

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Bc. Jakub Kordík

Příprava a charakterizace průtokových reaktorů pro validaci biologických léčiv

Preparation and characterization of flow reactors for the validation of biological drugs

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultantka: Ing. Jana Nováková

Praha, 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Vzhledem k tomu, že nejsem rodilý mluvčí českého jazyka, využil jsem při jazykové korektuře této práce nástroj umělé inteligence ChatGPT (OpenAI) v souladu s etickými a morálními zásadami při současném zachování akademické integrity.

V Praze dne 16. 5. 2025

Jakub Kordík

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Petru Novákovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a podporu při vypracovávání této diplomové práce. Zvláštní poděkování patří také celému kolektivu Laboratoře 163 Mikrobiologického ústavu AV ČR a společnosti AffiPro s.r.o. za umožnění práce v jejich laboratořích, za ochotu a vstřícnost, které mi během mého působení poskytli.

Taky bych chtěl poděkovat svým rodičům za jejich neustálou podporu, trpělivost a víru ve mne po celou dobu mého studia.

Závěrem bych rád uvedl, že tato práce by nevznikla bez podpory projektů MULTIOMICS_CZ, (Operační program Jan Amos Komenský, Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, reg. č. CZ.02.01.01/00/23_020/0008540) – Spolufinancováno Evropskou unií a NW24-09-00464 Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky.

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo připravit a charakterizovat průtokové reaktory založené na imobilizaci alternativních aspartátových proteáz – mucorpepsinu a rhizopuspepsinu – a otestovat jejich využitelnost při štěpení modelových proteinů a terapeutické monoklonální protilátky Trastuzumabu. Tyto proteázy pocházející z vláknitých hub byly vybrány díky své schopnosti efektivně štěpit proteiny za kyselých podmínek a za přítomnosti denaturačních či redukčních činidel, což je činí vhodnými pro proteomické aplikace a strukturní analýzy. V experimentální části byla nejprve analyzována proteolytická aktivita obou enzymů v závislosti na pH, přídavku TCEP a denaturačních činidel pomocí SDS-PAGE. Výsledky ukázaly, že optimální pH aktivity obou proteáz se pohybuje mezi 2,5 a 4,0, přičemž mucorpepsin vykazoval vyšší substrátovou selektivitu než rhizopuspepsin. Následně byla enzymatická účinnost potvrzena LC-MS/MS analýzou, která poskytla detailní informace o pokrytí sekvence, počtu unikátních peptidů a preferencích štěpení. Byly připraveny průtokové reaktory s imobilizovanými enzymy na nosič POROS™ 20 AL a testována jejich účinnost při štěpení vybraných proteinů. Nejlepších výsledků při štěpení Trastuzumabu v průtokovém formátu bylo dosaženo s mucorpepsinem při pH 3,5 a 25 °C po přídavku TCEPu. Práce ukazuje potenciál alternativních proteáz v kombinaci s průtokovou technologií a poukazuje na nutnost další optimalizace imobilizačních podmínek pro zajištění reprodukovatelného a efektivního proteolytického systému pro proteomické účely.

Klíčová slova

Proteasa, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, proteinová terapeutika, monoklonální protilátky

Abstract

The aim of this thesis was to develop and characterize flow-through reactors based on the immobilization of alternative aspartic proteases—mucorpepsin and rhizopuspepsin—and to evaluate their applicability for the digestion of model proteins and the therapeutic monoclonal antibody Trastuzumab. These proteases, derived from filamentous fungi, were selected for their ability to efficiently cleave proteins under acidic conditions and in the presence of denaturing or reducing agents, making them suitable for proteomic applications and structural analyses. In the experimental part, the proteolytic activity of both enzymes was first analyzed using SDS-PAGE under varying pH conditions and in the presence of TCEP and denaturing agents. The results showed that the optimal pH for both proteases ranged between 2.5 and 4.0, with mucorpepsin displaying higher substrate selectivity compared to the more unspecific cleavage pattern of rhizopuspepsin. Enzymatic efficiency was further confirmed by LC-MS/MS analysis, which provided detailed data on sequence coverage, the number of unique peptides, and cleavage site preferences. Flow-through reactors with immobilized enzymes on POROS™ 20 AL resin were prepared and tested for their ability to digest selected proteins. The best results for Trastuzumab digestion in the flow-through format were obtained using mucorpepsin at pH 3.5 and 25 °C with TCEP. This work demonstrates the potential of alternative proteases in combination with flow-through technology and highlights the need for further optimization of immobilization protocols to ensure a reproducible and efficient proteolytic system for proteomic applications.

Keywords

Protease, liquid chromatography, mass spectrometry, protein therapeutics, monoclonal antibodies

Obsah

Seznam zkratk	9
Úvod	10
1. Proteomika	11
1.1. Analytické metody používané v proteomice	12
1.1.1. Chromatografické metody	12
1.1.2. Imunochemické metody	13
1.1.3. Elektroforetické metody	13
1.1.4. Hmotnostní spektrometrie (MS)	13
1.2. Proteomika v medicíne	14
1.2.1. Identifikace biomarkerů	14
1.2.2. Vývoj léčiv a nových terapeutických cílů pomocí proteomiky	14
2. Hmotnostní spektrometrie v proteomice	17
2.1. Princip hmotnostní spektrometrie	17
2.1.1. Ionizace	17
2.1.2. Hmotnostní analyzátory	19
2.2. Přístupy v proteomice založené na hmotnostní spektrometrii	23
2.2.1. Top-down proteomika	23
2.3. Bottom-up proteomika	24
2.3.1. Proteázy použité v rámci diplomové práce	27
3. Imobilizace enzymů	31
3.1. Metody imobilizace	32
3.1.1. Kovalentní vazba	32
3.1.2. Adsorpce	33
3.1.3. Zachycení a enkapsulace	33
3.1.4. Funkcionalizace povrchů a afinitní interakce s kovy	34
3.2. Typy reaktorů s imobilizovaným enzymem (IMERs)	34

3.2.1.	Monolitické IMERY.....	35
3.2.2.	IMERY plněné částicemi (particle-packed IMERs)	35
3.2.3.	Membránové a filtrační založené IMERY.....	35
3.2.4.	Mikrofluidní IMERY (μ -IMERs).....	36
4.	Trastuzumab	37
5.	Cíle práce	38
6.	Použité přístroje, chemikálie a roztoky.....	39
6.1.	Přehled potřebných přístrojů a vybavení.....	39
6.2.	Přehled použitých chemikálií	40
6.3.	Seznam roztoků.....	41
7.	Použité metody	42
7.1.	Výměna pufru pomocí gravitační gelové filtrace	42
7.2.	Štěpení modelových proteinů v roztoku při různém pH	42
7.3.	SDS-PAGE	42
7.4.	Štěpení modelových proteinů v roztoku v přítomnosti denaturačního a redukčního činidla TCEP	43
7.5.	Štěpení protilátky Trastuzumab	43
7.6.	Optimalizace pH pro proteolytické štěpení na základě analýzy LC-MS/MS.....	44
7.7.	Imobilizace rhizopuspepsinu a mucorpepsinu na aldehydem aktivovaný nosič POROS™ 20 AL	45
7.8.	Plnění kolon.....	47
7.9.	Štěpení protilátky Trastuzumab analyzované prostřednictvím LC-MS/MS	47
7.10.	Štěpení modelových proteinů v průtokovém reaktoru s imobilizovaným rhizopuspepsinem a jejich analýza pomocí LC-MS/MS	48
7.11.	Štěpení modelových proteinů v průtokovém reaktoru s imobilizovaným mucorpepsinem a jejich analýza pomocí LC-MS/MS.....	49
7.12.	Štěpení protilátky Trastuzumab v průtokovém reaktoru s imobilizovaným mucorpepsinem a její analýza pomocí LC-MS/MS	50

7.13.	Zpracování LC-MS/MS dat	50
8.	Výsledky a diskuse	52
8.1.	Analýza optimálního pH proteáz pomocí SDS-PAGE.....	52
8.2.	Analýza vlivu redukčního činidla TCEP na štěpení proteinů proteázami pomocí SDS-PAGE	52
8.3.	Analýza vlivu denaturačního činidla na štěpení proteinů proteázami pomocí SDS-PAGE	54
8.4.	Optimalizace pH a určení preferencí štěpení proteáz pomocí LC-MS/MS.....	55
8.5.	Analýza štěpení modelových proteinů v průtokovém reaktoru pomocí LC-MS/MS	60
8.6.	Analýza štěpení protilátky Trastuzumab pomocí SDS-PAGE.....	68
8.7.	Analýza štěpení protilátky Trastuzumab pomocí LC-MS/MS	72
8.8.	Analýza štěpení protilátky Trastuzumab v průtokovém reaktoru pomocí LC-MS/MS	78
9.	Závěr	81
10.	Zdroje	83
11.	Dodatek ke kapitole 8.7.....	88

Seznam zkratek

AFP	alfa-fetoprotein
AL	aldehydové funkční skupiny
AP-MS	afinitní purifikace spojená s hmotnostní spektrometrií
bCA	karbonická anhydráza
CID	kolizně indukovaná disociace
DDA	data-dependent acquisition
DIA	data-independent acquisition
DTT	dithiotreitol
ECD	electron capture dissociation
EP	epoxidové funkční skupiny
ESI	elektrospejová ionizace
ETD	electron transfer dissociation
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
HCD	higher-energy collisional dissociation
IMERs	imobilizovány enzymové reaktory
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MALDI	aserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice
MYG	myoglobin
PSA	prostatický specifický antigen
PTM	posttranslační modifikace
PYGM	glykogen fosforyláza
RF	rádiová frekvence
SRM	single reaction monitoring
TCEP	tris(2-karboxyetyl)fosfin
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	hmotnostní spektrometrie doby letu (time of flight)
TPP	termální proteomická profilace
UVPD	ultraviolet photodissociation
μ-IMERs	mikrofluidní imobilizovány enzymové reaktory

Úvod

V posledních desetiletích došlo k významnému rozvoji metod analytické biochemie, které umožňují hlubší porozumění biologickým procesům na molekulární úrovni. Mezi těmito přístupy zaujímá proteomika klíčové postavení díky své schopnosti analyzovat kompletní soubor proteinů exprimovaných v daném biologickém systému. Na rozdíl od genomu, který zůstává relativně stabilní, je proteom dynamický a jeho složení se mění v závislosti na buněčném typu, vývojovém stádiu nebo fyziologickém a patologickém stavu organismu. Proteomické metody se tak staly nenahraditelným nástrojem ve výzkumu nemocí, vývoji léčiv a biotechnologických aplikacích.

Jednou z nejúčinnějších technologií využívaných v moderní proteomice je hmotnostní spektrometrie (MS), která umožňuje vysoce citlivou a specifickou identifikaci proteinů a jejich modifikací. MS techniky se uplatňují zejména v kombinaci s metodami enzymatického štěpení, přičemž tradičně nejpoužívanější enzym – trypsin – vykazuje omezenou substrátovou specifitu, což může vést k nedostatečnému pokrytí sekvence některých proteinů. V reakci na tyto limity narůstá zájem o alternativní proteázy s odlišnými specifitami, které mohou rozšířit proteomickou analýzu o dosud obtížně identifikovatelné regiony proteinů.

Paralelně s tím dochází k vývoji nových přístupů v oblasti proteolytických workflow, včetně technologií průtokových reaktorů s imobilizovanými enzymy. Imobilizace enzymů na pevný nosič přináší řadu výhod, jako je opakovatelnost, stabilita, přesná kontrola reakčních podmínek a kompatibilita s automatizovanými systémy. Zejména v oblasti analýzy kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) přispívají průtokové reaktory k vyšší reprodukovatelnosti a efektivitě proteolýzy, což je klíčové pro vysokoprůchodové analýzy a validaci biologických léčiv.

Cílem této diplomové práce je příprava a charakterizace průtokového reaktoru založeného na imobilizaci alternativních proteáz, konkrétně mucorpepsinu a rhizopuspepsinu, a jejich aplikace na modelové proteiny i terapeutickou monoklonální protilátku Trastuzumab. Tyto aspartátové proteázy pocházející z vláknitých hub rodu *Rhizomucor* představují slibnou alternativu k pepsinu díky své stabilitě za kyselých podmínek, vysoké aktivitě při nízkých teplotách a schopnosti efektivního štěpení i ve ztížených podmínkách, jako je přítomnost denaturačních nebo redukčních činidel.

1. Proteomika

Proteomika představuje interdisciplinární oblast výzkumu, která se zaměřuje na komplexní analýzu proteinů v buňkách, tkáních a organismech. Součástí této vědní disciplíny je identifikace, kvantifikace, charakterizace struktury a funkce proteinů, stejně jako jejich interakce a posttranslační modifikace. Proteomika rovněž doplňuje genomiku a transkriptomiku a umožňuje hlubší porozumění biologickým procesům, které závisejí na proteinové expresi a regulaci. Proteomické analýzy jsou zásadní pro pochopení dynamiky buněčných procesů a zároveň poskytují důležité informace o fyziologických a patologických stavech organismů (Aslam et al., 2017).

Termín *proteom* označuje kompletní soubor proteinů exprimovaných v daném čase a za konkrétních podmínek. Na rozdíl od genomu, který je relativně stabilní, je proteom vysoce dynamický a neustále se mění v závislosti na buněčném stavu, podmínkách prostředí a různých dalších vnějších stimulech. To představuje jednu z hlavních výzev proteomiky, neboť identifikace a kvantifikace veškerých proteinů v buňkách vyžaduje sofistikované analytické přístupy s vysokou citlivostí a rozlišovací schopností (Aslam et al., 2017).

Proteomické technologie nacházejí široké uplatnění v biomedicíně, farmaceutickém průmyslu, biotechnologiích a rovněž v agronomii. V oblasti medicínského výzkumu se proteomika využívá k identifikaci biomarkerů, které mohou sloužit k diagnostice a prognóze různých onemocnění, včetně rakoviny, neurodegenerativních poruch a infekčních nemocí. Příkladem je analýza proteinových profilů v tělních tekutinách, jako je krev nebo mozkomíšní mok, která může napomoci identifikaci specifických proteinů asociovaných s patologickými stavy, což umožňuje včasnou diagnostiku a monitorování onemocnění. Kromě toho se proteomické metody uplatňují při vývoji cílené terapie, kde se zkoumají interakce mezi terapeutickými látkami a proteiny s cílem optimalizovat účinnost a minimalizovat vedlejší účinky léčiv (Aslam et al., 2017).

V biotechnologiích a potravinářském průmyslu se proteomické metody využívají k optimalizaci bioprodukčních procesů, například při výrobě enzymů, vakcín a dalších biologicky aktivních molekul. Proteomická analýza mikroorganismů používaných v biotechnologických aplikacích umožňuje lepší porozumění metabolickým drahám a identifikaci faktorů, které mohou přispět ke zvýšení produkce požadovaných proteinů. V agronomii a rostlinných vědách se proteomika používá ke studiu proteinových odpovědí rostlin na environmentální stresory, jako jsou sucho, zasolení či patogeny, což přispívá k vývoji odolnějších plodin (Aslam et al., 2017).

Navzdory svému obrovskému potenciálu čelí proteomika několika výzvám. Jak bylo zmíněno na začátku, analýza proteomu je složitější než analýza genomu, protože proteiny vykazují široké spektrum fyzikálně-chemických vlastností, jako je hydrofobicita, různé izoelektrické body a vysoký dynamický rozsah exprese. Kromě toho mohou proteiny podléhat různým posttranslačním modifikacím, které významně ovlivňují jejich funkci. Technologický pokrok v oblasti hmotnostní spektrometrie a pokročilé bioinformatické nástroje umožňují efektivnější analýzu proteinů a postupně snižují omezení spojená s proteomickými experimenty (Aslam et al., 2017).

1.1. Analytické metody používané v proteomice

Proteomika využívá široké spektrum analytických technik, které umožňují identifikaci, kvantifikaci a funkční charakterizaci proteinů. Mezi hlavní skupiny patří chromatografické a elektroforetické metody, hmotnostní spektrometrie, imunochemické metody a bioinformatická analýza.

1.1.1. Chromatografické metody

Chromatografie je základní metodou pro separaci proteinů na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, jako jsou náboj, velikost nebo afinita ke specifickým ligandům.

1.1.1.1. Ionexová chromatografie (IEC z anglického ion exchange chromatography)

IEC je separační metoda založená na elektrostatických interakcích mezi analyty a stacionární fází, která obsahuje ionexovou pryskyřici. Mobilní fáze používaná v IEC je tvořena vodným pufrovací roztokem. V tomto systému jsou přítomny protiionty, které se nacházejí v dynamické rovnováze mezi mobilní a stacionární fází. Na základě charakteru vyměňovaných iontů lze rozlišit dva hlavní formáty IEC: anex a kationex. Při použití kationexu dochází k výměně kationtů, zatímco při použití anexu dochází k výměně aniontů (Thikekar et al., 2023).

1.1.1.2. Vylučovací chromatografie (SEC z anglického size exclusion chromatography)

SEC, známá také jako gelová filtrace, umožňuje separaci proteinů na základě jejich molekulové velikosti. Princip spočívá v použití porézní stacionární fáze, ve které malé molekuly pronikají do pórů a setrvávají v nich déle, zatímco větší molekuly procházejí skrze kolonu rychleji. Tato metoda je často používána k přečištění vzorků před analýzou hmotnostní spektrometrií (Thikekar et al., 2023).

1.1.1.3. *Afinitní chromatografie*

Afinitní chromatografie je vysoce selektivní separační technika, která využívá specifické interakce mezi proteinem a imobilizovaným ligandem na povrchu chromatografické kolony. Ligandem může být například protilátka, receptor nebo specifická chemická skupina, která se selektivně váže na cílový protein. Po navázání proteinu na ligand jsou nespecificky navázané proteiny odplaveny a požadovaný protein je následně z kolony uvolněn elucí (Thikekar et al., 2023).

1.1.2. Imunochemické metody

1.1.2.1. *ELISA (z anglického enzyme-linked immunosorbent assay)*

ELISA je vysoce citlivá metoda používaná k detekci a kvantifikaci proteinů v biologických vzorcích. Princip spočívá v navázání specifických protilátek na cílový protein, který je následně detekován pomocí enzymatické reakce generující barevný signál. Existuje několik variant ELISA, jako je přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní metoda (Thikekar et al., 2023).

1.1.2.2. *Western blot*

Western blot je další široce používanou technikou pro detekci specifických proteinů v komplexních vzorcích. Metoda zahrnuje separaci proteinů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE), následný přenos proteinů na membránu a jejich detekci pomocí protilátek (Thikekar et al., 2023).

