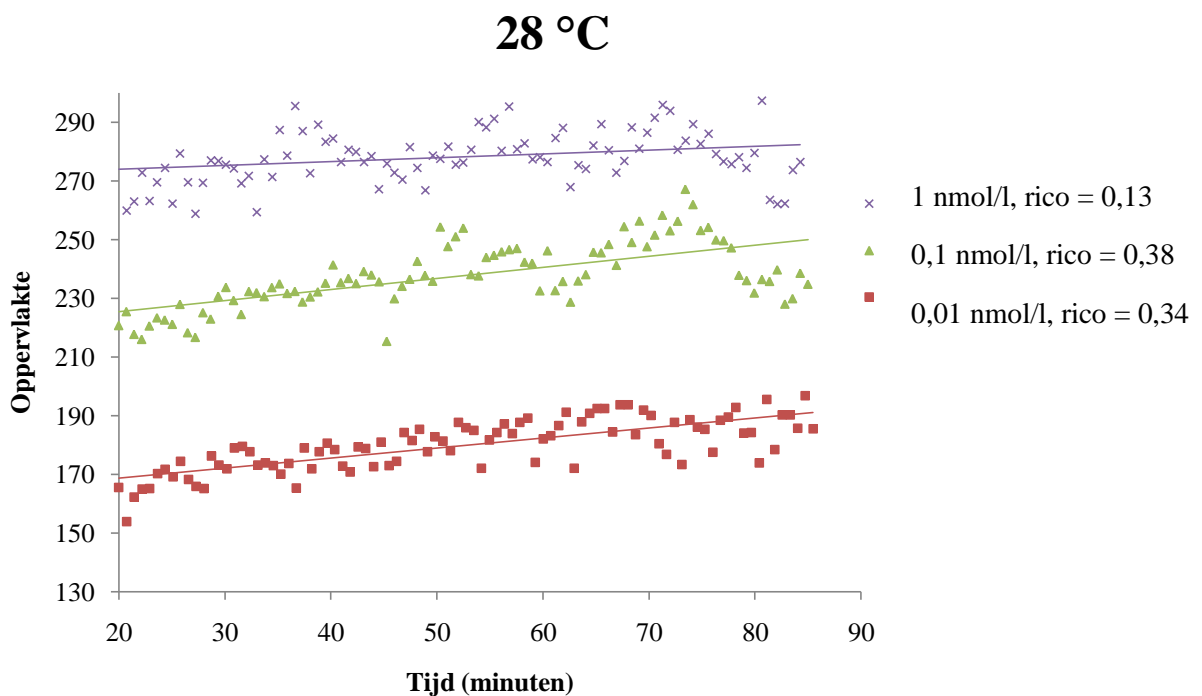
Tabel 6 Richtingscoëfficiënt van de verandering in respons doorheen de tijd bij verschillende temperaturen en concentraties aan probenecide voor 10 nmol/l CCK, uitgedrukt als daling van de oppervlakte per tijdseenheid

		<u>Concentratie probenecide</u>		
		(mmol/l)		
<u>Temperatuur</u> (°C)		3,5	3	2,5
	37	-0,10 ± 0,04	-0,45 ± 0,10	-0,50 ± 0,12
	30	0,11 ± 0,05	-0,13 ± 0,07	-0,20 ± 0,04
	29	-	0,36 ± 0,05	0,22 ± 0,08
	28	-	0,49 ± 0,05	0,09 ± 0,06

De resultaten in tabel 6 tonen aan dat de respons stabiel bleef in functie van de tijd wanneer de concentratie aan probenecide verhoogd werd en/of de temperatuur verlaagd werd.

Bij lagere temperaturen veroorzaakte een hogere concentratie aan probenecide een stijging van de respons doorheen de tijd. Omdat probenecide een toxische component is voor de cellen (aangeraden concentratie varieert van 1,0 tot 2,5 mmol/l), werd eerst de stabiliteit van de respons doorheen de tijd getest voor verschillende concentraties CCK bij lagere temperatuur (28 °C).

In figuur 10 wordt de verandering in respons voor verschillende concentraties CCK bij 28 °C en bij 2,5 mmol/l probenecide doorheen de tijd weergegeven.