1.1.3. Elektroforetické metody

1.1.3.1. *Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D-PAGE)*

Princip 2D-PAGE spočívá ve dvoustupňové separaci proteinů. První dimenzí je isoelektrická fokusace, při níž se proteiny separují na základě jejich isoelektrického bodu (pI), což znamená, že se v elektrickém poli pohybují, dokud nedosáhnou pH odpovídajícího jejich nulovému čistému náboji. Druhou dimenzí je SDS-PAGE, při které jsou proteiny po separaci podle pI dále rozděleny na základě jejich molekulové hmotnosti. Po separaci jsou proteiny vizualizovány barvením (např. Coomassie Brilliant Blue) a analyzovány pomocí softwaru k detekci rozdílů v expresních profilech (Thikekar et al., 2023).

1.1.4. Hmotnostní spektrometrie (MS)

MS je jednou z nejvýznamnějších technologií v moderní proteomice, která umožňuje identifikaci proteinů, jejich posttranslačních modifikací a kvantifikaci. Hlavní princip MS spočívá v ionizaci proteinů nebo peptidů, separaci na základě poměru hmotnosti k náboji (m/z)

a detekci iontů (Thikekar et al., 2023). Více o hmotnostní spektrometrii bude uvedeno v kapitole 2.

1.2. Proteomika v medicíne

V medicíně nachází proteomika široké uplatnění zejména při vývoji nových diagnostických metod, hledání biomarkerů onemocnění, vývoji léčiv a objevování nových terapeutických cílů. Detailní analýza proteinů v biologických vzorcích umožňuje lepší porozumění patofyziologickým mechanismům chorob a poskytuje cenné informace pro klinická rozhodnutí. Moderní proteomické technologie umožňují identifikaci proteinů spojených s konkrétními patologickými stavy, což otevírá dveře k inovativním diagnostickým a terapeutickým přístupům (Al-Amrani et al., 2021).

1.2.1. Identifikace biomarkerů

Biomarker je měřitelný indikátor normálního nebo patologického procesu, který může být využit v diagnostice, prognóze nebo sledování onemocnění a jeho odpovědi na léčbu. Proteomická analýza umožňuje objevování nových biomarkerů v tělních tekutinách, jako jsou krev, moč, sliny nebo mozkomíšni mok, což snižuje invazivitu diagnostických postupů. Příkladem je objev biomarkerů pro onkologická onemocnění, jako je HER2 při rakovině prsu, PSA (prostatický specifický antigen) při karcinomu prostaty a AFP (alfa-fetoprotein) při hepatocelulárním karcinomu (D. Jia et al., 2024). Kromě onkologie jsou proteinové biomarkery zkoumány také v oblasti neurodegenerativních onemocnění, kde se identifikují proteiny asociované s Alzheimerovou chorobou (např. tau protein nebo beta amyloid), ale také u autoimunitních onemocnění, jako je roztroušená skleróza (Al-Amrani et al., 2021).

1.2.2. Vývoj léčiv a nových terapeutických cílů pomocí proteomiky

V několika fázích vývoje léčiv, od raného výzkumu až po klinické testování, hraje klíčovou roli hmotnostní spektrometrie (MS). Díky schopnosti přesně analyzovat proteiny a metabolity umožňuje identifikaci terapeutických cílů, optimalizaci vlastností léčiv a sledování jejich účinků na buněčný proteom.

Jednou z hlavních aplikací MS ve vývoji nových léčiv je kvantitativní proteomika, která umožňuje měření exprese proteinů za různých experimentálních podmínek. Kvantitativní techniky, jako je značení aminokyselin stabilními izotopy v buněčné kultuře a kvantitativní bezznačková proteomika, se používají k detekci proteinových změn v důsledku patologických procesů nebo farmakologických zásahů (Rahmani et al., 2025).

Dalším klíčovým aspektem farmakologie je interakce mezi léčivými a cílovými proteiny. MS umožňuje identifikaci proteinů, na které se léčivo váže, a podrobnou analýzu jejich vlivu na buněčný proteom (Kim & Nita-Lazar, 2024).

1.2.2.1. Afinitní purifikace spojená s hmotnostní spektrometrií

Jednou z důležitých metod používaných ke studiu interakcí mezi proteiny a k identifikaci proteinů, které mohou být cíli pro nová léčiva, je afinitní purifikace spojená s hmotnostní spektrometrií (AP-MS). Tato metoda zahrnuje několik kroků, počínaje značením nebo exprimací cílového proteinu s afinitním tagem (např. His-tag) v buňkách. Následuje afinitní purifikace, při níž je cílový protein spolu se svými interagujícími partnery zachycován na speciální povrch (afinitní matici). Tato matrice obsahuje protilátky nebo specifické chemické sloučeniny, které selektivně vážou cílový protein a jeho interakční partnery. V posledním kroku dochází k eluaci proteinových komplexů, které jsou následně analyzovány pomocí MS (Kim & Nita-Lazar, 2024). Kim a Nita-Lazar ve své studii prokázali, že AP-MS je mimořádně užitečná při zkoumání proteinových interakcí v imunitním systému, což naznačuje její široký potenciál i v oblasti vývoje imunoterapií.

1.2.2.2. Termální proteomická profilace

Další metodou je termální proteomická profilace (TPP). Tato metoda umožňuje identifikaci proteinových cílů léčiv bez nutnosti jejich genetické nebo chemické modifikace. Princip metody spočívá v tom, že vazba léčiva na protein mění jeho stabilitu vůči tepelné denaturaci, což lze kvantifikovat pomocí MS.

Postup metody TPP je následující: buňky nebo buněčné lyzáty jsou inkubovány s testovaným léčivem. Následně jsou vzorky zahřáty na různé teploty, čímž dochází k postupné denaturaci proteinů. Po centrifugaci jsou denaturované, nerozpustné proteiny odděleny od rozpustné frakce. V posledním kroku je rozpustná frakce analyzována pomocí MS, která umožňuje kvantifikaci množství stabilních proteinů při každé teplotě. Pokud se léčivo naváže na určitý protein, může to změnit jeho stabilitu – protein se může stát odolnějším nebo citlivějším na teplotní denaturaci. Tento posun v bodě denaturace lze detekovat pomocí MS a využít jej k identifikaci proteinů, které jsou cíli daného léčiva. Tato metoda byla úspěšně využita při identifikaci cílových proteinů při vývoji léčiv proti neurodegenerativním onemocněním a rakovině (Kim & Nita-Lazar, 2024).

1.2.2.3. Farmakokinetika a farmakodynamika

Farmakokinetika a farmakodynamika jsou neoddělitelnými aspekty vývoje léčiv, které určují jejich účinnost a bezpečnost. Farmakokinetika zkoumá, jak se léčivo chová v organismu – od absorpce, distribuce, metabolismu až po eliminaci (ADME). MS je opět klíčovou metodou, která umožňuje sledování koncentrací léčiv v krvi a tkáních, což je nezbytné pro stanovení optimálního dávkování (Hossain et al., 2025). Metabolismus léčiv, k němuž dochází zejména v játrech, může vést k tvorbě aktivních nebo toxických metabolitů. MS je nezbytná pro detekci těchto metabolitů a vyhodnocení jejich bezpečnosti (Prajapati et al., 2025). Farmakodynamika se naopak zabývá účinkem léčiv na buňky a tkáně. Proteomické analýzy, jako je TPP, pomáhají určit, na které proteiny se léčivo váže, a zároveň objasnit, jakým způsobem ovlivňuje jejich funkci v buňce (Ketron et al., 2025).

1.2.2.4. Posttranslační modifikace a jejich role ve vývoji léčiv

Posttranslační modifikace (PTMs) jsou chemické změny proteinů, které ovlivňují jejich funkci, stabilitu a interakce. Jsou klíčové v regulaci buněčných procesů a hrají důležitou roli ve vývoji léčiv. Fosforylace reguluje buněčnou signalizaci a je cílem mnoha inhibitorů kináz používaných v protinádorové léčbě (Guo et al., 2025). Glykosylace ovlivňuje stabilitu terapeutických protilátek a vakcín, přičemž její přesná analýza pomocí MS je nezbytná pro biofarmaceutika (F. Jia et al., 2025). Ubikvitinace je klíčová pro degradaci proteinů, což umožňuje vývoj léčiv zaměřených na selektivní odstranění patologických proteinů (Abdeen et al., 2025).

2. Hmotnostní spektrometrie v proteomice

Proteomika, jak již bylo několikrát zmíněno, je vědní obor zaměřený na komplexní studium proteinů v organismech a v posledních letech zaznamenala obrovský pokrok právě díky využití hmotnostní spektrometrie (MS). Ta se etablovala jako hlavní analytická metoda umožňující identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci proteinů v různých biologických vzorcích. Kromě toho se MS používá v široké škále experimentálních strategií a umožňuje analýzu tisíců proteinů v rámci jednoho vzorku, což je obzvláště důležité při studiu složitých biologických systémů (Shuken, 2023).

Vývoj MS byl zásadní pro rozvoj proteomiky, neboť umožňuje identifikaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti a charakterizaci jejich sekvence prostřednictvím fragmentační analýzy. Tradiční metody studia, jako je dvourozměrná gelová elektroforéza, již nepostačují současným požadavkům na hloubkovou analýzu, neboť jsou časově náročné a mají omezený dynamický rozsah.

Hlavními výhodami MS v proteomice jsou vysoká citlivost, která umožňuje detekci proteinů i ve stopových množstvích, za určitých podmínek i kvantitativní přesnost, díky níž lze přesně stanovit relativní množství proteinů v biologických vzorcích, specifčnost, kdy analýza peptidů a jejich fragmentů umožňuje spolehlivou identifikaci proteinů a jejich modifikací, všestrannost, protože MS analýza je aplikovatelná na různé typy vzorků (Shuken, 2023).

2.1. Princip hmotnostní spektrometrie

MS je analytická metoda sloužící k určení molekulové hmotnosti chemických látek na základě poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z). V kontextu proteomiky se využívá k analýze proteinů a peptidů, přičemž poskytuje informace o jejich sekvenci a posttranslačních modifikacích (Shuken, 2023). Proces analýzy pomocí MS se skládá ze tří hlavních kroků: ionizace, separace a detekce iontů.

2.1.1. Ionizace

Ionizace je prvním krokem v hmotnostní spektrometrii, během něhož se neutrální molekuly proteinů nebo peptidů přeměňují na nabitě ionty. Tento proces je klíčový, protože pouze nabitě ionty mohou být následně analyzovány pomocí MS (Shuken, 2023).

2.1.1.1. *Elektrosprejová ionizace (ESI)*

Elektrosprejová ionizace (ESI) je jednou z nejběžnějších ionizačních metod využívaných v proteomice, nejčastěji ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC), a umožňuje efektivní analýzu širokého spektra biomolekul (Nanni et al., 2022).

Mechanismus ESI je založen na sérii fyzikálně-chemických procesů, které vedou k tvorbě stabilních iontů vhodných pro MS analýzu. Celý proces začíná rozpuštěním analyzované vzorky, obvykle ve směsi vody a organického rozpouštědla, jako je methanol nebo acetonitril. Tato směs je poté vystavena silnému elektrickému poli, které vytváří malé nabitě kapénky obsahující molekuly analytu. Postupným odpařováním rozpouštědla dochází k redukci velikosti kapének a v kritickém momentu tzv. Coulombova rozpadu se kapénky explozivně rozpadnou na menší nabitě fragmenty, až nakonec zůstanou izolované ionty analytických molekul. Tyto ionty jsou elektrostaticky urychlovány do hmotnostního analyzátoru, kde probíhá jejich separace a detekce (Shuken, 2023).

Výhodou ESI je její schopnost produkovat vícenásobně nabitě ionty, což umožňuje analýzu velkých molekul, jako jsou proteiny – ty se díky vícenásobným nábojům dostávají do rozsahu detekce většiny MS zařízení. ESI je navíc měkká ionizační technika, která minimalizuje fragmentaci proteinů a peptidů, čímž umožňuje přesnou identifikaci analyzovaných látek. ESI je také ideální pro kvantitativní proteomiku a analýzu posttranslačních modifikací, neboť v kombinaci s LC umožňuje vysoce rozlišující analýzu komplexních biologických vzorků (Shuken, 2023).

Nevýhodou ESI je její citlivost na kontaminaci solemi, které mohou interferovat s ionizací analyzovaných molekul, což vede ke vzniku nesprávných signálů ve spektru, snížení citlivosti a tvorbě aduktů, které mohou zkreslit přesnost určení molekulové hmotnosti analytů (O'Neill, 2019). Dále ESI generuje vícenásobně nabitě ionty, což může komplikovat interpretaci spektra – zejména při analýze komplexních proteinových směsí může docházet k překrývání signálů jednotlivých iontů (Shuken, 2023).

2.1.1.2. *Laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI)*

MALDI patří rovněž mezi významné ionizační metody využívané v proteomice. Na rozdíl od ESI, kde se analyzované látky nacházejí v kapalně fázi, při MALDI se vzorek nejprve krystalizuje v přítomnosti organické matrice, která následně absorbuje laserovou energii a přenáší ji na analyzované molekuly, čímž dochází k jejich ionizaci. Tento proces umožňuje

efektivní analýzu velkých biomolekul s minimální fragmentací, což je výhodné při identifikaci intaktních proteinů a PTM (O'Neill, 2019).

Mechanismus ionizace pomocí MALDI začíná přípravou vzorku, při které se analyzovaná látka smísí se speciální matricí, jako je kyselina sinapová nebo kyselina α -cyano-4-hydroxyskořicová, a nanese se na terčik. Po nanesení se směs nechá odpařit, čímž vzniknou krystalické struktury obsahující analyzované molekuly rovnoměrně rozptýlené v matrici. V dalším kroku dochází k laserové excitaci – krátký pulz laserového záření excituje matrici, která absorbuje energii a následně ji předává analyzovaným molekulám. Tento proces způsobuje desorpci a ionizaci vzorku, přičemž ionty jsou uvolněny do plynné fáze a vstupují do hmotnostního analyzátoru, kde probíhá jejich separace a detekce (Nanni et al., 2022).

Výhodou MALDI je jednoduchá příprava vzorku a skutečnost, že se jedná o měkkou ionizační techniku, která způsobuje pouze minimální fragmentaci, což umožňuje zachování intaktní proteinové struktury a přesnou identifikaci velkých molekul. MALDI se rovněž vyznačuje vysokou rychlostí analýzy – výsledky lze získat během několika sekund. Další výhodou je vysoká citlivost, která umožňuje detekci i velmi nízkých koncentrací biomolekul (O'Neill, 2019; Shuken, 2023).

Jedním z hlavních omezení MALDI je její nekompatibilita s LC, což znamená, že složité proteinové směsi nelze efektivně analyzovat v reálném čase, jak je tomu u LC-MS analýz. To omezuje její využití v aplikacích, kde je nezbytná předchozí separace komplexních proteinových vzorků. Další nevýhodou je citlivost na tzv. matricové efekty – nevhodná volba matrice může vést k nepřesným výsledkům nebo k úplnému potlačení signálu analyzovaných molekul. Proto je při použití MALDI důležité optimalizovat výběr matrice a experimentálních podmínek tak, aby byla zajištěna maximální efektivita ionizace a přesnost detekce (Han et al., 2008).

2.1.2. Hmotnostní analyzátor

Úlohou hmotnostních analyzátorů je separace iontů na základě jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z). Jejich výběr ovlivňuje rozlišení, citlivost, rychlost analýzy a přesnost identifikace proteinů, přičemž různé typy analyzátorů nabízejí různé výhody a omezení v závislosti na konkrétní aplikaci. Nejčastěji používanými analyzátorů v proteomice jsou kvadrupólové, TOF a orbitrap analyzátor. Každý z těchto typů má své specifické vlastnosti a uplatnění v různých oblastech proteomického výzkumu (Shuken, 2023).

2.1.2.1. Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor se skládá ze čtyř paralelních tyčí, které mohou mít válcový nebo hyperbolický tvar. Ideální hyperbolické tyče jsou potřebné pro vytvoření dokonale homogenního hyperbolického elektrického pole, avšak jejich výroba je technicky náročná. V praxi se proto častěji používají válcové tyče, které umožňují přibližnou simulaci tohoto pole (Gross, 2017).

Princip fungování kvadrupólu spočívá ve výběru iontů na základě hodnoty stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí. Ionty, které se pohybují stabilní trajektorií, jsou směřovány do detektoru, zatímco nestabilní ionty jsou vychýleny a detektoru nedosáhnou (Gross, 2017).

Kvadrupól může pracovat ve dvou režimech. Prvním je režim průchodu iontů, kde se elektrické pole plynule mění, což umožňuje rychlé skenování všech hodnot m/z v krátkém časovém intervalu. Tento režim je založen výhradně na radiofrekvenčním (RF) napětí. Často se využívá v kombinaci s iontovými zdroji pracujícími za atmosférického tlaku. RF pole propouští do analyzátoru pouze nabitě ionty, zatímco neutrální molekuly jsou odstraňovány vakuovými pumpami. Uvnitř kvadrupólu se formuje ochlazený oblak iontů s nízkou kinetickou energií, který se organizuje do koncentrických válcových vrstev. Tyto vrstvy sdružují ionty se stejným m/z – ionty s vyšším m/z se soustřeďují ve vnějších vrstvách, zatímco ionty s nižším m/z jsou tlačeny blíže ke středu v důsledku účinného zaostřování RF pole. Tento proces snižuje vzájemné odpuzování způsobené prostorovým nábojem a stabilizuje distribuci iontů. Zvýšení lineární hustoty iontů může vést k rozšíření oblaku a zvýšení pravděpodobnosti kolize iontů s vyšší hodnotou m/z s tyčemi kvadrupólu. Na rozdíl od analyzátorů doby letu (TOF) nebo magnetických sektorových spektrometrů obsahuje kvadrupól kolizní buňky, které umožňují kolizně indukovanou disociaci (CID) při energii 5–100 eV. Tyto buňky jsou často zakřivené, což prodlužuje dráhu letu iontů skrze kolizní oblast, zvyšuje účinnost fragmentace a zároveň odstraňuje neutrální částice a fotony, čímž se snižuje šum ve spektru (Gross, 2017).

Druhým režimem je SRM (*single reaction monitoring*), při kterém je elektrické pole nastaveno tak, aby skrze kvadrupól procházely pouze ionty s přesně definovanou hodnotou m/z . Na jeden pár protilehlých elektrod se přivádí stejnosměrné napětí, zatímco na druhý pár je aplikováno RF napětí. Stabilita trajektorie konkrétního iontu je tak řízena těmito parametry. Jak již bylo zmíněno, ideální kvadrupólový analyzátor by měl mít elektrody s hyperbolickým průřezem, aby vzniklo co nejpřesnější pole. Nicméně vzhledem k technologickým a výrobním

omezením se většinou používají válcové tyče, jejichž průměr je optimalizován tak, aby co nejvěrněji simuloval hyperbolické pole. I drobné odchylky od ideálního tvaru, způsobené například interferencemi s vnějšími poli, nízkou mechanickou přesností nebo nevhodným tvarem elektrod, mohou vést k výrazným ztrátám přenosu iontů a poklesu rozlišení (Gross, 2017).