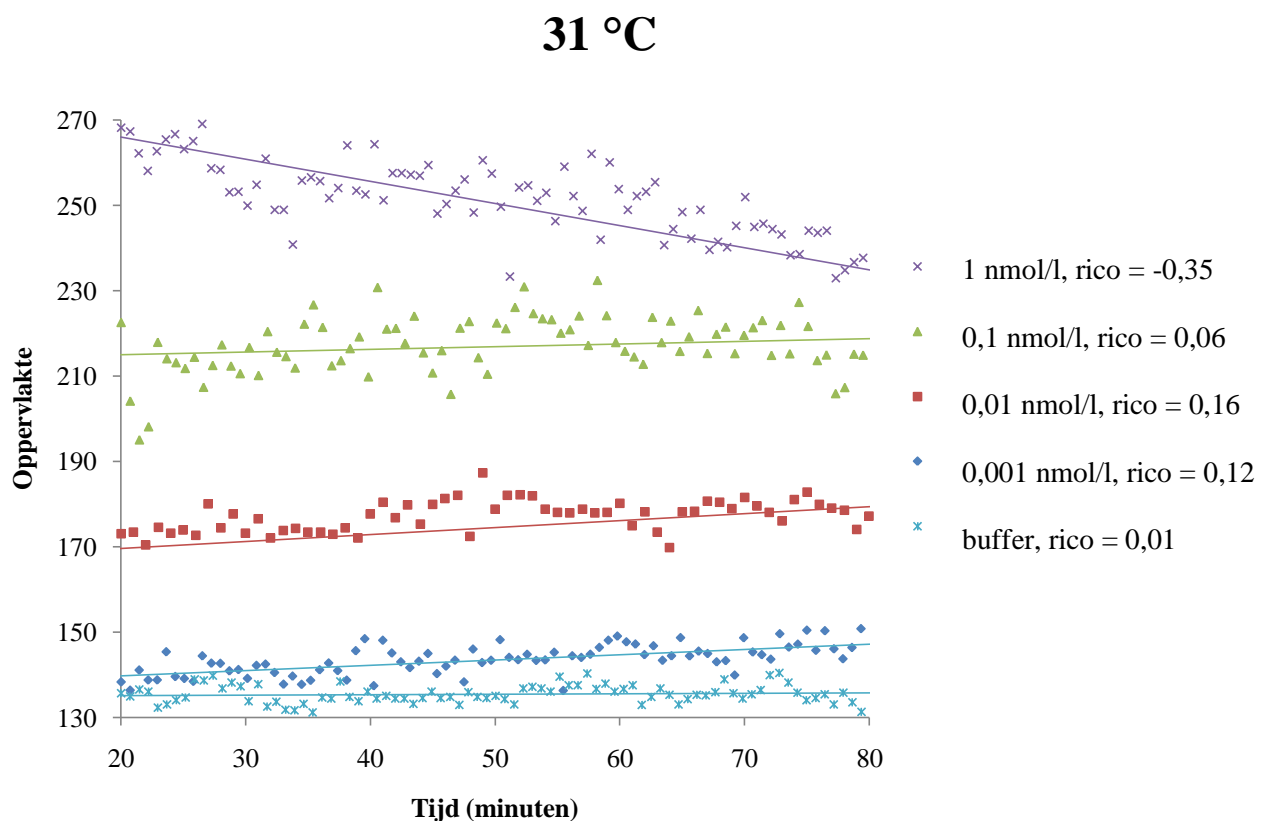
Figuur 10 Verandering in respons voor verschillende concentraties CCK, gemeten bij 28 °C en 2,5 mmol/l probenecide

De richtingscoëfficiënten van de verandering in respons voor verschillende concentraties CCK bij 28 °C daalden minder in vergelijking met de test bij 37 °C. Bij 37 °C vertoonden vooral de hogere concentraties CCK een grote daling in respons doorheen de tijd. De lagere concentraties waren meer stabiel.

Door verlaging van de meettemperatuur werd de respons van de hogere concentraties CCK meer stabiel, maar tegelijkertijd veroorzaakte de lagere temperatuur ook een stijging van de respons doorheen de tijd bij de lagere concentraties CCK.

Aangezien de temperatuur van het vorige experiment te laag was voor de lagere concentraties CCK, werd een temperatuur tussen 28 °C en 37 °C getest. Er werd gekozen voor een temperatuur van 31 °C omdat deze temperatuur dichterbij 28 °C dan bij 37 °C en omdat de test bij 28 °C betere resultaten opleverde. Bij deze temperatuur was de respons stabiel voor concentraties tot 0,1 nmol/l CCK. Het was vooral belangrijk dat de fluorescentie van deze concentraties CCK stabiel was aangezien de fluorescentie van de eiwithydrolysaten binnen dit bereik gesitueerd werd.

In figuur 11 wordt de verandering in respons voor verschillende concentraties CCK bij 31 °C en bij 2,5 mmol/l probenecide doorheen de tijd weergegeven.



Figuur 11 Verandering in respons voor verschillende concentraties CCK, gemeten bij 31 °C en 2,5 mmol/l probenecide

De daling van de respons in functie van de tijd kan veroorzaakt worden door lekkage van Fluo-4AM uit de cel door actief transport van anionpompen. Om lekkage van de fluorescente component uit de cel te vermijden kan enerzijds de concentratie aan probenecide verhoogd worden of kan anderzijds de meettemperatuur verlaagd worden.

Probenecide is een aniontransportinhibitor en door verlaging van de meettemperatuur zal het metabolisme van de cel verminderen. Via beide methoden kan actief transport van Fluo-4AM uit de cel dus verhinderd worden.

Bovenstaande hypothese kan correct zijn voor de hogere concentraties CCK, maar geeft nog geen correcte verklaring voor de lagere concentraties CCK waarbij een verhoging van de respons doorheen de tijd werd vastgesteld.

Bij lagere meettemperaturen zou de hydrolyse van Fluo-4AM trager kunnen doorgaan zodat een lagere concentratie aan negatief geladen Fluo-4AM aanwezig is in de cel. Dit gegeven heeft waarschijnlijk een geringer effect op de hogere concentraties CCK omdat de celrespons toch zijn maximum bereikt, maar het zou wel de lagere concentraties CCK kunnen beïnvloeden omdat lagere concentraties CCK ook lagere concentraties aan Ca^{2+} veroorzaken en op die manier zal de kans op binding tussen Fluo-4AM en Ca^{2+} kleiner zijn. Wanneer er meer Fluo-4AM beschikbaar is in de cel, zal er meer interactie kunnen doorgaan tussen de fluorescente component en Ca^{2+} . Dit laatste probleem kan opgelost worden door de tijd tussen de wasstap van de plaat en de aanvang van de meting te verlengen. Op die manier kan al het Fluo-4AM gehydrolyseerd worden. Tot slot kan gesteld worden dat een goed evenwicht tussen de juiste meettemperatuur, de probenecide concentratie en de tijd tussen de wasstap en de aanvang van de meting dus erg belangrijk is.

Uit bovenstaande resultaten kan besloten worden dat een meettemperatuur van 31 °C en een concentratie van 2,5 mmol/l probenecide in de bufferoplossing optimale condities zijn voor de CCK-receptoractivatietest.

6.3.4 Functionaliteit van de CHO-K1 cellen

CHO-cellen brengen verschillende soorten receptoren tot expressie zoals o.a. de thrombine-receptor. Deze receptor kan geactiveerd worden door het thrombine-activerende peptide TRAP-7. Om te controleren of de gecultiveerde CHO-K1 cellen als een betrouwbare negatieve controle konden fungeren, werd de respons van CHO-K1 cellen getest met de thrombine-receptor-agonist TRAP-7.

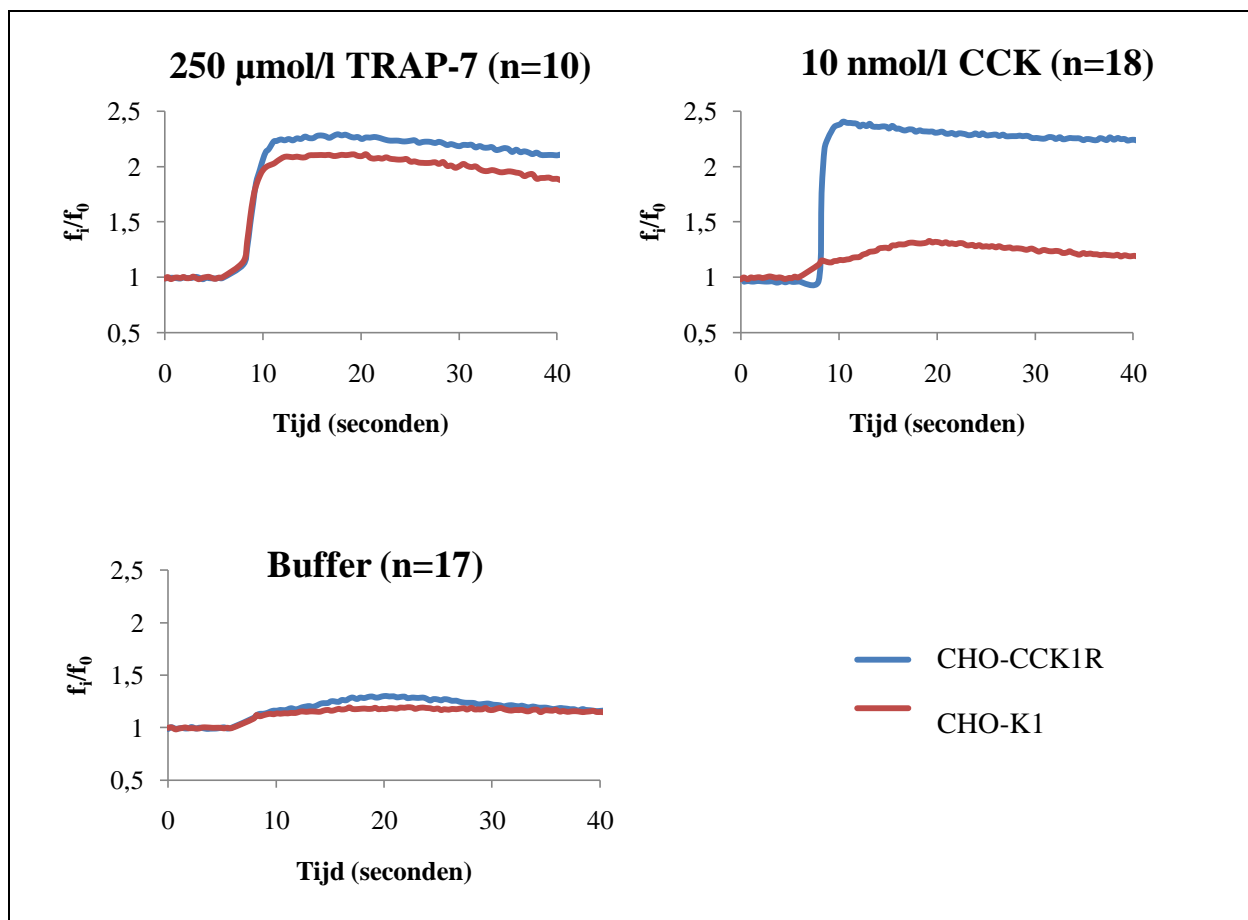
In figuur 12 worden de resultaten weergegeven van de test op CHO-K1 en CHO-CCK1R-cellen met 250 $\mu\text{mol/l}$ TRAP-7, 10 nmol/l CCK en bufferoplossing.