2.1.2.2. *Průletový analyzátor*

Celý proces začíná ionizací vzorku, při níž jsou molekuly excitovány metodami, jako je MALDI nebo ESI. Následně jsou ionty urychleny působením elektrického pole, přičemž kinetická energie získaná v této fázi závisí na velikosti napětí a náboji iontů. Protože všechny ionty v analyzovaném vzorku získají přibližně stejnou kinetickou energii, jejich výsledná rychlost se liší v závislosti na jejich hmotnosti – lehčí ionty se pohybují rychleji a dopadají na detektor dříve než těžší ionty.

Urychlené ionty poté vstupují do driftové oblasti, ve které se již nemění jejich energie ani směr pohybu. Za ideálních podmínek by měly ionty se stejnou hmotností dopadat na detektor současně, což umožňuje přesné určení jejich hmotnosti. V reálných podmínkách jsou však ionty ovlivněny drobnými rozdíly v počáteční distribuci kinetické energie, což může vést k mírnému rozostření spektra (Gross, 2017).

Aby se minimalizovaly interference způsobené kolizemi s molekulami vzduchu, driftová oblast je udržována ve vysokém vakuu. Během této fáze se ionty pohybují konstantní rychlostí, která je nepřímo úměrná jejich hmotnosti. Po dopadu na detektor dochází k přeměně kinetické energie na měřitelný signál, přičemž nejčastěji používané detektory jsou založené na principu sekundární emise elektronů, jako například fotonásobiče (Gross, 2017).

Jednou z výzev TOF analyzátorů je eliminace rozdílů v počáteční distribuci kinetické energie iontů, které mohou snižovat rozlišovací schopnost. Jednou z technik vyvinutých pro tento účel je tzv. zpožděná extrakce. Tento přístup spočívá v krátkém časovém zpoždění mezi ionizací a urychlením iontů, což umožňuje jejich částečné prostorové seskupení a vyrovnání rozdílů v kinetických energiích. Výsledkem je přesnější zaostření iontového svazku a zvýšení rozlišení hmotnostního spektra (Gross, 2017).

Další možností je použití reflektornového TOF analyzátoru. Tento systém využívá elektrostatický reflektor, který prodlužuje dráhu iontů v závislosti na jejich počáteční kinetické energii. Ionty s vyšší energií pronikají hlouběji do reflektoru, čímž se kompenzují rozdíly v jejich rychlostech, a je zajištěno, že ionty se stejnou hmotností dopadnou na detektor současně.

Tímto způsobem dochází k výraznému zvýšení rozlišovací schopnosti a k ostřejší definici hmotnostních píků (Gross, 2017).

K dalšímu zlepšení rozlišovací schopnosti přispívá také ortogonální akcelerace (oaTOF), která umožňuje přesnější kontrolu nad iontovým svazkem před jeho vstupem do driftové oblasti. Ionty jsou nejprve vedeny stabilním proudem rovnoběžným s analyzátozem, a jejich prostorové i energetické charakteristiky mohou být před akcelerací efektivněji homogenizovány. Klíčovým mechanismem zvyšujícím rozlišení je pulzní ortogonální extrakce iontů z kontinuálního svazku. V pravidelných intervalech je na akcelerační elektrody aplikováno vysoké napětí, které způsobí prudké urychlení iontů kolmo k původnímu směru pohybu. Tento proces zajišťuje, že všechny ionty v daném pulzu začínají svůj let současně, čímž se minimalizují rozdíly v jejich počáteční kinetické energii. Výsledkem je ostřejší spektrum a vyšší rozlišovací schopnost (Gross, 2017).

2.1.2.3. Orbitrap

Hmotnostní analyzátor Orbitrap je vysoce rozlišující přístroj, který byl představen společností Thermo Fisher Scientific v roce 2005. Od té doby se stal široce používanou součástí pokročilých hmotnostně spektrometrických workflow díky své schopnosti poskytovat přesná měření hmotnosti a vynikající rozlišovací schopnost. Jedním z charakteristických rysů Orbitrapu je jeho činnost v čistě elektrostatickém poli, což eliminuje potřebu magnetických komponent a tím snižuje fyzické rozměry i provozní složitost systému (Gross, 2017).

Základem Orbitrapu je vřetenovitá centrální elektroda obklopená souosou, sudkovitou vnější elektrodou rozdělenou do dvou symetrických polovin. Iony jsou do tohoto uspořádání vstříkovány tangenciálně, kde jsou vystaveny stabilizujícímu elektrostatickému potenciálu. Výsledkem je superpozice orbitální rotace kolem centrální elektrody a koherentních axiálních oscilací podél podélné osy. Právě tyto axiální oscilace jsou základem pro hmotnostní analýzu, jelikož jejich frekvence přímo odpovídají poměru hmotnosti a náboje (m/z) iontů (Gross, 2017). Detekční princip Orbitrapu je založen na měření obrazových proudů indukovaných oscilujícím mračnem iontů na rozdělených vnějších elektrodách. Tyto signály jsou snímány v čase, digitalizovány a následně převedeny do frekvenčního spektra pomocí Fourierovy transformace. Výsledná data ve frekvenční doméně jsou poté interpretována za účelem získání přesných hodnot m/z . Významné je, že v pasti není nutná žádná excitace iontů, což přispívá k vysoké stabilitě a reprodukovatelnosti měření. Pro dosažení optimálního výkonu musí být ionty do Orbitrapu zavedeny za pečlivě kontrolovaných podmínek. To je obvykle zajištěno pomocí tzv. C-trapu, což je zakřivená lineární iontová past sloužící jako zaostřovací zařízení. Ionty se

hromadí v C-trapu, jsou ochlazovány pomocí dusíkové tlumicí atmosféry a následně uvolňovány v krátkých, zaostřených pulsech do Orbitrap analyzátoru. Kritické parametry, jako je načasování vstříku, prostorové zaostření a počáteční rozdělení rychlostí iontů, musí být jemně nastaveny, aby bylo zajištěno koherentní pohyb iontů a maximalizováno rozlišení. Hmotnostní přesnost se obvykle pohybuje mezi 0,5 až 3 ppm, což umožňuje spolehlivou identifikaci a kvantifikaci analytů i ve složitých směsích. Rozlišovací schopnost je dána trváním a koherencí axiálních oscilací, přičemž delší doby měření přinášejí vyšší rozlišení (Gross, 2017).

2.2. Přístupy v proteomice založené na hmotnostní spektrometrii

MS se v proteomice používá v různých analytických přístupech, z nichž každý je optimalizován pro specifické experimentální potřeby. Volba přístupu závisí na faktorech, jako jsou cíle analýzy proteinů, požadavky na kvantifikaci, rozsah studie a dostupnost vzorků. Mezi hlavní přístupy patří bottom-up a top-down proteomika, data-dependent acquisition (DDA) a data-independent acquisition (DIA). Každý z těchto přístupů má své výhody i nevýhody a moderní technologie umožňují jejich kombinaci pro dosažení co nejpřesnějších výsledků (Shuken, 2023).

2.2.1. Top-down proteomika

Na rozdíl od přístupu bottom-up, při kterém se proteiny štěpí na peptidy ještě před hmotnostně spektrometrickou analýzou, top-down proteomika umožňuje studium intaktních proteinů bez nutnosti enzymatického štěpení. Tento přístup poskytuje komplexní pohled na proteoformy – konkrétní formy proteinů vzniklé kombinací PTM, alternativního sestřihu, mutací nebo proteolytických zkrácení – a umožňuje jejich přímou identifikaci (Po & Evers, 2023).

Top-down proteomika je mimořádně cenná při studiu proteinových izoform a PTM, jejichž informace bývají při štěpení v přístupu bottom-up často ztraceny. Používají se zde vysoce rozlišující hmotnostní analyzátory, jako je Orbitrap nebo FT-ICR, které umožňují přesné měření hmotnosti velkých biomolekul (Shuken, 2023). Klíčovým krokem je fragmentace intaktních proteinů, která musí být dostatečně efektivní a rovnoměrná, aby bylo možné lokalizovat modifikace na konkrétní místa v sekvenci.

V top-down přístupu se k fragmentaci intaktních proteinů využívá více typů metod, z nichž každá je založena na odlišném fyzikálně-chemickém mechanismu štěpení a má specifický vliv na míru a rozložení fragmentace v rámci proteinové sekvence. Fragmentace může probíhat na základě přenosu elektronů (např. electron transfer dissociation (ETD), nebo electron capture dissociation, (ECD)), kolizí s inertním plynem (např. higher-energy collisional dissociation,

HCD) nebo pomocí absorpce fotonů (ultraviolet photodissociation, UVPD). Tyto techniky se liší svou schopností zachovat labilní posttranslační modifikace, rovnoměrností generovaných fragmentačních iontů a efektivitou fragmentace ve střední části sekvence, která bývá u intaktních proteinů méně dostupná (Po & Eyers, 2023; Toby et al., 2016). Výběr konkrétního fragmentačního režimu závisí na typu analyzovaného proteinu, instrumentálním vybavení laboratoře a cílech experimentu, zejména pokud jde o lokalizaci modifikací a dosažení vysokého pokrytí sekvence (Toby et al., 2016).

Výhodou tohoto přístupu je možnost přímé detekce a kvantifikace konkrétních proteoform, včetně jejich posttranslačních úprav, bez nutnosti rekonstrukce z fragmentovaných peptidů. To značně snižuje chyby vyplývající z neúplného štěpení nebo špatné inferenci proteinového původu peptidů (Shuken, 2023). Top-down proteomika se ukazuje jako nepostradatelný nástroj zejména při studiu terapeutických proteinů, biomarkerů a při detailní strukturálně-funkční charakterizaci proteinů. Přesto však zůstává technicky náročnější – intaktní proteiny se obtížněji ionizují, mají širší distribuci nábojových stavů a jejich separace i fragmentace je složitější než u peptidů. Kromě vysokých požadavků na analytické vybavení (např. úzká izolační okna v kvadrupólu a vysoké rozlišení pro fragmentaci) je také nutné optimalizovat podmínky fragmentace pro konkrétní proteinové třídy a jejich modifikační stavy (Po & Eyers, 2023; Toby et al., 2016). Přestože se tento přístup v rutinní praxi zatím neprosadil v takové míře jako bottom-up, jeho význam roste zejména v oblasti klinického výzkumu a vývoje bioterapeutik.

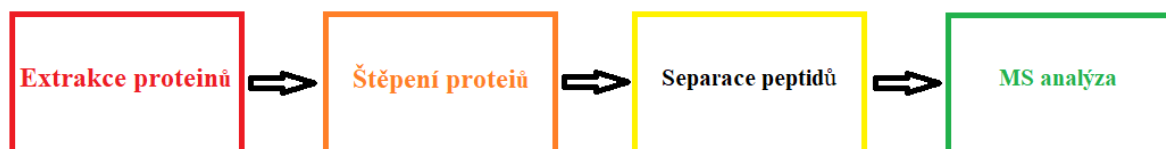
2.3. Bottom-up proteomika

Základním krokem v bottom-up proteomice je příprava vzorků, která má zásadní vliv na celkový úspěch, reprodukovatelnost a citlivost experimentu. Cílem je účinně převést komplexní proteinové vzorky na peptidy vhodné pro analýzu pomocí LC-MS/MS, přičemž je kladen důraz na minimalizaci kontaminace a ztrát vzorku.

Proces obvykle začíná extrakcí proteinů z buněk, tkání nebo tělních tekutin. Tento krok se často provádí za použití lyzačních pufrů obsahujících silná denaturační činidla, jako je močovina, sodná sůl deoxycholátu nebo guanidin-hydrochlorid, která rozrušují terciární strukturu proteinů a napomáhají solubilizaci membránově vázaných proteinů. V případě tkání se pro usnadnění lýzy často využívají také mechanické metody, jako je sonikace nebo homogenizace (Duong & Lee, 2023; Dupree et al., 2020).

Po solubilizaci proteinů následuje redukce a alkylace disulfidových můstků mezi cysteinovými zbytky, které stabilizují terciární strukturu a mohou bránit přístupu proteáz. K jejich štěpení se

používají redukční činidla, jako je dithiotreitol (DTT) nebo tris(2-karboxyetyl)fosfin (TCEP). Následně se aplikují alkylující činidla, jako je jodoacetamid, aby se zabránilo opětovnému vytvoření disulfidových vazeb. Tento krok zajišťuje lepší přístupnost polypeptidového řetězce k aktivnímu místu proteázy (Dupree et al., 2020; Willems, b.r.). Celý pracovní postup je popsán na obrázku 1.



Obrázek 1: Pracovní postup v bottom-up proteomice.

DDA je klasický přístup ke sběru dat v MS proteomice, při kterém jsou nejintenzivnější ionty z každé MS1 analýzy vybrány pro fragmentaci a následnou MS2 analýzu. Tento selektivní proces umožňuje získání kvalitních spekter, která jsou poté porovnávána s databázemi za účelem identifikace proteinů. Výhodou DDA je vysoká přesnost při identifikaci proteinů a možnost detailní analýzy jejich fragmentačních spekter. Nevýhodou je však preferenční zaměření na nejintenzivnější ionty, což může vést k opomenutí méně hojných proteinů. Tento přístup může být rovněž závislý na experimentálních podmínkách, což může negativně ovlivnit reprodukovatelnost mezi různými laboratořemi (Shuken, 2023).

Druhý modernější přístup v proteomice představuje DIA, při kterém jsou všechny detekované ionty systematicky fragmentovány nezávisle na jejich intenzitě. To umožňuje komplexní a reprodukovatelnou analýzu proteomu bez selektivního vynechávání iontů. Hlavní výhodou DIA je vyšší reprodukovatelnost a komplexnější pokrytí proteomu, což umožňuje přesnější kvantifikaci proteinů za různých biologických podmínek. Nevýhodou je naopak zvýšená komplexnost datové analýzy, která vyžaduje pokročilé bioinformatické zpracování (Shuken, 2023).

Po denaturaci, redukci a alkylaci jsou proteiny podrobeny enzymatickému štěpení, což představuje klíčový krok bottom-up proteomiky. Nejčastěji používaným enzymem je trypsin, který štěpí peptidové vazby na karboxylové straně lysinu a argininu, pokud za nimi nenásleduje prolin. Tato specifická vede k tvorbě peptidů s pozitivně nabitými konci, které se dobře ionizují a předvídatelně fragmentují během MS/MS analýzy. V závislosti na komplexnosti vzorku nebo specifických experimentálních požadavcích mohou být použity i jiné proteázy, jako Lys-C, Glu-C, chymotrypsin nebo Asp-N, a to buď samostatně, nebo v kombinaci s trypsinem. Použití více

proteáz je zvláště přínosné v případech, kdy je cílem dosáhnout širšího pokrytí proteomu nebo přesnějšího mapování posttranslačních modifikací (Tsiatsiani & Heck, 2015).

Na efektivitu štěpení má vliv více faktorů, včetně poměru enzymu k proteinu, pH, teploty a délky inkubace. Typický poměr trypsinu k proteinu je 1:20 pro štěpení přes noc při 37 °C, ale vyšší poměry nebo zvýšené teploty mohou být použity pro rychlejší štěpení v řádu minut až několika hodin. Pro udržení optimálního pH (7–9) pro enzymatickou aktivitu se běžně používají pufrы jako amonný hydrogenuhličitan nebo Tris (Willems, b.r.).

Navzdory svým výhodám má trypsin i určitá omezení. Část tryptických peptidů může být příliš krátká (méně než 6 aminokyselin), což znemožňuje jejich spolehlivou identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. Kromě toho mohou být proteiny s nízkým obsahem lysinu nebo argininu nedostatečně pokryty. Pokud se lysin nebo arginin nachází v blízkosti fosforylované nebo kyselé aminokyseliny, trypsin může toto místo vynechat. Dále trypsin neštěpí efektivně na úplném konci proteinu, což znamená, že tato oblast není detekována (Tsiatsiani & Heck, 2015). Pro překonání těchto nedostatků se v proteomice používají níže zmíněné alternativní proteázy.

Lys-C je serinová proteáza, která štěpí na karboxylové straně lysinových zbytků. V denaturačních podmínkách (např. 8 M močovina) je stabilnější než trypsin a často se využívá v dvoukrokovém protokolu, kde nejprve předštěpí proteiny před přidáním trypsinu. Tento postup minimalizuje počet neúplných štěpení a vede k tvorbě delších peptidů, což zlepšuje pokrytí sekvence (Tsiatsiani & Heck, 2015; Willems, b.r.).

Glu-C štěpí na karboxylovém konci kyseliny glutamové, a za určitých podmínek (např. ve fosfátovém pufru) také po kyselině asparagové. Tato serinová proteáza umožňuje přístup k kyselým oblastem proteinů, které bývají při tryptickém štěpení často opomenuty (Willems, b.r.).

Chymotrypsin preferuje velké hydrofobní aminokyseliny, jako jsou fenylalanin, tryptofan a tyrosin, a do určité míry také leucin a methionin. Díky těmto preferencím umožňuje detekci oblastí proteinů, které by trypsin mohl vynechat – zejména hydrofobních a membránově vázaných sekvencí, jež jsou obecně náročnější na analýzu (Tsiatsiani & Heck, 2015).

Asp-N je metaloproteáza, která štěpí na N-koncové straně kyseliny asparagové. Je užitečná především při mapování N-terminální části proteinů nebo při studiu posttranslačních modifikací (Willems, b.r.).

Lys-N štěpí na N-terminální straně lysinu a generuje peptidy s bazickým zbytkem na N-konci. V kombinaci s ETD fragmentací tyto peptidy poskytují přehledné a informativní fragmentační vzory, což rozšiřuje pokrytí proteomu. Naopak Arg-C štěpí za argininem podobně jako trypsin, ale jeho specifita je nižší – někdy štěpí i za lysinem, ačkoli by neměl. Tato nekonzistentní aktivita snižuje spolehlivost štěpení, a proto se Arg-C běžně nepoužívá v rutinních proteomických experimentech (Tsiatsiani & Heck, 2015).

Pepsin je aspartátová proteáza s optimálním pH v rozmezí 1–3. Štěpí proteiny neselektivně s preferencí k hydrofobním a aromatickým aminokyselinám. Vzhledem k nepředvídatelné tvorbě peptidů se běžně ve standardní bottom-up proteomice nepoužívá. Uplatnění však nachází v experimentech s výměnou vodíku za deuterium (HDX-MS), které slouží ke studiu dynamiky proteinů. HDX experimenty vyžadují štěpení při nízkém pH a nízké teplotě, aby se zabránilo zpětné výměně deuteria za vodík (Tsiatsiani & Heck, 2015; Willems, b.r.).