Zoals verwacht reageerden zowel de CHO-K1 cellen als de CHO-CCK1R-cellen beiden op TRAP-7 omdat beide celtypes de thrombine-receptor tot expressie brengen.

De resultaten stemmen ook overeen met de theoretische verwachtingen aangezien uitsluitend de CHO-CCK1R-cellen reageerden op CCK-8S en geen van beide celtypes reageerde op de bufferoplossing.

Injectie van de bufferoplossing veroorzaakte slechts een kleine stijging van de f_i/f_0 ratio's, door een toename van het volume in de well en dit is inherent aan de meetapparatuur. Wells zonder cellen vertoonden ook een hogere fluorescentie wanneer ze geladen werden met een groter volume (data worden niet weergegeven).

Uit figuur 12 kan afgeleid worden dat aan de hand van de CCK1-receptoractivatietest een onderscheid kan gemaakt worden tussen liganden die de CCK1-receptor activeren en liganden die de CCK1-receptor niet activeren.



Figuur 12 Kinetisch verloop van de respons van CHO-K1 en CHO-CCK1R-cellen na injectie met TRAP-7, 10 nmol/l CCK en bufferoplossing

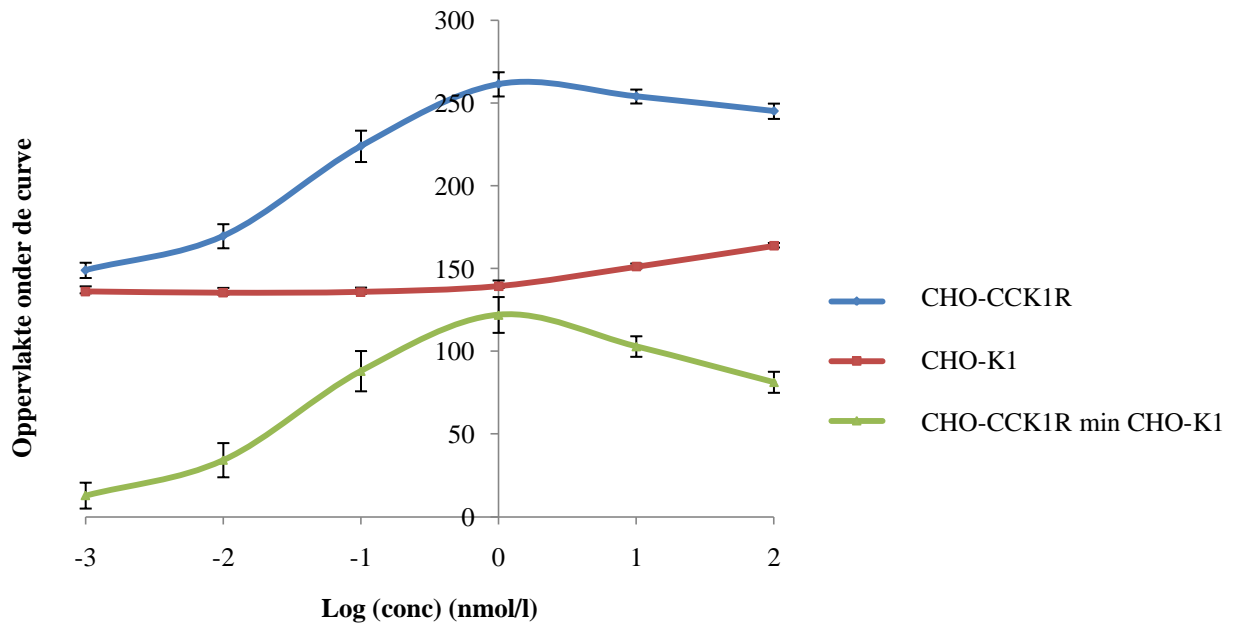
6.3.5 Standaardcurve CCK-8S

Om een standaardcurve op te stellen werden toenemende concentraties CCK-8S getest in een microtiterplaat waarvan de helft uitgezaaid was met CHO-CCK1R-cellen en de andere helft met CHO-K1 cellen.

De oppervlakte onder de curve (tijd in functie van f_i/f_0) van de CHO-K1 cellen werd berekend en afgetrokken van de oppervlakte onder de curve van de CHO-CCK1R-cellen. Deze gecorrigeerde oppervlakte werd genormaliseerd door te delen door de gecorrigeerde oppervlakte van de curve met de maximale respons (1 nmol/l CCK). Op die manier werd de toename in fluorescentie door activatie van de CCK1R na injectie van een bepaalde concentratie CCK uitgedrukt als een percentage van de maximale respons.

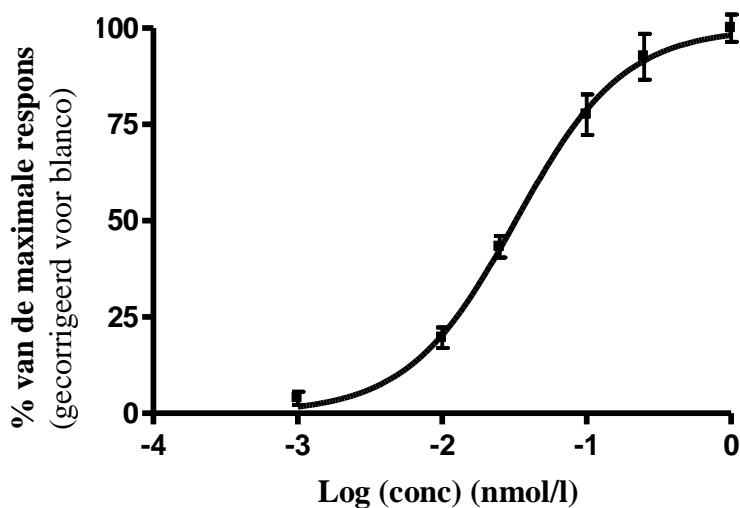
Elke test werd in minstens vijf wells herhaald om de interwell-variantie in rekening te brengen. In de eerste plaats werd een ruwe niet-genormaliseerde dosis-respons curve opgesteld om een schatting te maken van de maximale en minimale respons. Nadien werd deze curve verfijnd en werd de EC_{50} -waarde berekend met het programma GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). De EC_{50} -waarde is die concentratie van het product waarbij 50 % van de maximaal mogelijke respons voor dat product wordt bereikt.

Figuur 13 stelt een ruwe standaardcurve voor van de respons bij toenemende concentraties CCK op CHO-CCK1R-cellen en CHO-K1 cellen. Uit deze grafiek kan afgeleid worden dat de maximale respons bereikt werd bij 1 nmol/l CCK. Hogere concentraties CCK zorgden voor een lagere respons omdat deze concentraties schijnbaar ook de CHO-K1 cellen activeerden. De resterende oppervlakte onder de curve van de respons voor 1 nmol/l CCK bij CHO-CCK1R-cellen na vermindering van de overeenkomstige oppervlakte voor de CHO-K1 cellen werd vastgesteld op 100 %.



Figuur 13 Ruwe standaardcurve voor toenemende concentraties CCK-8S uitgedrukt als de oppervlakte onder de curve (tijd in functie van f_i/f_0), de afzonderlijke curves voor CHO-CCK1R-cellen, CHO-K1cellen en CHO-CCK1R-cellen min CHO-K1 cellen worden weergegeven (n=5)

In figuur 14 wordt een verfijnde standaardcurve weergegeven. CCK heeft een EC_{50} -waarde van $32 \text{ pmol/l} \pm 1 \text{ pmol/l}$.