Podobnou proteázou je Nepenthesin II aspartátová proteáza pocházející z masožravé rostliny *Nepenthes gracilis*, která patří pod pepsinové proteázy. Vyznačuje se širokou substrátovou specifitou a je schopna štěpit peptidové vazby na C-koncové straně několika aminokyselinových zbytků. Rekombinantní nepenthesin II vykazuje vysokou enzymatickou stabilitu při kyselém pH a nízkých teplotách, což jej činí zvláště vhodným pro aplikace HDX-MS. Ve srovnání s pepsinem vykazuje lepší odolnost vůči denaturačním a redukčním činidlům, jako jsou močovina, guanidiniumchlorid a TCEP, a lze jej efektivně imobilizovat na pevné nosiče pro opakované použití v proteolytických postupech (Yang et al., 2015).

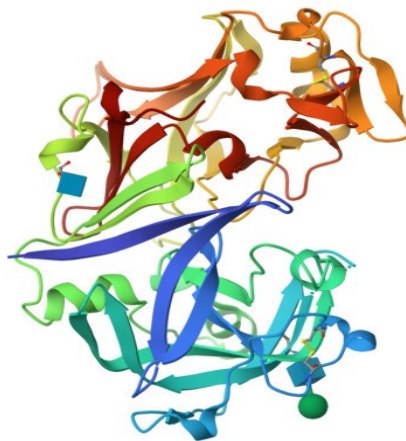
An-PEP (prolyl endoproteáza z *Aspergillus niger*) je serinová proteáza se specifickou afinitou ke štěpení peptidových vazeb na C-koncové straně prolinových zbytků. Tato jedinečná štěpící specifita ji činí mimořádně cennou v aplikacích hmotnostní spektrometrie s výměnou vodíku za deuterium (HDX-MS), kde umožňuje účinnou proteolýzu za kyselých podmínek (optimální aktivita při pH 2,5 a 0 °C), které zachovávají deuteraci. Na rozdíl od pepsinu produkuje An-PEP kratší peptidy a poskytuje lepší sekvenční rozlišení v oblastech bohatých na prolin (Tsiatsiani et al., 2017).

2.3.1. Proteázy použité v rámci diplomové práce

2.3.1.1. *Mucorpepsin*

Mucorpepsin (EC 3.4.23.23) je enzym patřící do skupiny aspartátových proteáz, tedy enzymů, které katalyzují hydrolytické štěpení peptidových vazeb v bílkovinách prostřednictvím dvou konzervovaných zbytků kyseliny asparagové v aktivním místě. Tento enzym je produkovan

vláknitými houbami rodu *Rhizomucor*, zejména druhy *Rhizomucor miehei* a *Rhizomucor pusillus* (Aktayeva et al., 2018; Feijoo-Siota et al., 2014). Struktura mucorpepsinu je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2: Krystalografická struktura mucorpepsinu.

Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/2ASI>

Primární uplatnění mucorpepsinu je v mlékárenském průmyslu, kde slouží jako srážecí činidlo při výrobě sýra. Jeho úkolem je srážet mléko mechanismem podobným účinku přirozeného telecího chymosinu, avšak s nižší tendencí způsobovat nežádoucí proteolytické štěpení mléčných bílkovin (Feijoo-Siota et al., 2014).

Zájem o mucorpepsin v průmyslu vzrostl v 60. letech 20. století, kdy došlo k nedostatku telecího syřidla. Od té doby se stal významnou alternativou k tradičním živočišným koagulantům. Mechanismus účinku mucorpepsinu je založen na specifickém štěpení vazby mezi fenylalaninem a methioninem v proteinu κ -kaseinu, který hraje klíčovou roli při stabilizaci kaseinových micel v mléce. Přidání mucorpepsinu vede k destabilizaci micel a iniciuje tvorbu sýřeniny, což je základní krok při výrobě sýra (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP) et al., 2024).

Enzym je syntetizován jako zymogen (neaktivní prekurzor), který získává enzymatickou aktivitu až po odstranění specifických segmentů. Zymogen mucorpepsinu se skládá ze tří funkčně odlišných částí: 22aminokyselinového signálního peptidu (zajišťujícího export enzymu z buňky), 47aminokyselinového propeptidu (udržujícího enzym v neaktivním stavu během translokace) a 361aminokyselinového zralého enzymu, který po aktivaci vykonává katalytickou funkci (Feijoo-Siota et al., 2014).

Stejně jako jiné aspartátové proteázy vykazuje mucorpepsin maximální aktivitu v kyselém prostředí, přičemž jeho optimální pH se pohybuje okolo hodnoty 4. Tento fakt je obzvláště výhodný v kontextu sýrařské výroby, kde přirozeně převládá mírně kyselé prostředí (Feijoo-Siota et al., 2014).

Jednou z výzev spojených s využíváním mucorpepsinu je jeho tepelná stabilita, tedy schopnost zachovat enzymatickou aktivitu i při zvýšených teplotách. Tato vlastnost je výhodná při tepelném zpracování mléka, může však být problematická během zrání sýra. Přetrvávající aktivita enzymu může vést k nadměrné proteolýze, což může způsobit vznik nežádoucích sensorických vlastností (např. hořkost), měkkou texturu nebo snížený výtěžek. K odstranění těchto nežádoucích účinků byly vyvinuty termolabilní varianty mucorpepsinu, které ztrácejí aktivitu při vyšších teplotách, a tím umožňují lepší kontrolu nad proteolytickým procesem. Jednou z možností je chemická modifikace, například oxidace methioninových zbytků peroxidem vodíku, která snižuje tepelnou stabilitu enzymu. Dalším přístupem je deglykosylace glykovaných zbytků enzymu, jež ovlivňuje jeho konformaci. Možností je rovněž cílená mutagenese, při níž jsou specifické aminokyseliny nahrazeny za účelem snížení stability (Feijoo-Siota et al., 2014).

Kromě svého primárního využití při tvorbě sýřeniny nachází mucorpepsin uplatnění i v dalších oblastech mlékárenských technologií. Díky selektivní proteolytické aktivitě se využívá při výzkumu urychleného zrání sýrů, při vývoji sensorických vlastností (uvolňováním chuťově aktivních peptidů), a také při produkci bioaktivních peptidů – tedy krátkých peptidových fragmentů, jimž jsou připisovány potenciálně příznivé účinky na lidské zdraví, jako je například snížení krevního tlaku (Mamo & Assefa, 2018).

2.3.1.2. *Rhizopuspepsin*

Rhizopuspepsin je, podobně jako mucorpepsin, aspartátová proteáza, která je sekretována houbou *Rhizopus chinensis* a je klasifikována číslem EC 3.4.23.21 (Dunn, 2013). Na úrovni sekvence i enzymatické funkce je homologní se savčím pepsinem, přestože je produkována extracelulárně houbovým organismem (Ohtsuru et al., 1982). Na obrázku 3 je znázorněna jeho struktura.



Obrázek 3: Krystalografická struktura rhizopuspepsinu.

Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/1UH7>

Enzym se obvykle izoluje z tekutých kultur *R. chinensis* pomocí víceúrovňového protokolu, který zahrnuje srážení síranem amonným, afinitní chromatografii s pepstatinem navázaným na sefárovu a separaci izoenzymů izoelektrickou fokusací (Ohtsuru et al., 1982). Takto byly získány různé izoformy s odlišnými pI, přičemž nejvýznamnější formy vykazují pI 5,1 a 5,8. Byly identifikovány také další, méně zastoupené izoformy s pI 7,35; 7,41 a 7,9, které však dosud nejsou detailněji charakterizovány.

Navzdory rozdílům v pI mají hlavní izoenzymy rhizopuspepsinu téměř identické aminokyselinové složení a molekulovou hmotnost přibližně 34 000 Da, a vykazují podobné enzymatické vlastnosti, včetně schopnosti hydrolyzovat kasein a aktivovat trypsinogen (Ohtsuru et al., 1982). Tato zjištění potvrzují, že izoformy jsou funkčně ekvivalentní a pozorované rozdíly jsou způsobeny především drobnými změnami v náboji molekuly.

Katalytické chování rhizopuspepsinu odpovídá typickým vlastnostem houbových aspartátových proteáz. Maximální aktivita byla pozorována v kyselém pH rozmezí 2,9 až 4,5 v závislosti na použitém substrátu. Studie substrátové specifity prokázaly výraznou preferenci štěpení za hydrofobními nebo aromatickými aminokyselinami, což je běžné pro aspartátové proteázy (Dunn, 2013).

3. Imobilizace enzymů

Imobilizace enzymů je proces jejich ukotvení na stacionární fázi při zachování jejich katalytické aktivity, což umožňuje jejich opakované nebo kontinuální využití v různých biologických procesech (Khan, 2021; Wouters et al., 2021). V kontextu proteomiky a dalších analytických disciplín si tento přístup získal značnou pozornost díky své schopnosti zlepšit stabilitu enzymů, usnadnit automatizaci a zajistit lepší kontrolu nad enzymatickými reakcemi. Imobilizované enzymy jsou často integrovány do průtokových reaktorů (IMERs), ve kterých mohou probíhat enzymatické reakce buď za kontinuálních, nebo přerušovaných průtokových podmínek v závislosti na konkrétní aplikaci (Wouters et al., 2021).

Tradiční štěpení proteinů v bottom-up proteomice probíhá v roztoku za přítomnosti volně rozpuštěných proteáz. Tento přístup však přináší několik omezení, včetně dlouhého trvání reakce (často až 24 hodin), během něhož může docházet k autolýze enzymu, což vede ke vzniku nežádoucích peptidů v konečné směsi a tím negativně ovlivňuje reprodukovatelnost analýz (Safdar et al., 2014; Wouters et al., 2021).

Imobilizace enzymů přináší řadu praktických výhod, mezi které patří zvýšená odolnost vůči změnám pH a teploty, snížená náchylnost k autolýze a možnost opakovaného použití enzymu v několika cyklech, což je zvláště výhodné při práci s dražšími proteázami (Khan, 2021; Santos et al., 2024). Imobilizované enzymy také často vykazují lepší toleranci vůči organickým rozpouštědlům a denaturačním činidlům, čímž se rozšiřuje jejich využitelnost v různých analytických aplikacích (*80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf*, b.r.; Safdar et al., 2014). Další výhodou v hmotnostně spektrometrické proteomice je eliminace kontaminace produkty autolýzy enzymu, což přispívá k čistším peptidovým směsím a vyšší kvalitě získaných spekter (Wouters et al., 2021).

Z praktického hlediska imobilizace umožňuje stabilní integraci enzymů do různých formátů, jako jsou mikroreaktory, naplněné kolony, membrány nebo mikrofluidní čipy, které jsou kompatibilní s online analytickými pracovními postupy včetně LC-MS/MS. Tyto formáty podporují přesnou kontrolu parametrů, jako jsou průtoková rychlost a retenční čas. V důsledku toho nepředstavují imobilizované enzymy pouze nástroje pro efektivní proteolýzu, ale také klíčovou součástí moderních a automatizovaných bioanalytických systémů vhodných pro rychlé a reprodukovatelné proteomické analýzy (Nagy et al., 2022; Safdar et al., 2014; Wouters et al., 2021).

3.1. Metody imobilizace

Imobilizace proteáz může být realizována chemickými nebo fyzikálními přístupy, přičemž každý z nich má specifické důsledky pro aktivitu a stabilitu enzymu. Volba vhodné metody závisí na vlastnostech samotného enzymu, typu nosičového materiálu a plánovaném způsobu použití (Khan, 2021; Santos et al., 2024).

3.1.1. Kovalentní vazba

Kovalentní vazba patří mezi nejčastěji využívané strategie imobilizace enzymů, zejména v aplikacích, kde je klíčová jejich stabilita a opakované použití. Tato metoda byla rovněž využita i v rámci tohoto projektu. Spočívá ve vytváření stabilních kovalentních vazeb mezi funkčními skupinami enzymu a reaktivními skupinami přítomnými na povrchu nosiče. Tyto interakce jsou za běžných podmínek prakticky ireverzibilní, což zajišťuje pevné uchycení enzymu na nosiči i při opakovaném použití (Khan, 2021; Santos et al., 2024; Wouters et al., 2021).

Mezi nejběžnější reaktivní skupiny na povrchu enzymu patří volné aminoskupiny (zejména z lyzinových zbytků), karboxylové skupiny (z kyseliny asparagové a glutamové), hydroxylové skupiny (ze serinu nebo threoninu), sulfhydrylové skupiny (z cysteinu) a imidazolová skupina histidinu. Přítomnost a dostupnost těchto skupin závisí na terciární struktuře enzymu a také na pH a iontové síle imobilizačního pufru (Khan, 2021).

Pro kovalentní navázání byly vyvinuty různé chemické metody aktivace pevných nosičů. Jedním z nejrozšířenějších systémů jsou nosiče obsahující aldehydové skupiny, jako například POROS™ 20 AL. Tyto nosiče reagují s aminoskupinami na povrchu enzymu za vzniku Schiffových bází, které se následně stabilizují redukční aminací pomocí sodné soli kyanoborohydridu, čímž vznikají stabilní sekundární aminové vazby (*80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf*, b.r.).

Alternativně lze použít epoxidem aktivované nosiče (např. POROS™ 20 EP), které reagují s nukleofilními skupinami enzymu, jako jsou aminoskupiny, thiolové nebo hydroxylové skupiny, prostřednictvím nukleofilní substituce. Epoxidová imobilizace se často provádí za alkalického pH, které podporuje nukleofilní atak, ačkoli v některých případech může negativně ovlivnit stabilitu enzymu, pokud není celý proces správně optimalizován (*80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf*, b.r.).

Pro zvýšení účinnosti imobilizace se často využívají vysolovací podmínky s použitím antichaotropních solí, jako je síran sodný. Tyto soli způsobují precipitaci enzymu na povrchu

nosiče a tím zvyšují jeho lokální koncentraci na rozhraní, čímž se zvyšuje výtěžnost navázání i povrchová hustota imobilizovaného enzymu (80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf, b.r.).

Navzdory četným výhodám může kovalentní imobilizace představovat riziko pro enzymatickou aktivitu, zejména pokud jsou během procesu modifikovány reaktivní skupiny přímo zapojené do katalýzy nebo skupiny důležité pro strukturální stabilitu enzymu. Ke snížení těchto rizik je třeba pečlivě optimalizovat parametry navázání, jako je poměr enzymu k nosiči, reakční doba a pH. V některých případech se používá tzv. *spacer* (spojovací můstek), který zlepšuje přístupnost aktivního místa po imobilizaci (Khan, 2021; Santos et al., 2024).

3.1.2. Adsorpce

Adsorpce představuje jednoduchou a nízkonákladovou metodu imobilizace enzymů založenou na slabých nekovalentních interakcích, jako jsou elektrostatické síly, vodíkové vazby a hydrofobní interakce mezi enzymem a povrchem nosičového materiálu. Tato metoda nevyžaduje žádnou chemickou modifikaci, což napomáhá zachování nativní struktury a aktivity enzymu, a je proto zvláště vhodná pro citlivé proteázy (Khan, 2021; Wouters et al., 2021). Účinnost imobilizace prostřednictvím adsorpce závisí na pH, iontové síle a povrchových vlastnostech jak enzymu, tak nosiče. Hlavní nevýhodou této metody je však nízká stabilita – enzymy se mohou z povrchu nosiče uvolňovat během průtoku, oplachování nebo při změně pufrůvacích podmínek (Khan, 2021; Wouters et al., 2021).

3.1.3. Zachycení a enkapsulace

Zachycení a enkapsulace jsou fyzikální metody imobilizace, při nichž jsou enzymy uzavřeny do porézní matrice nebo membrány bez přímého kovalentního navázání na nosič. Tyto metody se zakládají na fyzickém omezení pohybu enzymu, přičemž umožňují volnou difuzi substrátů a produktů dovnitř a ven z matrice, zatímco samotný enzym zůstává zachycen v systému (Khan, 2021; Wouters et al., 2021).

Zachycení se obvykle provádí pomocí polymerních gelů, sol-gel matric nebo porézních kuliček. Matrice se vytváří v přítomnosti enzymu, čímž dochází k jeho fyzickému uzamčení v pórovité struktuře. Tento formát dokáže enzym chránit před nepříznivými chemickými nebo environmentálními podmínkami, jako jsou změny pH nebo přítomnost organických rozpouštědel. Je vhodný také v případech, kdy je třeba zachovat nativní strukturu enzymu (Khan, 2021).

Enkapsulace se konkrétněji vztahuje k uzavření enzymu do polopropustných membrán nebo mikrokapslí. Tyto systémy mohou být následně integrovány do mikrofluidních zařízení nebo zabudovány do průtokových reaktorů, kde poskytují stabilní prostředí (Nagy et al., 2022).

Hlavním omezením těchto systémů je difuzní odpor. Póry matrice musí být dostatečně velké, aby umožnily průchod substrátů a produktů, ale zároveň dostatečně malé, aby udržely enzym uvnitř. U komplexních proteinových substrátů, běžně analyzovaných v proteomice, může omezený přístup k enzymu vést ke snížené účinnosti reakce. Kromě toho může variabilita velikosti a distribuce pórů ovlivnit reprodukovatelnost a výkonnost imobilizovaného enzymu (Wouters et al., 2021).

3.1.4. Funkcionalizace povrchů a afinitní interakce s kovy

Alternativou ke kovalentní nebo fyzikální imobilizaci je využití funkcionalizovaných povrchů, které umožňují afinitně založenou imobilizaci, jako je například koordinace s kovovými ionty nebo použití chemicky modifikovaných materiálů. Tyto metody umožňují imobilizaci enzymů prostřednictvím specifických interakcí bez nutnosti chemické reakce (Khan, 2021; Santos et al., 2024).

Jedním z nejčastějších přístupů je imobilizace enzymů na základě afinity ke kovovým iontům (např. Ni^{2+} , Cu^{2+}), které jsou koordinovány na povrchu nosiče. Tato metoda využívá aminokyselinové zbytky, jako jsou histidin a cystein, jež interagují s kovovými centry, čímž umožňují orientované a často reverzibilní navázání enzymu. To je obzvláště výhodné pro proteázy, u nichž je žádoucí, aby aktivní místo zůstalo během imobilizace volně přístupné – interakce s kovem může pomoci udržet funkční orientaci enzymu (Santos et al., 2024).

Další perspektivní technikou je chemická modifikace povrchů materiálů, jako je aktivní uhlí, za účelem zlepšení jejich interakce s enzymy. Aktivní uhlí je přirozeně porézní a hydrofilní, a jeho povrch lze dále modifikovat karboxylovými, hydroxylovými nebo glutaraldehydovými skupinami, které zvyšují schopnost zachytit enzym (Khan, 2021).

3.2. Typy reaktorů s imobilizovaným enzymem (IMERs)

IMERs jsou průtokové systémy, ve kterých jsou enzymy imobilizovány uvnitř nebo na povrchu pevného nosiče, skrze který následně protékají substráty podléhající enzymatické konverzi. V oblasti proteomiky umožňují rychlou, kontrolovanou a reprodukovatelnou proteolýzu přímo napojenou na LC-MS/MS. Formát IMERu výrazně ovlivňuje jeho výkon z hlediska účinnosti štěpení, odolnosti vůči tlaku a kompatibility s analytickými systémy. Z tohoto důvodu bylo

vyvinuto několik typů IMERů, z nichž každý má své specifické výhody (Safdar et al., 2014; Wouters et al., 2021).