Figuur 14 Verfijnde standaardcurve voor toenemende concentraties CCK-8S. De curve is opgesteld door niet-lineaire regressie toe te passen (sigmoïdale dosisrespons met variabele richtingscoëfficiënt) (n=5) (GraphPad Prism)

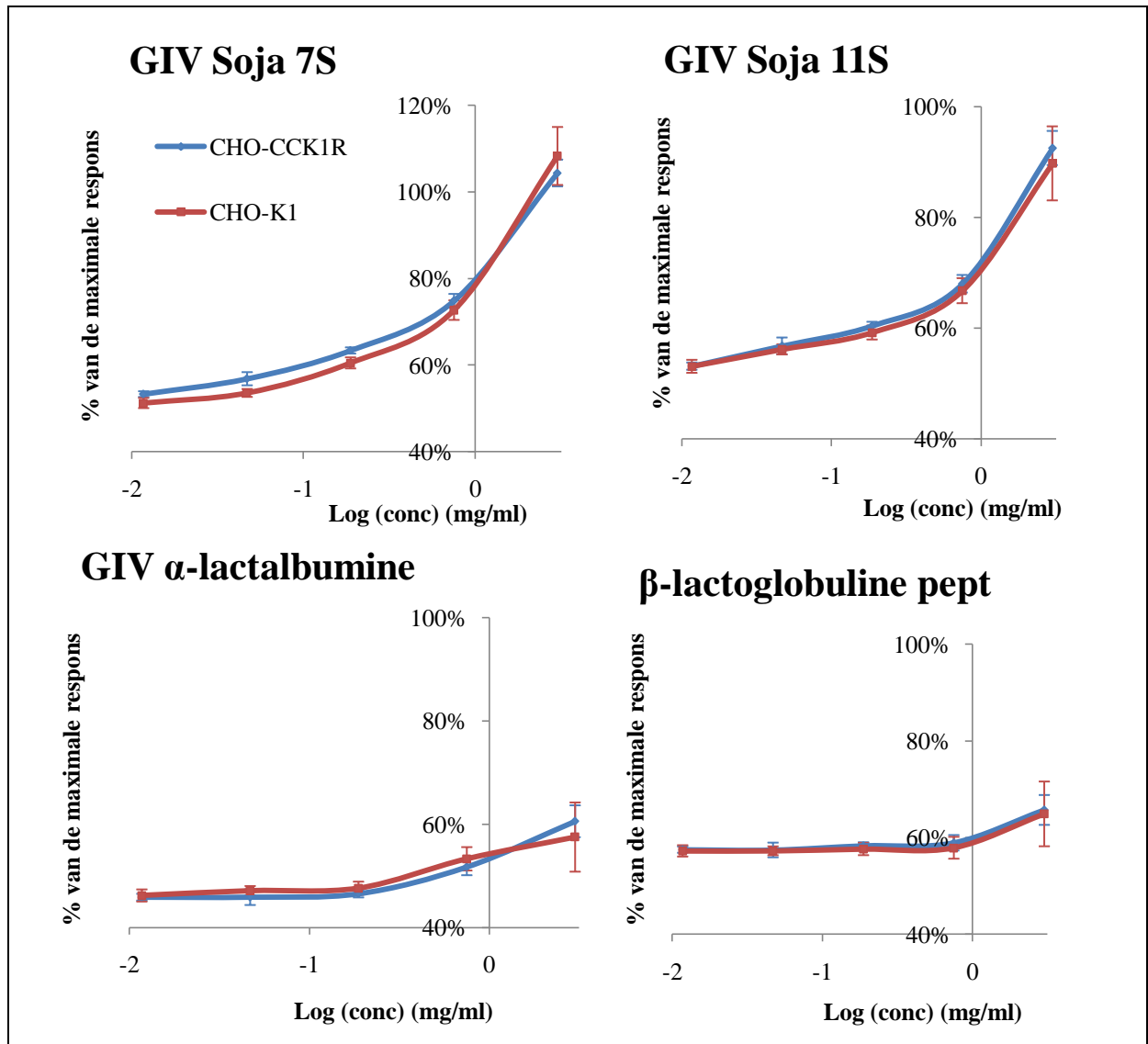
6.3.6 Test van de stalen

In dit deel van het onderzoek werd de mogelijkheid van verschillende eiwithydrolysaten om de CCK1R te activeren, getest. De stalen werden opgelost in buffer en verschillende concentraties werden getest op een microtiterplaat die voor de ene helft uitgezaaid was met CHO-CCK1R-cellen en voor de andere helft met CHO-K1 cellen. De respons voor elk staal werd getest aan de hand van vijf verschillende concentraties. De respons van de eiwitten op de CHO-CCK1R-cellen en bij de CHO-K1 cellen werd uitgedrukt als een percentage van de maximale respons, veroorzaakt door 1 nmol/l CCK-8S. De respons van 1 nmol/l CCK werd gemeten in elke plaat omdat de respons van de cellen van plaat tot plaat kon verschillen. Deze fluorescentierespons werd bij aanvang van de test gemeten om te voorkomen dat een verminderde respons (door een afname van de fluorescentie doorheen de tijd) werd gemeten.

De respons van de CHO-CCK1R-cellen en van de CHO-K1 cellen op de verschillende eiwithydrolysaten wordt weergegeven in figuur 15. De resultaten werden uitgedrukt als een percentage van de fluorescentierespons veroorzaakt door 1 nmol/l CCK-8S. GIV betekent gastro-intestinale vertering, pept betekent peptidase.

De CHO-K1 cellen werden gebruikt als negatieve controle. Indien de respons specifiek was voor de CCK1R, mochten de CHO-K1 cellen dus niet of minder reageren. Zoals blijkt uit figuur 15 was de respons voor de laagste concentraties niet gelijk aan nul door achtergrondfluorescentie. De achtergrondfluorescentie en de niet-CCK1R-specifieke fluorescentie kunnen gecorrigeerd worden door de respons van de CHO-CCK1R-cellen te verminderen met de respons van de negatieve controle, maar deze bewerking werd hier niet toegepast.

Uit de resultaten in figuur 15 kan vastgesteld worden dat de opgezuiverde soja-eiwitten de cellen meer stimuleerden dan de opgezuiverde wei-eiwitten. Uit figuur 15 blijkt ook dat de respons van de CHO-CCK1R-cellen op de verschillende eiwithydrolysaten vergelijkbaar was met de respons van de CHO-K1 cellen. Concreet betekent dit dat de fluorescentierespons dus niet specifiek veroorzaakt werd door activatie van de CCK1R, maar eerder door activatie van andere receptoren die tot expressie worden gebracht op CHO-cellen. De geteste hydrolysaten konden de CCK1R dus niet specifiek activeren.



Figuur 15 Mogelijkheid van toenemende concentraties van verschillende eiwathydrolysaten om de CHO-CCK1R-cellen en de CHO-K1 cellen te stimuleren

Het verdere doel in dit onderzoek is dus om de respons van CHO-CCK1R-cellen voor stijgende concentraties van een bepaald eiwathydrolysaat te doen toenemen terwijl de respons van de CHO-K1 cellen stabiel blijft.

7 ALGEMEEN BESLUIT

Uit de resultaten die bekomen werden tijdens de stageperiode kan besloten worden dat de geoptimaliseerde procedure voor de opzuivering van soja-eiwitten volgens Liu et al. (2007) een geschikte methode is. Van de soja-eiwitten glycinine (11S) en β -conglycinine (7S) die werden geïsoleerd was het eiwitgehalte voldoende groot. De eiwitfracties bleken na karakterisatie met SDS-PAGE toch nog licht gecontamineerd te zijn, maar het bandenpatroon dat bekomen werd op gel vertoonde grote gelijkenissen met het patroon van Liu et al. (2007) [20].

Uit de experimenten voor het bepalen van de hydrolysegraad van de opgezuiverde soja-eiwitten en de wei-eiwitten BSA, α -lactalbumine en β -lactoglobuline, kan besloten worden dat, na een simulatie van de gastro-intestinale vertering, de hydrolysegraad voor de soja-eiwitten zich rond 5 % bevond en dat de hydrolysegraad voor de wei-eiwitten zich rond 10 % situeerde. Uit deze gegevens kan ook vastgesteld worden dat de peptiden bij soja-eiwitten een gemiddelde lengte van 20 aminozuren hebben en bij wei-eiwitten een gemiddelde lengte van 10 aminozuren. Doordat de aminozuren van de melkeiwitten meer hydrofiele restgroepen bevatten, zijn de melkeiwitten dus beter oplosbaar en kunnen ze waarschijnlijk gemakkelijker gehydrolyseerd worden dan de soja-eiwitten.

Na optimalisatie van de CCK-receptoractivatietest, werd de respons van CHO-CCK1R-cellen en CHO-K1 cellen op toenemende concentraties van verschillende eiwithydrolysaten getest. Uit de bekomen resultaten kan afgeleid worden dat de geteste eiwithydrolysaten zowel bij de CHO-CCK1R-cellen als bij de CHO-K1 cellen een fluorescente respons induceerden. Omdat de fluorescentierespons op toenemende concentraties van de eiwithydrolysaten zowel bij de CHO-CCK1R-cellen als bij de CHO-K1 cellen toenam, kan besloten worden dat de eiwithydrolysaten niet specifiek de CCK1-receptor activeerden. Vermoedelijk activeerden de eiwithydrolysaten ook andere receptoren die door CHO-cellen tot expressie worden gebracht.