3.2.1. Monolitické IMERY

Monolitické reaktory s imobilizovaným enzymem se skládají z kontinuální porézní struktury, obvykle na bázi polymerů nebo hybridních organicko-anorganických materiálů, která je připravována *in situ* polymerací přímo v kapilárách nebo kolonkách. Vysoce propojená síť pórů umožňuje konvekční tok, čímž se zlepšuje přenos hmoty mezi imobilizovaným enzymem a substrátem, což vede k rychlejšímu a efektivnějšímu štěpení (Safdar et al., 2014; Wouters et al., 2021).

Tyto reaktory mohou být chemicky funkcionalizovány během nebo po polymeraci za účelem zavedení reaktivních skupin pro kovalentní imobilizaci enzymů, například epoxidových skupin. Monolitická struktura nabízí nízký protiproudový odpor a vysokou propustnost, díky čemuž je vhodná pro integraci se systémy LC-MS využívanými v proteomice (Safdar et al., 2014; Wouters et al., 2021).

3.2.2. IMERY plněné částicemi (particle-packed IMERs)

IMERY plněné částicemi se skládají z chromatografických kolon naplněných porézními částicemi, na jejichž povrch jsou enzymy kovalentně navázány (Wouters et al., 2021). Tyto nosiče poskytují velkou povrchovou plochu pro imobilizaci enzymů a jsou kompatibilní s vysokotlakými kapalinovými chromatografickými systémy běžně používanými v proteomice. Často používaným médiem je POROS™ 20, a to buď s aldehydovými (AL), nebo epoxidovými (EP) funkčními skupinami. Ty umožňují stabilní kovalentní navázání proteáz prostřednictvím aminoskupin nebo thiolových zbytků (*80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf*, b.r.).

Particle-packed IMERY jsou komerčně dostupné a velmi vhodné pro online štěpení v rámci LC-MS/MS analýz, přičemž poskytují vysoce reprodukovatelné výsledky. Navíc jsou mechanicky stabilní a odolávají vysokým průtokům i tlakům (*80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf*, b.r.; Safdar et al., 2014).

3.2.3. Membránové a filtrační založené IMERY

IMERY založené na filtrech a membránách využívají tenké a porézní materiály k imobilizaci enzymů. V těchto systémech jsou proteázy navázány buď na povrchu membrány, nebo zachyceny v její porézní struktuře. Jakmile vzorek protéká membránou nebo po jejím povrchu,

substrátové proteiny přicházejí do přímého kontaktu s imobilizovanými enzymy, což umožňuje účinnou proteolýzu (Nagy et al., 2022).

Díky tenké a porézní povaze membrány je difuzní dráha, kterou musí substráty překonat, velmi krátká. Zároveň velká plocha membrány v poměru k jejímu objemu umožňuje vystavení většího množství enzymu najednou. Tyto vlastnosti zlepšují přenos hmoty a vedou k rychlejšímu a účinnějšímu trávení, zejména ve zařízeních s kontinuálním průtokem (Wouters et al., 2021).

Membránové IMERY jsou vhodné pro zpracování malých objemů vzorků a lze je snadno integrovat do kompaktních zařízení, jako jsou průtokové kazety. Jejich jednoduchý design, krátká doba štěpení a kompatibilita s nízkoobjemovými pracovními postupy z nich činí užitečný nástroj v proteomice, zejména v případech, kdy je množství vzorku omezené (Nagy et al., 2022).

3.2.4. Mikrofluidní IMERY (μ -IMERS)

μ -IMERY jsou miniaturní systémy, v nichž jsou enzymy imobilizovány v kanálcích nebo komorách mikrometrových rozměrů vytvořených na mikrofluidních čipech. Tato zařízení jsou navržena pro zpracování extrémně malých objemů vzorků a umožňují přesnou kontrolu nad průtokem, teplotou a délkou reakce, což je činí vhodnými pro integraci do automatizovaných analytických pracovních postupů (Nagy et al., 2022).

Enzymy v μ -IMEREch mohou být imobilizovány různými strategiemi – nanesením na vnitřní stěny mikrokanálů, naplněním kanálek částicemi s navázanými enzymy nebo vytvořením monolitických struktur přímo v čipu. Díky vysokému poměru povrchu k objemu umožňují μ -IMERY rychlou proteolýzu a často dosahují účinného štěpení během několika sekund (Wouters et al., 2021).

4. Trastuzumab

Trastuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka, komerčně známá jako Herceptin, která se primárně využívá při léčbě HER2-pozitivního karcinomu prsu. HER2 (lidský receptor pro epidermální růstový faktor 2), známý také jako ErbB2, je transmembránová receptorová tyrosinkináza patřící do rodiny receptorů ErbB, mezi které dále náleží HER1, HER3 a HER4. Tyto receptory sdílejí podobnou strukturu, sestávající ze tří domén: extracelulární domény vázající ligand, transmembránové domény a intracelulární domény s tyrosinkinázovou aktivitou (Gemmete & Mukherji, 2011; Harries & Smith, 2002).

HER2 je mezi členy rodiny ErbB unikátní tím, že nemá známý přirozený ligand. Jeho nadměrná exprese však podporuje spontánní dimerizaci s jinými ErbB receptory, což vede k trvalé aktivaci downstream signálních drah zapojených do buněčné proliferace, diferenciace, angiogeneze a inhibice apoptózy. Amplifikace genu HER2, často detekovatelná pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH), je molekulárním základem této nadměrné exprese a vyskytuje se přibližně u 20–30 % invazivních karcinomů prsu (Gemmete & Mukherji, 2011; Harries & Smith, 2002).

Trastuzumab byl vyvinut k selektivnímu zacílení na extracelulární doménu receptoru HER2. Je odvozen od myší protilátky 4D5, která vykazovala inhibiční účinek na růst HER2-pozitivních buněčných linií karcinomu prsu. Za účelem snížení imunogenicity u člověka byla myší protilátka humanizována transplantací oblastí vázajících antigenů do lidského skeletu třídy IgG1, čímž vznikla molekula s přibližně 95% lidskou strukturou (Harries & Smith, 2002).

Mechanismus účinku Trastuzumabu je mnohostranný. V první řadě se protilátka váže s vysokou afinitou na doménu IV extracelulární části HER2 receptoru. Tato vazba zabráňuje dimerizaci receptorů, čímž dochází k bloádě aktivace intracelulárních tyrosinkináz a signálních drah jako MAPK a PI3K-Akt, které jsou klíčové pro buněčný cyklus a přežití buněk. Výsledkem léčby je zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Trastuzumab rovněž podporuje internalizaci a degradaci receptoru HER2, čímž snižuje jeho dostupnost na povrchu buněk (Gemmete & Mukherji, 2011; Harries & Smith, 2002).

Kromě přímé inhibice signální transdukce Trastuzumab aktivuje i imunitní efektorové mechanismy. Může indukovat protilátkami závislou buněčnou cytotoxicitu (ADCC), při níž jsou imunitní buňky, například přirození zabíječi (NK buňky), přitahovány k nádorovým buňkám pokrytým protilátkami a dochází k jejich zničení (Gemmete & Mukherji, 2011; Harries & Smith, 2002).

5. Cíle práce

Cílem diplomové práce byla optimalizace štěpení modelových proteinů a protilátky pomocí mucorpepsinu a rhizopuspepsinu při různých hodnotách pH a při různých koncentracích redukčního a denaturačního činidla. Druhým cílem byla příprava a charakterizace průtokových reaktorů s imobilizovanými proteázami pro validaci biologických léčiv.

6. Použité přístroje, chemikálie a roztoky

6.1. Přehled potřebných přístrojů a vybavení

Analytická kolona pro Agilent 1290 Infinity II Luna® Omega Polar C18 (100 × 1 mm)	Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA
Analytická kolona pre EvosepOne PepSep C18 (4 cm × 150 µm)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo
Analytická kolona pre Vanquish UHPLC PepSep C18 (15 cm × 150 µm)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo
Analytická váha NewClassic ML	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Švajčiarsko
Analytická váha Entris II	Sartorius, Göttingen, Německo
Automatické pipety	Rainin Instrument, LLC, Oakland, CA, USA
Centrifuga 5920 R	Eppendorf, Hamburg, Německo
Centrifuga Minispin	Eppendorf, Hamburg, Německo
Centrifuga sigma 3-18K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Německo
Elektroforéza Powerpac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Evosep One	Evosep Biosystems, Odense, Dánsko
Evotips (Evotypy)	Evosep Biosystems, Odense, Dánsko
Hmotnostní spektrometr Maxis	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo
Hmotnostní spektrometr TimsTOF SCP	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Německo
Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity II	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Třepačka MR-12	Biosan SIA, Riga, Lotyšsko
mini-centrifuga Fisherbrand™ model HS120621	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Odsolovací kolona PD-10	Cytiva, Marlborough, MA, USA
pH metr Hanna edge	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
prekástované gely Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
termostat MB-102	Bioer Technology Co., Ltd., Hangzhou, Čína
UV/VIS spektrofotometr Jenway 7205	Jenway, Staffordshire, Spojené království
Vanquish UHPLC	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Zachytávací kolona Luna® Omega Polar C18 (20 × 0,3 mm) (Agilent 1290 Infinity II)	Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA
Zachytávací kolona Micro Trap Positive C18 (10 × 0,3 mm) (Vanquish UHPLC)	Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA

6.2. Přehled použitých chemikálií

2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Acetonitril	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Amoniak 25% vodný roztok	Lachner, s.r.o., Neratovice, Česko
Coomassie Brilliant blue R250	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Ethanol	VWR International, Leuven, Belgicko
Etanolamin	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Fromase® 220 TL BF	DSM Food Specialties B.V., Delft, Holandsko
Guanidin hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Herzuma	Celltrion Healthcare Co., Ltd., Incheon, South Korea
Hydroxid sodný	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Karbonická anhydráza z hovězích erytrocytů	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Kyanoborohydrid sodný	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Kyselina citrónová	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Kyselina chlorovodíková	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo
Kyselina mravenčí	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Kyselina octová	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Leammi vzorkový pufr	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Močovina	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Myoglobin z koňského srdce	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
Fosforylasa B z zaječího svalu	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
POROS™ 20 AL Aldehyde Activated Resin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Rhizopuspepsin	Dr. Daniel Rozbeský, rozbezkylab.org, Česko
Síran sodný	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo

Thiomočovina	VWR International, Leuven, Belgicko
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo
TRIS/glycin SDS pufr	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Voda pre LC/MS (LiChrosolv®)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Německo

6.3. Seznam roztoků

- Promývací roztok 20 mM citrát amonný pH 5,0
- Barvicí roztok (1 L) – 1 g Coomassie Brilliant blue R250, 10% kyselina octová (100 mL), 40% etanol (400 mL) a voda (500 mL)
- Odfarbovací roztok (1 L) – 10% kyselina octová (100 mL), 30% etanol (300 mL) a voda (600 mL)
- 20 mM mravenčan amonný pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0
- 0,2% a 0,4% kyselina mravenčí
- Quench pufr použitý pri imobilizácii proteáz – 2M ethanolamin, 100mM NaBH₃CN a 50mM citrát sodný pH 5,0
- 1. promývací pufr použitý při imobilizaci proteáz – 50mM acetát sodný pH 5,0
- 2. promývací pufr použitý při imobilizaci proteáz – 50mM acetát sodný s 1M NaCl pH 5,0
- 3. promývací pufr použitý při imobilizaci proteáz – 50mM citrát sodný
- Running buffer – 10 krát naředěný TRIS/glycínový pufr
- Vzorkový pufr Leammli s 10 krát naředěným merkptoethanolem

7. Použité metody

7.1. Výměna pufru pomocí gravitační gelové filtrace

K výměně pufrového prostředí byla využita kolona PD-10, která byla předem ekvilibrována 25 mL 20 mM citrátem amonným pH 5,0. Na přípravu kolonu bylo následně naneseno 2,5 mL roztoku Fromase 220TL a rhizopuspepsinu. Po absorbování vzorku do gelu byla provedena eluce proteáz pomocí 3,5 mL stejného citrátového pufru. Eluované frakce byly zachyceny do 15 plastových zkumavek a dále analyzovány. Stanovení koncentrace proteáz proběhlo spektrofotometricky při 280 nm absorbancii.

7.2. Štěpení modelových proteinů v roztoku při různém pH

Štěpení modelových proteinů Myoglobin (MYG) ($c = 10 \text{ mg/mL}$), karbonická anhydráza (bCA) ($c = 10 \text{ mg/mL}$) a glykogen fosforylasa (PYGM) ($c = 10 \text{ mg/mL}$) proteázami mucorpepsin a rhizopuspepsin bylo prováděno v 20 mM citrátu amonném při pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5. Měření bylo provedeno v duplikátu. Do Eppendorfovy zkumavky bylo napipetováno 36 μL pufru (20 mM amonný citrát s pH upraveným pomocí 12,5% NH_4OH a HCl), 2 μL směsi tří proteinů (každý o koncentraci 10 mg/mL) a 2 μL proteázy o koncentraci 0,1 mg/mL . Paralelně byly připraveny i kontrolní vzorky bez přítomnosti proteáz. Štěpení probíhalo při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Následně byla reakce zastavena alkalizací vzorku pomocí 12,5% NH_4OH . Z reakční směsi bylo následně odebráno 12 μL , ke kterým byly přidány 4 μL vzorkového pufru. Vzorky byly před analýzou pomocí SDS-PAGE zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut v termobloku.

7.3. SDS-PAGE

K vyhodnocení účinnosti proteolýzy byla použita metoda SDS-PAGE. K separaci byly použity předlité gradientové gely s deseti jamkami o koncentraci 4–20 % a dvanácti jamkami o koncentraci 8–16 % (Bio-Rad).. SDS dodává proteinům jednotný záporný náboj a zajišťuje jejich denaturaci, zatímco merkaptethanol redukuje disulfidické můstky mezi cysteinovými zbytky. Po denaturaci byly jednotlivé vzorky naneseny do jamek gelu, který byl ponořen do elektroforetického pufru uvnitř elektroforetické vany. Spolu se vzorky byl do gelu aplikován také marker s definovanými molekulovými hmotnostmi. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji napětí, které bylo nejprve nastaveno na 100 V a po migraci vzorků do gelu zvýšeno na 140 V. Po dokončení elektroforézy byl gel vyjmut a obarven roztokem Coomassie Brilliant

Blue za účelem vizualizace proteinových pásů. Následně byl několikrát promyt odbarvovacím roztokem, aby se odstranilo pozadí, a uskladněn v 1% kyselině octové.

7.4. Štěpení modelových proteinů v roztoku v přítomnosti denaturačního a redukčního činidla TCEP

Štěpení modelových proteinů MYG (c = 10 mg/mL), bCA (c = 10 mg/mL) a PYGM (c = 10 mg/mL) proteázami mucorpepsin a rhizopuspepsin bylo prováděno v roztoku o pH 2,5; 3,5 a 4,5. Pro každé z těchto pH byly připraveny šest variant vzorků jako je popsáno v tabulce 1, s tím že vzorky bez močoviny a TCEP byly přichystány dva krát. Měření bylo provedeno v duplikátu. Paralelně byly připraveny i kontrolní vzorky bez přítomnosti proteáz.

Stípec1	pH	1 M močovina	3 M močovina	10 mM TCEP	100 mM TCEP
1. podmínka	2,5	-	-	-	-
2. podmínka	2,5	+	-	-	-
3. podmínka	2,5	-	+	-	-
4. podmínka	2,5	-	-	+	-
5. podmínka	2,5	-	-	-	+
6. podmínka	3,5	-	-	-	-
7. podmínka	3,5	+	-	-	-
8. podmínka	3,5	-	+	-	-
9. podmínka	3,5	-	-	+	-
10. podmínka	3,5	-	-	-	+
11. podmínka	4,5	-	-	-	-
12. podmínka	4,5	+	-	-	-
13. podmínka	4,5	-	+	-	-
14. podmínka	4,5	-	-	+	-
15. podmínka	4,5	-	-	-	+

Tabulka 1: Podmínky štěpení modelových proteinů mucorpepsinem a rhizopuspepsinem.

Štěpení probíhalo při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Následně byla reakce zastavena alkalizací vzorku pomocí 12,5% NH₄OH. Z reakční směsi bylo odebráno 12 μL, ke kterým byly přidány 4 μL vzorkového pufru. Vzorky byly následně zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut v termobloku a analyzovány pomocí SDS-PAGE.

7.5. Štěpení protilátky Trastuzumab

Štěpení protilátky Trastuzumab proteázami mucorpepsin a rhizopuspepsin bylo prováděno v roztoku o pH 2,5 a 3,5 při třech různých teplotách: 4 °C, 25 °C a 30 °C. Pro každé pH bylo připraveno deset variant vzorků, které sú popsány v tabulce 2.

Stĺpec1	pH	1 M močovina +				
		100 mM TCEP	3 M močovina	0,5 M thiomčovina	1 M močovina + 1 M thiomčovina	2 M močovina + 1 M thiomčovina
1. podmínka	2,5	-	-	-	-	-
2. podmínka	2,5	+	-	-	-	-
3. podmínka	2,5	-	+	-	-	-
4. podmínka	2,5	+	+	-	-	-
5. podmínka	2,5	-	-	+	-	-
6. podmínka	2,5	-	-	-	+	-
7. podmínka	2,5	-	-	-	-	+
8. podmínka	2,5	+	-	+	-	-
9. podmínka	2,5	+	-	-	+	-
10. podmínka	2,5	+	-	-	-	+
11. podmínka	3,5	-	-	-	-	-
12. podmínka	3,5	+	-	-	-	-
13. podmínka	3,5	-	+	-	-	-
14. podmínka	3,5	+	+	-	-	-
15. podmínka	3,5	-	-	+	-	-
16. podmínka	3,5	-	-	-	+	-
17. podmínka	3,5	-	-	-	-	+
18. podmínka	3,5	+	-	+	-	-
19. podmínka	3,5	+	-	-	+	-
20. podmínka	3,5	+	-	-	-	+

Tabulka 2: Podmínky štěpení protilátky Trastuzumab mucorpepsinem a rhizopuspepsinem.

Měření bylo provedeno v duplikátu. Kromě toho byly připraveny i kontrolní vzorky bez přítomnosti proteáz. Štěpení bylo provedeno při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byla reakce zastavena alkalizací vzorku pomocí 12,5% NH₄OH. Z reakční směsi bylo odebráno 12 µL, ke kterým byly přidány 4 µL vzorkového pufru. Vzorky byly zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut v termobloku a analyzovány metodou SDS-PAGE.

7.6. Optimalizace pH pro proteolytické štěpení na základě analýzy LC-MS/MS

Vzorky byly připraveny obdobně jako v kapitole 7.2. Štěpení modelových proteinů v roztoku při různém pH. Před analýzou pomocí systému Thermo Scientific™ Vanquish™ UHPLC spojeného s hmotnostním spektrometrem Bruker timsTOF byly vzorky 20krát naředěny 0,1% kyselinou trifluoroctovou (TFA). Spojení těchto dvou analytických nástrojů umožnilo vysoce rozlišovací chromatografickou separaci a zároveň citlivou a přesnou detekci iontů. Chromatografická separace probíhala na koloně s reverzní fází C18 (150 mm × 150 µm), která byla udržována při konstantní teplotě za účelem zajištění stabilních retenčních časů a reprodukovatelnosti piků. Mobilní fáze se skládala z rozpouštědla A (LC-MS voda s 0,1%

kyselinou mravenčí) a rozpouštědla B (98% acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí). Peptidy byly eluovány lineárním gradientem po dobu 20 minut, přičemž se postupně zvyšoval podíl organického rozpouštědla, aby došlo k eluování peptidů na základě jejich hydrofobicity (0–3 min 5 % B / 95 % A; 4–18 min 35 % B / 65 % A; 19–20 min 90 % B). Systém Vanquish byl přímo napojen na hmotnostní spektrometr Bruker timsTOF, který pracoval v režimu paralelní akumulace a sériové fragmentace. Tento akviziční režim využívá kombinaci separace iontů podle mobility a TOF detekce, čímž umožňuje vysokou rychlost a citlivost sekvenování. Pro hmotnostně spektrometrickou analýzu byla použita metoda zavedená v rámci laboratoře. Rozsah hmotnostních skenů v MS1 byl nastaven na m/z 100 až 1700, což umožňuje zachytit široké spektrum peptidových iontů. Ionty byly separovány na základě jejich mobility v rozsahu $1/K_0$ od 0,7 do 1,66 ($V \cdot s$)/ cm^2 . Během každého cyklu bylo zaznamenáno pět PASEF skenů, což umožnilo vysokou rychlost sekvenování. Fragmentace prekurzorových iontů byla realizována pomocí kolizně indukované disociace (CID).

7.7. Imobilizace rhizopuspepsinu a mucorpepsinu na aldehydem aktivovaný nosič POROS™ 20 AL

Proteáza rhizopuspepsin byla původně dodána v pufru obsahujícím 15 mM Tris-HCl a 150 mM NaCl upraveném na pH 8,0 v celkovém objemu 5 ml a před samotnou imobilizací bylo nutné její aktivaci a následná koncentrace. Pro iniciaci enzymatické aktivity za mírně kyselých podmínek bylo k roztoku přidáno 700 μ L 1M glycinu. Směs byla jemně promíchána a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po ukončení inkubace byl enzymový roztok přenesen do filtrační jednotky Amicon® Ultra s mezní molekulovou hmotností 10 kDa a centrifugován při 4000 g až do snížení objemu přibližně na 2,5 mL. Tento krok sloužil k zahuštění enzymu a zároveň umožnil částečné odstranění nízkomolekulárních látek. Následně byl enzymový roztok podroben výměně pufru pomocí odsolovací kolony PD-10, která byla předem ekvilibrována 25 mL pufru s 50 mM amonného citrátu upraveného na pH 5,0. Rhizopuspepsin byl poté eluován do 3,5 mL téhož pufru. Po purifikaci byla jeho koncentrace spektrofotometricky změřena při absorbanci na vlnové délce 280 nm. Na základě změřené koncentrace bylo následně odváženo požadované množství nosiče POROS™ 20 AL tak, aby byl zachován hmotnostní poměr 25 mg nosiče na 1 mg enzymu.

Mucorpepsin byl připraven z komerčně dostupné směsi Fromase 220TL, z které bylo odebráno 20 ml do filtrační jednotky Amicon® Ultra s molekulovou hmotnostní cut-off 10 kDa a centrifugováno při 4000 \times g až do zmenšení objemu přibližně na 5 ml. Tento krok sloužil k

zakoncentrování enzymu a zároveň umožnil částečné odstranění nízkomolekulárních látek. Následně bylo 5 ml roztoku enzymu podrobena výměně pufru pomocí odsolovací kolony PD-10, která byla předem ekvilibrována 25 ml pufru 50 mM citrátu amonného upraveného na pH 5,0. Mucorpepsin byl poté eluován do 7 ml stejného pufru. Po purifikaci byla koncentrace enzymu spektrofotometricky určena při absorpenci na vlnové délce 280 nm.

Na základě naměřené koncentrace bylo následně odváženo požadované množství POROS™ 20 AL tak, aby byl zachován hmotnostní poměr 5 mg nosiče na 1 mg enzymu. Po navážení byl nosič přímo přidán do roztoku enzymu a směs byla důkladně promíchána. Pro podporu tvorby Schiffovy báze mezi aldehydovými skupinami nosiče a aminoskupinami enzymu byl do reakční směsi přidán síran sodný v poměru 1:1 k objemu suspenze enzym–nosič. Přidávání probíhalo po 100 µL, aby se předešlo lokální srážení nebo vzniku koncentračních gradientů. Směs byla následně inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě na rotačním třepače, která zajišťovala rovnoměrné promíchávání. Po 30 minutách byl do reakční směsi přidán NaBH₃CN, jehož úlohou byla stabilizace vytvořených Schiffovýchází prostřednictvím redukční aminace. Čerstvě připravený roztok NaBH₃CN v pufru s 50 mM amonným citrátem upraveným na pH 5,0 byl přidán tak, aby konečná koncentrace činila 46 µg NaBH₃CN na 1 ml celkového objemu reakce. Roztok byl jemně promíchán a zkumavka byla utěsněna parafilmem. Připravená směs byla promíchávána na rotační třepače přes noc při laboratorní teplotě v digestoři.

Následující den po ukončení imobilizační reakce byly zbylé reaktivní aldehydové skupiny na nosiči POROS™ 20 AL zablokovány, aby se předešlo nespecifické vazbě proteinů během následných aplikací. K tomuto účelu byl použit čerstvě připravený zastavovací roztok (2 M ethanolamin, 100 mM NaBH₃CN a 50 mM pufr citrátu sodného upravený na pH 5,0 pomocí HCl), který byl přidán k reakční směsi v poměru 320 µL na 1 ml celkového objemu imobilizační reakce. Výsledná směs byla inkubována po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě za stálého míchání na rotační třepače, čímž bylo zajištěno úplné zablokování nezreagovaných aldehydových míst prostřednictvím redukční aminace.

Po ukončení blokace reaktivních aldehydových skupin byla reakční směs obsahující imobilizovaný rhizopuspepsin přenesena do 50ml centrifugační zkumavky a naředěna puftrem 50 mM octanu amonného (pH = 5,0) na konečný objem 50 ml. Suspenze byla centrifugována při 1000 × g po dobu 10 minut při 20 °C za účelem sedimentace nosiče. Pro minimalizaci ztráty nosiče bylo použito dvou zkumavkové promývání. Po každé centrifugaci (10 min, 1000 × g, 20 °C) byl supernatant přenesen do druhé zkumavky, ze které byl po následné centrifugaci vylit do odpadu. Pelet (usazený nosič) v hlavní zkumavce byl resuspendován v promývacích pufrech

podle následujícího postupu: dvakrát pufr 50 mM octanu sodného (pH 5,0) pro odstranění volně navázaných látek; jednou pufr 50 mM octanu sodného s 1 M NaCl (pH 5,0); opět pufr 50 mM octanu sodného (pH 5,0). Následně byly peletové částice z obou zkumavek spojeny a přeneseny do 15ml centrifugační zkumavky, kde byl nosič ještě dvakrát promyt pufr 50 mM citrátu sodného (pH 5,0). Nakonec byl nosič resuspendován v citrátovém pufru (50 mM, pH 5,0) v poměru nosič : pufr = 1:4 a uchováván při 4 °C až do dalšího použití.

7.8. Plnění kolon

Po imobilizaci proteáz byly připraveny dvě kolony určené k enzymatickému štěpení proteinů. Jedna obsahovala suspenzi nosiče POROS™ 20 AL s imobilizovaným rhizopuspepsinem a druhá s mucorpepsinem.

Na jeden konec prázdné kolony byla nasazena frit, která zajišťovala zadržení nosiče, zatímco druhý konec byl uzavřen plastovým kroužkem bez frity, ke kterému byla připojena plnicí hadička. Prostřednictvím injekční stříkačky Hamilton byla přes tuto hadičku do kolony pomalu zaváděna suspenze nosiče s imobilizovanou proteázou. Po naplnění byly kolony promyty pufr 50 mM citrátu amonného (pH 5,0), aby se stabilizovalo prostředí před jejich použitím při štěpení proteinů v kontinuálním režimu.

7.9. Štěpení protilátky Trastuzumab analyzované prostřednictvím LC-MS/MS

Reakční směs byla připravována v 96 jamkové destičce a podmínky štěpení odpovídaly kapitole 10.6., s tím rozdílem, že objem byl 20 µL a finální množství protilátky činilo 5 µg a enzymu 0,05 µg. Inkubace vzorků při pH 2,5 a 3,5 probíhala při teplotě 25 °C, a při pH 2,5 navíc i při teplotě 4 °C. Reakce byla zastavena přidáním 180 µL 0,5 M TRIS pufru upraveného na pH 8,0. Pro samotnou analýzu bylo z reakční směsi odebráno 10 µL, které byly naneseny na Evtipy, jež byly nejprve aktivovány postupným nanesením a následnou centrifugací jednotlivých roztoků. Nejprve bylo přidáno 20 µL isopropanolu (IPA) a špičky byly centrifugovány při 700 × g po dobu 80 sekund. Poté bylo přidáno 50 µL acetonitrilu a použity stejné podmínky centrifugace. Nakonec bylo přidáno 50 µL roztoku 0,1 % kyseliny mravenčí (FA). Po těchto krocích bylo na Evtip naneseno 10 µL vzorku obsahujícího peptidy, které byly opět centrifugovány za stejných podmínek. Po nanesení peptidů byl Evtip promyt 50 µL roztoku 0,1 % FA a nakonec byla provedena krátká centrifugace se 100 µL roztoku 0,1 % FA, čímž byla příprava vzorku dokončena. Vysoce výkonná proteomická analýza byla provedena

pomocí systému Evosep One propojeného s hmotnostním spektrometrem timsTOF SCP. Systém pracoval podle přednastavené metody 200 vzorků za den, která se vyznačuje 5,6 minutovým chromatografickým gradientem a celkovým časem analýzy přibližně 7,2 minut na vzorek, což umožňuje efektivní a rozsáhlou analýzu vzorků. Chromatografická separace probíhala na koloně C18 optimalizované pro rychlé gradienty (4 cm × 150 μm, částice o velikosti 1,9 μm). Použité mobilní fáze byly rozpouštědlo A (voda s 0,1 % kyseliny mravenčí) a rozpouštědlo B (98 % acetonitril s 0,1 % kyseliny mravenčí). Předdefinovaný gradient Evosep nebyl upravován, což zajistilo reprodukovatelnost ve všech cyklech.

Analýza hmotnostní spektrometrií byla provedena na přístroji timsTOF SCP pomocí režimu PASEF. Přístroj byl nakonfigurován s plným rozsahem skenování MS1 od m/z 100 do 1700 a rozsahem separace pohyblivosti iontů ($1/K_0$) od 0,7 do 1,6 (V·s)/cm². Každý akviziční cyklus zahrnoval pět PASEF skenů, což umožnilo rychlou a citlivou fragmentaci iontových prekurzorů. Fragmentace byla dosažena pomocí CID s aktivovanou dynamickou exkluzí. Získaná data byla zpracována pomocí softwaru Bruker DataAnalysis, kde byly seznamy píků exportovány ve formátu *.mgf a podrobeny databázovému prohledávání pomocí nástroje Mascot.

7.10. Štěpení modelových proteinů v průtokovém reaktoru s imobilizovaným rhizopuspepsinem a jejich analýza pomocí LC-MS/MS

Vzorky pro analýzu v průtokovém reaktoru byly připravovány pomocí robotického autosampleru PAL systém, který je standardně konfigurován pro analýzy výměny vodíku za deuterium (HDX). V tomto případě však byl upraven pro online enzymatické štěpení RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D. Automatický pipetovací systém nasával 90 μL pufru a 10 μL roztoku proteinů ze zásobního roztoku o koncentraci 10 μM. Následně byla vzorka injektována do průtokového reaktoru, kde byla posouvána pomocí izokratického čerpadla s mobilní fází obsahující 0,2 % kyseliny mravenčí ve vodě při průtoku 100 μL/min. Vstříknuté vzorky tedy nejprve prošly přes štěpící kolonu obsahující imobilizovanou proteázu rhizopuspepsin uchovávanou při 4 °C. Vzniklé peptidy byly následně zachyceny na C18 zachytávací koloně (20 mm × 0,3 mm). Během fáze zachytávání byly všechny nenavázané složky směřovány do odpadu, čímž došlo k odstranění nežádoucích komponent.

Po počáteční pětiminutové fázi zachytávání byl aktivován přepínací ventil, který do systému zavedl gradient mobilní fáze, čímž se umožnila eluce navázaných peptidů na analytickou C18 (100 × 1 mm) kolonu a jejich separaci na základě hydrofobicity. Chromatografická separace probíhala během 50minutového gradientu s mobilní fází A (voda s 0,1 % kyseliny mravenčí) a B (98 % acetonitril s 0,1 % kyseliny mravenčí). Gradient byl následující: 0–5 min 5 % B / 95 % A; 6–39 min 35 % B / 65 % A; 40–42 min 90 % B / 10 % A; poslední minuty probíhala reekvilibrace kolony na 5 % B / 95 % A. Hmotnostní spektrometrie byla realizována na přístroji Bruker Maxis v pozitivním ionizačním režimu s použitím ESI. MS1 spektra byla zaznamenávána v rozsahu m/z 200–1700, následována akvizicí MS/MS spekter metodou DDA s využitím CID fragmentace. Pro maximalizaci pokrytí proteomu byla použita dynamická exkluze, která omezovala opakované sekvenování týchž prekurzorových iontů. Získaná data byla zpracována pomocí softwaru Bruker Compass DataAnalysis. Seznam píků byl exportován ve formátu *.mgf a následně podroben databázovému prohledávání pomocí nástroje Mascot.

7.11. Štěpení modelových proteinů v průtokovém reaktoru s imobilizovaným mucorpepsinem a jejich analýza pomocí LC-MS/MS

Při experimentech zahrnujících štěpení pomocí imobilizovaného mucorpepsinu byl použit modifikovaný LC-MS/MS postup z důvodu nedostupnosti autosampleru PAL System. V tomto uspořádání bylo vstřikování vzorků realizováno přímo přes autosampler integrovaný do systému kapalinové chromatografie. Injektováno bylo 5 μ L roztoku obsahujícího přibližně 12 pmol proteinu a jeho transport byl zajištěn pomocí izokratické pumpy obsahující 0,2% kyselinu mravenčí při průtoku 50 μ L/min. Stejně jako v předchozích experimentech vzorek nejprve procházel průtokovým reaktorem s imobilizovanou proteázou, kde docházelo k online štěpení. Vytvořené peptidy byly zachyceny na C18 zachytávací koloně (20 mm × 2,1 mm), zatímco nezachycené složky byly odváděny do odpadu. Po pětiminutové fázi zachycování byl aktivován přepínací ventil, kterým byl zaveden gradient mobilní fáze umožňující eluci peptidů na analytickou C18 kolonu a chromatografickou separaci navázaných peptidů pro následnou MS analýzu, která probíhala stejně jako v kapitole 7.12.

Kromě nedostupnosti autosampleru PAL Systemu byl dalším důvodem tohoto uspořádání požadavek na štěpení při kontrolované teplotě. Kolona s imobilizovanou proteázou byla udržována buď při laboratorní teplotě, nebo při 40 °C s cílem zvýšit enzymatickou aktivitu.

Ačkoliv by bylo možné místo autosampleru PAL použít manuální injektování, z důvodu lepší kompatibility s nastavením zvýšené teploty kolony byl použit LC autosampler.

7.12. Štěpení protilátky Trastuzumab v průtokovém reaktoru s imobilizovaným mucorpepsinem a její analýza pomocí LC-MS/MS

V poslední sérii experimentů byl stejný LC-MS/MS systém jako v kapitole 7.13. použit pro štěpení a analýzu monoklonální protilátky Trastuzumab. Jediným rozdílem bylo, že na základě předchozích zkušeností neprobíhalo štěpení při 40 °C. Zbytek metodického postupu se shodoval s kapitolou 7.13.

7.13. Zpracování LC-MS/MS dat

Surová data z LC-MS/MS analýz byla nejprve zpracována v softwaru DataAnalysis (Bruker Daltonics), kde byly extrahovány seznamy píků a exportovány ve formátu Mascot Generic Format (*.mgf) pomocí metody Shotgun PASEF. Výsledné *.mgf soubory byly následně podrobeny databázovému vyhledávání pomocí nástroje Mascot (Matrix Science), který byl spuštěn prostřednictvím programu ProteinScape. Pro vyhodnocení výsledků byly použity dvě odlišné konfigurace Mascot vyhledávání v závislosti na typu analyzovaného vzorku.

Pro směs modelových proteinů (MYG, PYGM a bCA) byla použita vlastní FASTA databáze. Enzymatická specificita nebyla definována a byl povolen maximálně jeden vynechaný štěpný bod. Tolerance pro přesnost hmotnosti peptidu byla ± 10 ppm a fragmentační tolerance MS/MS byla nastavena na $\pm 0,05$ Da. Jako variabilní modifikace byla zohledněna N-terminální acetylace. Při zpracování byly brány v úvahu peptidové náboje 1+, 2+ a 3+. Minimální délka peptidu byla nastavena na 4 aminokyseliny.

Pro vzorky ze štěpení Trastuzumabu byla rovněž použita vlastní FASTA databáze. Bylo zvoleno nespecifické enzymatické štěpení s maximálně jedním vynechaným štěpným bodem. Tolerance hmotnosti peptidu byla nastavena na ± 15 ppm a fragmentační tolerance na $\pm 0,1$ Da a nebyly vybrány žádné posttranslační modifikace. Zohledňovány byly peptidové náboje 1+, 2+ a 3+ a minimální délka peptidu byla nastavena na 3 aminokyseliny.