Verder onderzoek zal dus moeten uitwijzen op welke manier eiwithydrolysaten specifiek de CCK1-receptor bij CHO-CCK1R-cellen kunnen activeren terwijl de fluorescentierespons van CHO-K1 cellen stabiel blijft. In de toekomst kan getracht worden om andere hydrolyses op de geïsoleerde eiwitfracties uit sojabonen toe te passen of om de CCK-receptoractivatietest uit te voeren met laag moleculaire fracties, etc.

LITERATUURLIJST

1. Heijboer, A.C., A.M.v.d. Hoek, and E.P.M.v.d. Kleij-Corssmit, *Darmhormonen: nieuwe spelers bij de behandeling van obesitas en type-2-diabetes-mellitus?* Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007. **32**: p. 19-23.
2. Moran, T.H. and K.P. Kinzig, *Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(2): p. G183-G188.
3. Foltz, M., et al., *Protein Hydrolysates Induce CCK Release from Enteroendocrine Cells and Act as Partial Agonists of the CCK1 Receptor*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(3): p. 837-843.
4. de Tullio P, D.J., Pirotte B., *Therapeutic and chemical developments of cholecystokinin receptor ligands*. Expert Opin Investig Drugs., 2000. **9**(1): p. 129-46.
5. Nishi, T., H. Hara, and F. Tomita, *Soybean beta-conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats*. J Nutr, 2003. **133**(2): p. 352-7.
6. Sufian, M.K., et al., *Pork peptone stimulates cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells and suppresses appetite in rats*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(8): p. 1869-74.
7. Farmacotherapeutisch Kompas, www.fk.cvz.nl, 02/05/2010
8. Belgisch Centrum voor Farmacotherapeutische Informatie, Transparantiefiche "Behandeling van obesitas" (juli 2007), www.bcfi.be, 02/05/2010
9. FabulesTM, http://www.dsm.com/le/en_US/fabules/html/homepage.htm, 05/05/2010
10. A A Burns, M.B.E.L., R W Welch, A Dunne, C A Reid and I R Rowland, *The effects of yoghurt containing a novel fat emulsion on energy and macronutrient intakes in non-overweight, overweight and obese subjects*. Internation Journal of Obesity, 2001. **25**(10): p. 1487-1496.

11. A A Burns, M.B.E.L., R W Welch, A Dunne, P J Robson, L Lindmark, C A Reid, Ú Mullaney and I R Rowland, *Short-term effects of yoghurt containing a novel fat emulsion on energy and macronutrient intakes in non-obese subjects*. International Journal of Obesity, 2000. **24**(11): p. 1419-1425.
12. C M Logan, T.A.M., J M W Wallace, P J Robson, R W Welch, A Dunne and M B E Livingstone, *Investigation of the medium-term effects of Olibra™ fat emulsion on food intake in non-obese subjects*. European Journal of Clinical Nutrition, 2006. **60**: p. 1081–1091.
13. Rutherford-Markwick, K.J.M., P. J., *Bioactive peptides derived from food*. Journal of AOAC International., 2005. **88**(3): p. 955-966.
14. Dufresne, M., C. Seva, and D. Fourmy, *Cholecystokinin and gastrin receptors*. Physiol Rev, 2006. **86**(3): p. 805-47.
15. Noble, F., et al., *International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(4): p. 745-81.
16. Liddle, R.A., *Regulation of cholecystokinin secretion in humans*. J Gastroenterol, 2000. **35**(3): p. 181-7.
17. Berna MJ, J.R., *Role of CCK/gastrin receptors in gastrointestinal/metabolic diseases and results of human studies using gastrin/CCK receptor agonists/antagonists in these diseases*. Curr Top Med Chem., 2007. **7**(12): p. 1211-31.
18. Peter, S.A., M. D'Amato, and C. Beglinger, *CCK1 antagonists: are they ready for clinical use?* Dig Dis, 2006. **24**(1-2): p. 70-82.
19. Foucaud, M., et al., *Insights into the binding and activation sites of the receptors for cholecystokinin and gastrin*. Regul Pept, 2008. **145**(1-3): p. 17-23.
20. Liu, C., et al., *Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein*. Food Chemistry, 2007. **102**(4): p. 1310-1316.
21. Nagano, T., et al., *Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992. **40**(6): p. 941-944.

22. Thanh, V.H.S., K., *Major proteins of soybean seeds. A straightforward fraction and their characterization.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976. **24**: p. 1117-1121.