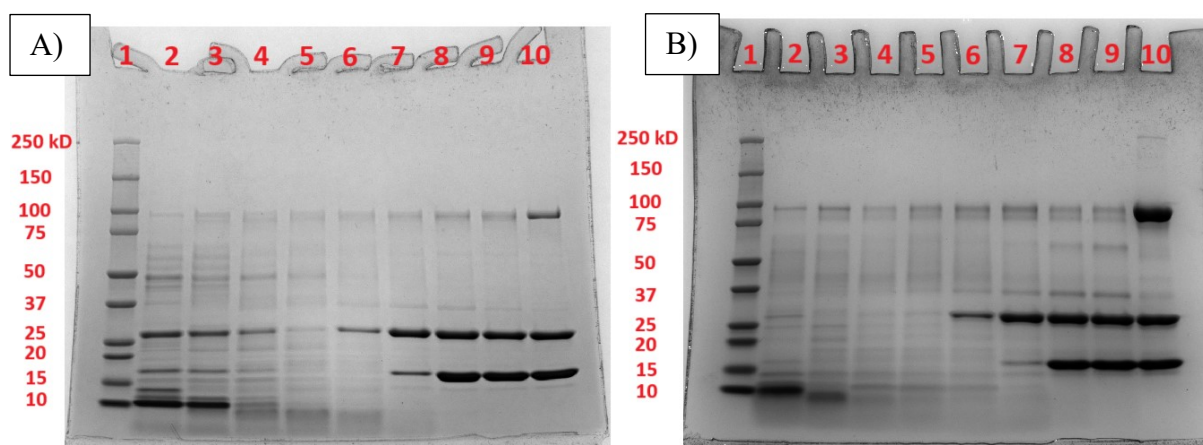
Po identifikaci byly výsledky z Mascot vyhledávání exportovány ve formátu *.csv a dále zpracovány pomocí softwaru Digdig, vyvinutého v rámci laboratoře. Tento nástroj umožnil

podrobnou analýzu štěpných preferencí, vizualizaci pokrytí sekvence a porovnání účinnosti štěpení mezi různými podmínkami.

8. Výsledky a diskuse

8.1. Analýza optimálního pH proteáz pomocí SDS-PAGE

Schopnost proteáz mucorpepsinu (obrázek 4 A)) a rhizopuspepsinu (obrázek 4 B)) štěpit při pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 byla analyzována pomocí SDS-PAGE. Jako substrát byly použity tři modelové proteiny: bCA2 ($M_r = 29,3$ kDa), MYG ($M_r = 17,1$ kDa) a PYGM ($M_r = 97,2$ kDa). Postup přípravy reakční směsi byl popsán v kapitole 7.2. Na gelu bylo zřejmé, že obě proteázy, mucorpepsin i rhizopuspepsin, účinně štěpily proteiny při nízkém pH. Nejvhodnější rozmezí pH se ukázalo být mezi 2,5 a 4,0. Při pH 4,5 a vyšším byla pozorována snížená aktivita štěpení, zejména u bCA2 a MYG. Naopak PYGM byla zdánlivě dobře štěpena i při vyšším pH, což naznačuje, že enzymy byly stále aktivní a změna pH pravděpodobně vedla k výrazné změně konformace bCA2 a MYG. Snížená účinnost štěpení tak mohla být důsledkem nejen nižší aktivity enzymů, ale i změněné dostupnosti štěpných míst v důsledku pH-indukované konformační změny substrátu.

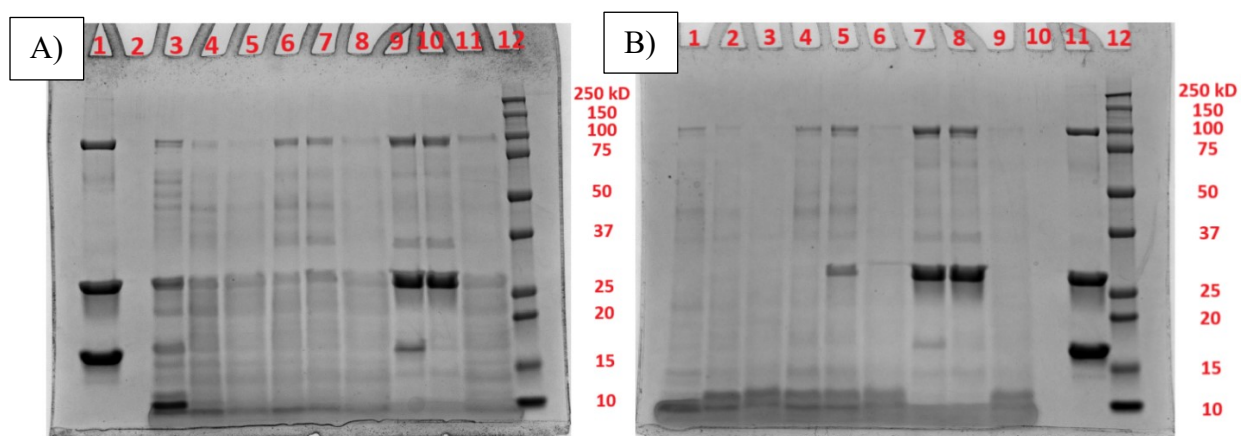


Obrázek 4: Na **obrázku A)** je zobrazen výsledek štěpení mucorpepsinem. Na **obrázku B)** je zobrazen výsledek štěpení rhizopuspepsinem. V obou gelech byl do prvního sloupce nanesen marker Precision Plus Protein™ Standards. Sloupce označené čísly 2–9 představují štěpné reakce za přítomnosti proteázy a směsi tří proteinů (MYG, bCA a PYGM) při pH postupně 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 a 5,5. Sloupec označený číslem 10 obsahuje směs tří proteinů bez přítomnosti proteáz.

8.2. Analýza vlivu redukčního činidla TCEP na štěpení proteinů proteázami pomocí SDS-PAGE

Vliv přítomnosti redukčního činidla TCEP na mucorpepsin (obrázek 5 A)), rhizopuspepsin (obrázek 5 B)) a také na samotné proteiny byl, stejně jako v předchozí kapitole, analyzován pomocí SDS-PAGE. Štěpení jednotlivých vzorků probíhalo při třech různých pH: 2,5; 3,5 a 4,5. Pro každé pH byly testovány tři podmínky: bez přídavku TCEP, s 10 mM TCEP nebo se 100

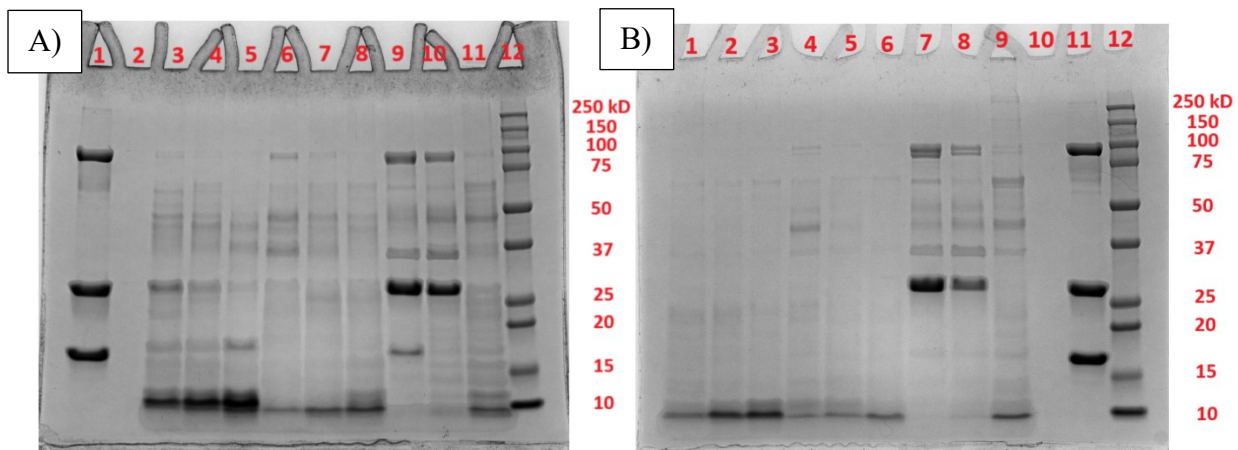
mM TCEP. Substrátem byla stejná směs proteinů jako v kapitole 8.1. Příprava reakční směsi byla popsána v kapitole 7.4. Z výsledků SDS-PAGE se na první pohled zdálo, že přidání 100 mM TCEP napomohlo štěpení proteinů, což bylo nejzřetelněji pozorováno při pH 4,5 (sloupec 11 na obrázku A) a sloupec 9 na obrázku B)). TCEP je však primárně určen k redukcí disulfidových můstků, a protože tyto tři modelové proteiny takové vazby neobsahují, uvedený výsledek nebyl zcela správný. Nejpravděpodobnějším důvodem bylo, že TCEP nebyl upraven na každé z testovaných pH, ale byl odebírán z jednoho zásobního roztoku, jehož pH bylo orientačně určeno pH papírkem na přibližně 3,0. To mohlo ovlivnit pH ve finální reakční směsi — při pH 2,5 došlo k mírnému zvýšení, při pH 3,5 k mírnému snížení a při pH 4,5 k výraznému poklesu, což podpořilo proteolytickou aktivitu. Pro účely této diplomové práce to však nebylo zásadní, protože cílem experimentu bylo prozkoumat vliv TCEPu na stabilitu a funkci použitých proteáz.



Obrázek 5: **Obrázek A)** – výsledek štěpení proteinů mucorpepsinem po přidání TCEPu. 1 – směs tří proteinů bez přítomnosti proteázy; 2 – prázdný sloupec; od 3 do 11 směs tří proteinů s mucorpepsinem buď bez nebo s přidáním TCEPem při různém pH; 3 – bez přidání TCEPu při pH 2,5; 4 – s přidáním 10 mM TCEPem při pH 2,5; 5 – s přidáním 100 mM TCEPem při pH 2,5; 6 – bez přidání TCEPu při pH 3,5; 7 – s přidáním 10 mM TCEPem při pH 3,5; 8 – s přidáním 100 mM TCEPem při pH 3,5; 9 – bez přidání TCEPu při pH 4,5; 10 – s přidáním 10 mM TCEPem při pH 4,5; 11 – s přidáním 100 mM TCEPem při pH 4,5; 12 – Precision Plus Protein™ Standards. **Obrázek B)** – výsledek štěpení proteinů rhizopuspepsinem po přidání TCEPu; od 1 do 9 směs tří proteinů s rhizopuspepsinem buď bez nebo s přidáním TCEPem při různém pH; 1 – bez přidání TCEPu při pH 2,5; 2 – s přidáním 10 mM TCEPem při pH 2,5; 3 – s přidáním 100 mM TCEPem při pH 2,5; 4 – bez přidání TCEPu při pH 3,5; 5 – s přidáním 10 mM TCEPem při pH 3,5; 6 – s přidáním 100 mM TCEPem při pH 3,5; 7 – bez přidání TCEPu při pH 4,5; 8 – s přidáním 10 mM TCEPem při pH 4,5; 9 – s přidáním 100 mM TCEPem při pH 4,5; 10 – prázdný sloupec; 11 – směs tří proteinů bez přítomnosti proteázy; 12 – Precision Plus Protein™ Standards.

8.3. Analýza vlivu denaturačního činidla na štěpení proteinů proteázami pomocí SDS-PAGE

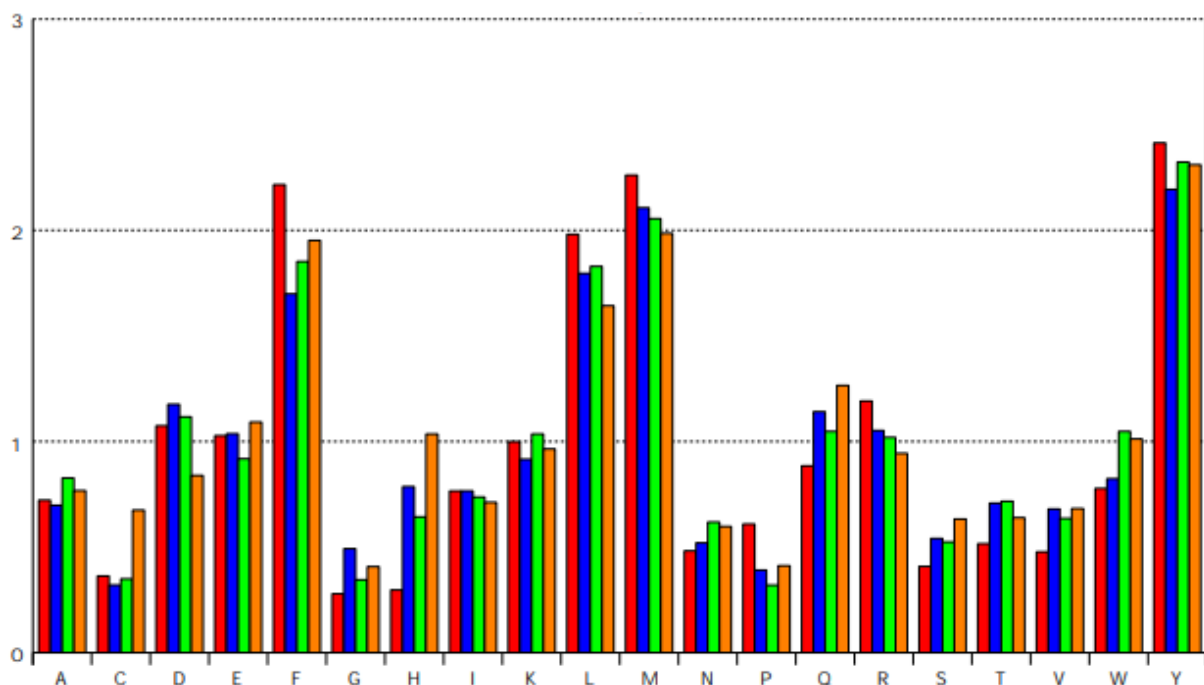
Dalším krokem bylo sledování vlivu močoviny na štěpení proteinů mucorpepsinem (obrázek 6 A)) a rhizopuspepsinem (obrázek 6 B)). Příprava reakční směsi byla popsána v kapitole 7.5 a výsledky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Z výsledků je patrné, že při reakcích při pH 2,5 a 3,5 (sloupce 4, 5, 7, 8 obrázek 6 A) a sloupce 2, 3, 5, 6 obrázek 6 B)) přidavek močoviny výrazně neovlivnil štěpení proteinů oběma proteázami. Při pH 4,5 již byl pozorován účinek přidané 1M močoviny na štěpení proteinů rhizopuspepsinem. Po přidání 3M močoviny při pH 4,5 (sloupec 11 obrázek 6 A) a sloupec 9 obrázek 6 B)) byl pozorován výrazný vliv na štěpení proteinů oběma proteázami. To potvrzovalo předchozí úvahu, že proteázy jsou aktivní i při vyšším pH, ale nedošlo ke změně konformace proteinů, které se tak nedostaly do aktivního místa proteáz. Vlivem močoviny došlo k denuraci těchto proteinů, což umožnilo jejich štěpení.



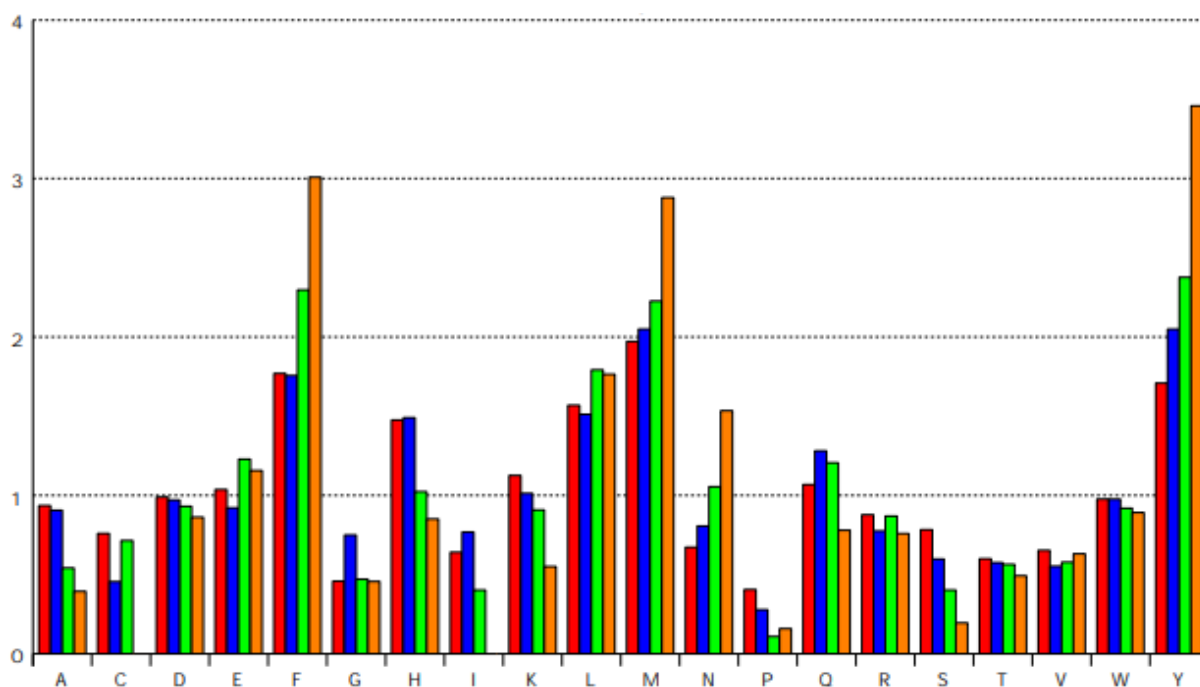
Obrázek 6: **Obrázek A)** – výsledek štěpení proteinů mucorpepsinem. 1 – směs tří proteinů bez přítomnosti proteázy; 2 – prázdný sloupec; od 3 do 11 směs tří proteinů s mucorpepsinem buď bez nebo s přidanou močovinou při různém pH; 3 – bez přidané močoviny při pH 2,5; 4 – s přidanou 1M močovinou při pH 2,5; 5 – s přidanou 3M močovinou při pH 2,5; 6 – bez přidané močoviny při pH 3,5; 7 – s přidanou 1M močovinou při pH 3,5; 8 – s přidanou 3M močovinou při pH 3,5; 9 – bez přidané močoviny při pH 4,5; 10 – s přidanou 1M močovinou při pH 4,5; 11 – s přidanou 3M močovinou při pH 4,5; 12 – Precision Plus Protein™ Standards. **Obrázek B)** – výsledek štěpení proteinů rhizopuspepsinem po přidání močoviny. Od 1 do 9 směs tří proteinů s rhizopuspepsinem buď bez nebo s přidanou močovinou při různém pH; 1 – bez přidané močoviny při pH 2,5; 2 – s přidanou 1M močovinou při pH 2,5; 3 – s přidanou 3M močovinou při pH 2,5; 4 – bez přidané močoviny při pH 3,5; 5 – s přidanou 1M močovinou při pH 3,5; 6 – s přidanou 3M močovinou při pH 3,5; 7 – bez přidané močoviny při pH 4,5; 8 – s přidanou 1M močovinou při pH 4,5; 9 – s přidanou 3M močovinou při pH 4,5; 10 – prázdný sloupec; 11 – směs tří proteinů bez přítomnosti proteázy; 12 – Precision Plus Protein™ Standards.

8.4. Optimalizace pH a určení preferencí štěpení proteáz pomocí LC-MS/MS

Po optimalizaci různých podmínek štěpení pomocí SDS-PAGE následovala analýza vzorků s osmi různými hodnotami pH pomocí metody LC-MS/MS, s cílem zjistit štěpné preference proteáz. Příprava vzorků a zpracování výsledků byly popsány v kapitolách 7.7 a 7.15. Po vložení zpracovaných dat do softwaru Digdig byly vytvořeny grafy preferencí štěpení mucorpepsinem (obrázek 7 a 8) a rhizopuspepsinem (obrázek 9 a 10). Na obrázku 7 znázorňujícím štěpení modelových proteinů mucorpepsinem bylo možné pozorovat zvýšené preference štěpení za čtyřmi aminokyselinami: F – fenylalanin, L – leucin, M – methionin a Y – tyrosin.



Obrázek 7: Preference štěpení mucorpepsinem. Červeně je označeno štěpení při pH 2,0; modře při pH 2,5; zeleně při pH 3,0 a oranžově při pH 3,5. Na ose x jsou uvedeny jednotlivé aminokyseliny a osa y znázorňuje normalizované obohacení každé aminokyseliny, což znamená, jak často se daná aminokyselina vyskytuje v místě štěpení proteázou ve srovnání s jejím obecným výskytem v proteinových sekvencích.



Obrázek 8: Preference štěpení mucorpepsinem. Červeně je označeno štěpení při pH 4,0; modře při pH 4,5; zeleně při pH 5,0 a oranžově při pH 5,5. Na ose x jsou uvedeny jednotlivé aminokyseliny a osa y znázorňuje normalizované obohacení každé aminokyseliny, což znamená, jak často se daná aminokyselina vyskytuje v místě štěpení proteázou ve srovnání s jejím obecným výskytem v proteinových sekvencích.

Na základě dalších dat z programu Digdig byla stanovena účinnost štěpení jednotlivých proteinů. PYGM (tabulka 3) byl nejlépe štěpen mucorpepsinem při pH v rozmezí 2,0 až 3,5. Při vyšších hodnotách pH již docházelo k výraznému poklesu jak pokrytí sekvence, tak počtu unikátních peptidů. bCA (tabulka 4) byla dobře štěpena při pH od 2,5 do 4,0. Přestože počet identifikovaných peptidů nad pH 4,0 výrazně klesl, pokrytí sekvence zůstalo téměř nezměněno, což nekorespondovalo s očekáváním vyplývajícím z předchozích výsledků SDS-PAGE gelů. MYG (tabulka 5) byl optimálně štěpen v rozmezí pH 2,5 až 4,5. Od pH 5,0 došlo ke zdatelnému poklesu počtu unikátních peptidů, avšak pokrytí sekvence zůstalo téměř beze změny. Tyto výsledky potvrzují předchozí zjištění, že optimální pH pro mucorpepsin se pohybuje v rozmezí 2,5 až 4,0.

PYGM	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,0	198	73,75	18,08
pH 2,5	216	82,07	17,78
pH 3,0	172	72,68	17,13
pH 3,5	158	67,58	16,32
pH 4,0	102	49,29	14,36
pH 4,5	74	26,96	13,22
pH 5,0	65	23,75	12,83
pH 5,5	60	27,43	13,17

Tabulka 3: Pokrytí sekvence PYGM, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

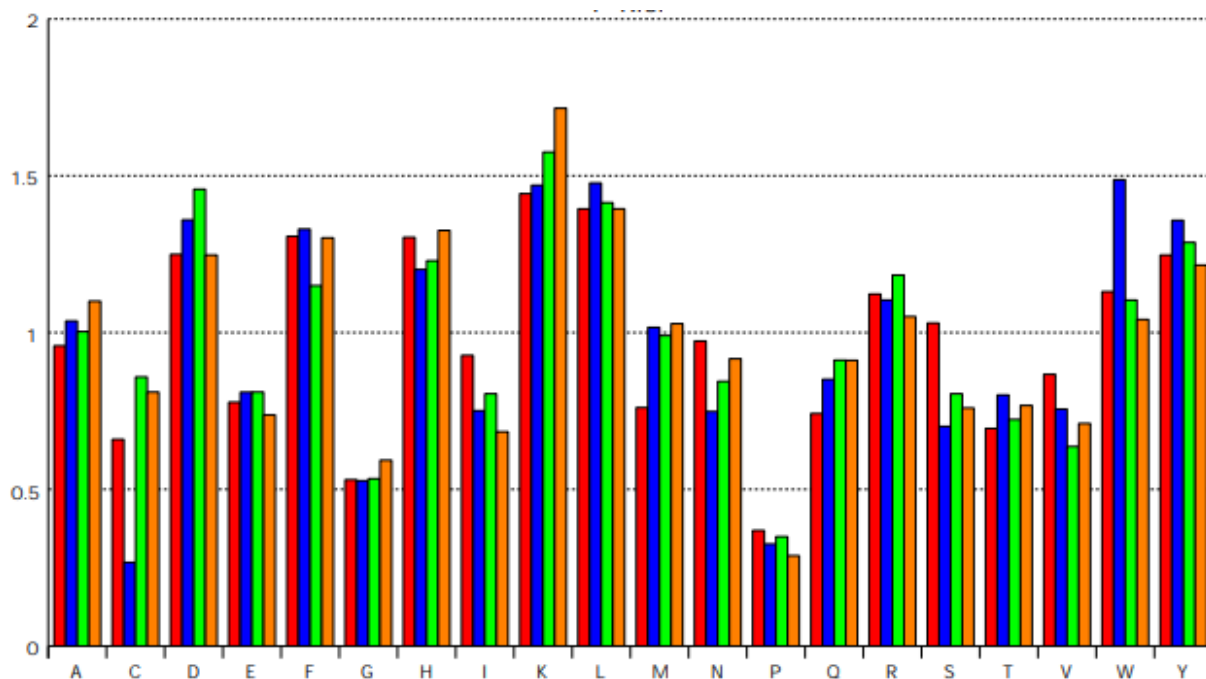
bCA	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,0	113	100	20,69
pH 2,5	140	100	20,2
pH 3,0	148	84,94	19,57
pH 3,5	192	84,17	20,17
pH 4,0	198	84,94	18,93
pH 4,5	79	81,85	18,24
pH 5,0	39	80,31	17,72
pH 5,5	20	74,9	17,3

Tabulka 4: Pokrytí sekvence bCA, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

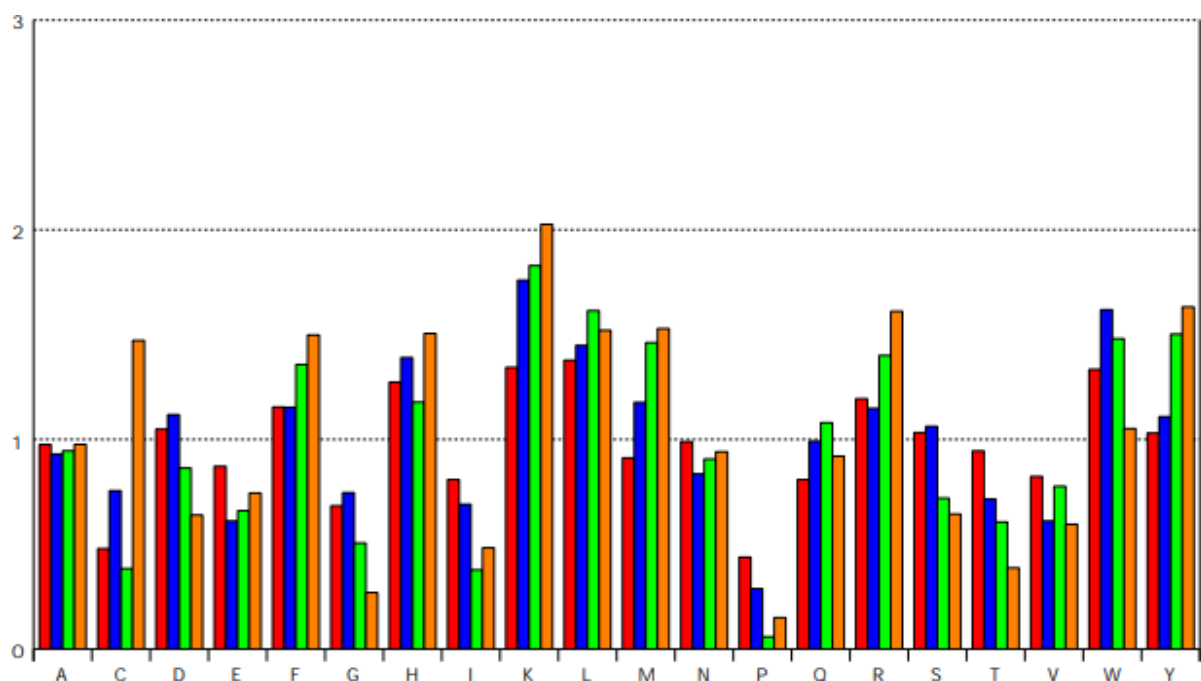
MYG	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,0	83	100	23,39
pH 2,5	105	100	20,8
pH 3,0	138	100	20,01
pH 3,5	144	100	18,92
pH 4,0	155	100	18,25
pH 4,5	147	100	16,95
pH 5,0	58	100	17,88
pH 5,5	30	90,2	17,67

Tabulka 5: Pokrytí sekvence MYG, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Při rhizopuspepsinu nebyly pozorovány žádné preference štěpení, jak je patrné na obrázcích 9 a 10. Normalizované hodnoty obohacení pro většinu aminokyselin zůstaly blízko hodnoty 1,0, což naznačuje, že frekvence jednotlivých aminokyselin v místech štěpení zhruba odpovídá jejich přirozenému výskytu v proteinových sekvencích. Mírné zvýšení bylo pozorováno pouze u aminokyselin K – lysin a L – leucin, avšak ani jedna z těchto hodnot nebyla statisticky či funkčně významná. Tyto výsledky naznačují, že rhizopuspepsin vykazuje širokou substrátovou toleranci a funguje jako nespecifická aspartátová proteáza, na rozdíl od mucorpepsinu, který prokazoval výrazné preference štěpení v místech hydrofobních zbytků.



Obrázek 9: Preference štěpení rhizopuspepsinem. Červeně je označeno štěpení při pH 2,0; modře při pH 2,5; zeleně při pH 3,0 a oranžově při pH 3,5. Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé aminokyseliny a osa y znázorňuje normalizované obohacení každé aminokyseliny, což vyjadřuje, jak často se daná aminokyselina vyskytuje v místě štěpení proteázou ve srovnání s jejím obecným výskytem v proteinových sekvencích.



Obrázek 10: Preference štěpení rhizopuspepsinem. Červeně je označeno štěpení při pH 4,0; modře při pH 4,5; zeleně při pH 5,0 a oranžově při pH 5,5. Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé aminokyseliny a osa y znázorňuje normalizované obohacení každé aminokyseliny, což vyjadřuje, jak často se daná aminokyselina vyskytuje v místě štěpení proteázou ve srovnání s jejím obecným výskytem v proteinových sekvencích.

Z dalších dat bylo určováno pokrytí jednotlivých proteinových sekvencí, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka. PYGM (tabulka 6) byla nejúčinněji štěpena v rozmezí pH 2,0 až 3,5, což se projevilo vysokým pokrytím sekvence a velkým počtem unikátních peptidů. Při vyšších hodnotách pH (4,0–5,5) enzymatická aktivita klesala, protože vznikalo menší množství peptidů a pokrytí sekvence bylo nižší. bCA (tabulka 7) byla efektivně štěpena v rozsahu pH od 2,0 do 4,0, přičemž nejvíce unikátních peptidů vzniklo při pH 4,0. Se zvyšujícím se pH aktivita klesala, což se nejvíce projevilo na počtu unikátních peptidů. Při štěpení MYG (tabulka 8) bylo nejvyšší pokrytí sekvence a počet unikátních peptidů dosaženo při pH 2,5–4,5. Efektivita štěpení MYG při vyšším pH opět klesala, což se odrazilo na nižším počtu unikátních peptidů.

PYGM	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,0	415	85,99	14,41
pH 2,5	416	86,1	12,77
pH 3,0	335	87,89	12,14
pH 3,5	341	87,17	11,91
pH 4,0	239	71,85	12,03
pH 4,5	176	61,52	12,02
pH 5,0	269	78,03	10,87
pH 5,5	270	67,1	11,2

Tabulka 6: Pokrytí sekvence PYGM, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

bCA	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,0	221	100	18,16
pH 2,5	294	100	17,51
pH 3,0	266	100	16,22
pH 3,5	315	100	15,61
pH 4,0	373	99,23	16,66
pH 4,5	232	98,84	14,88
pH 5,0	136	98,84	13,36
pH 5,5	67	94,59	14,43

Tabulka 7: Pokrytí sekvence bCA, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

MYG	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,0	112	100	17,9
pH 2,5	145	98,69	17,62
pH 3,0	137	100	16,18
pH 3,5	140	100	14,83
pH 4,0	133	100	13,32
pH 4,5	164	100	12,46
pH 5,0	87	98,04	12,31
pH 5,5	37	92,16	12,49

Tabulka 8: Pokrytí sekvence MYG, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

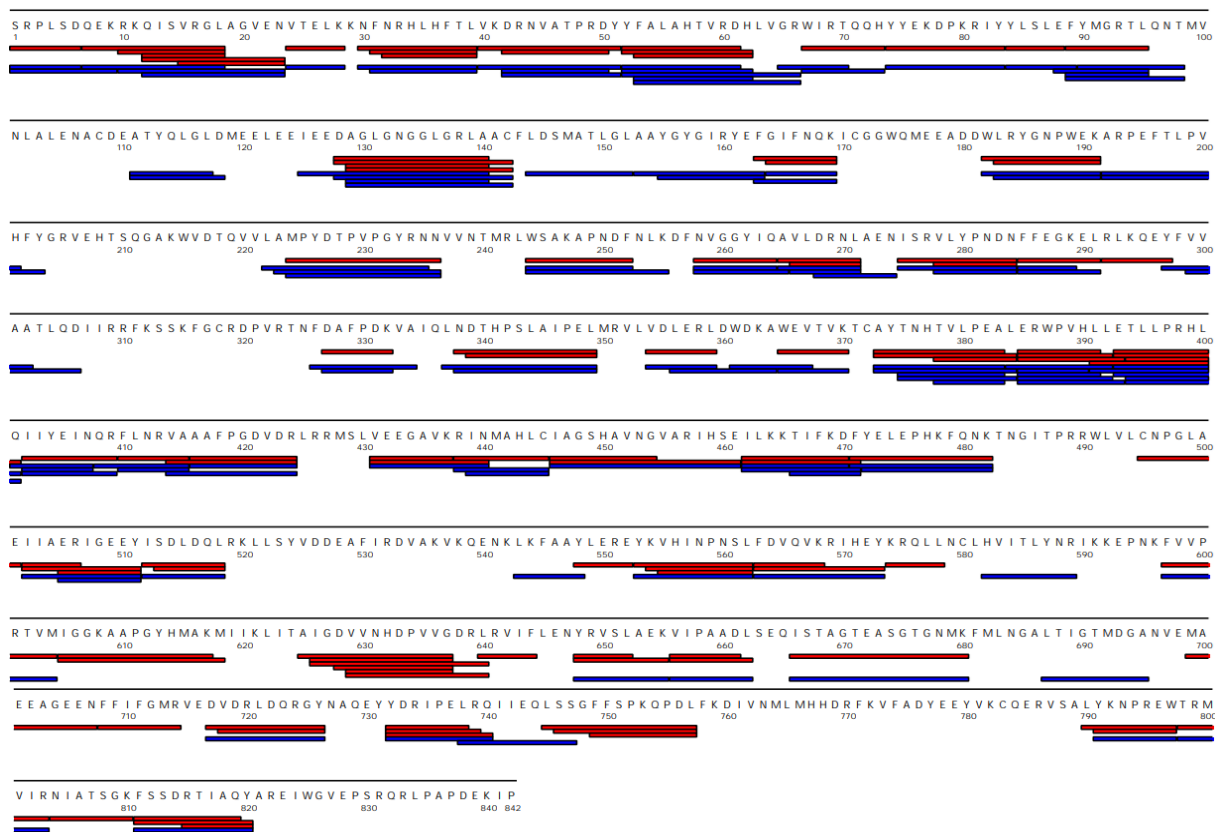
8.5. Analýza štěpení modelových proteinů v průtokovém reaktoru pomocí LC-MS/MS

Pro vyhodnocení účinnosti imobilizovaného rhizopuspepsinu v kontinuálním průtokovém reaktoru byla směs tří proteinů (PYGM, bCA, MYG) štěpena při 4 °C. Celkem bylo testováno 14 podmínek zahrnujících různé koncentrace guanidinhydrochloridu, močoviny a TCEPu – buď samostatně, nebo v kombinaci. Identifikace peptidů byla provedena pomocí LC-MS/MS.

Nejvyšší účinnost štěpení PYGM rhizopuspepsinem byla dosažena po přidání 1 M močoviny (obrázek 11), což vedlo k identifikaci nejvyššího počtu unikátních peptidů (112) a 63,3% pokrytí sekvence. Štěpení za nativních podmínek rovněž probíhalo dobře, s 108 peptidy a 61,88% pokrytím (tabulka 9). Přidání 100 mM TCEPu mírně zlepšilo výkonnost oproti 10 mM. Vysoké koncentrace denaturantů (3 M močovina nebo guanidin) a jejich kombinace s vysokým množstvím TCEPu vedly k horšímu štěpení, pravděpodobně kvůli inhibici enzymu nebo agregaci PYGM v průtokovém systému. Nejnižší pokrytí sekvence (15,8 %) a nejnižší počet peptidů (17) bylo pozorováno při použití 200 mM TCEPu s 3 M guanidinhydrochloridem. Na obrázku 17 je graficky znázorněné pokrytí sekvence PYGM při dvou podmínkách.

PYGM	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	108	61,88	8,93
1 M guanidinhydrochlorid	101	63,3	8,81
3 M guanidinhydrochlorid	67	47,03	9,24
1 M močovina	112	63,3	9,15
3 M močovina	83	49,17	8,9
10 mM TCEP	88	56,41	8,8
100 mM TCEP	88	60,57	9
200 mM TCEP	68	48,34	8,69
10 mM TCEP, 1 M guanidinhydrochlorid	73	51,54	8,64
100 mM TCEP, 1 M guanidinhydrochlorid	76	53,92	8,74
200 mM TCEP, 1 M guanidinhydrochlorid	47	35,15	8,04
10 mM TCEP, 3 M guanidinhydrochlorid	38	33,25	8,58
100 mM TCEP, 3 M guanidinhydrochlorid	43	36,94	8,4
200 mM TCEP, 3 M guanidinhydrochlorid	17	15,8	9,06

Tabulka 9: Pokrytí sekvence PYGM, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

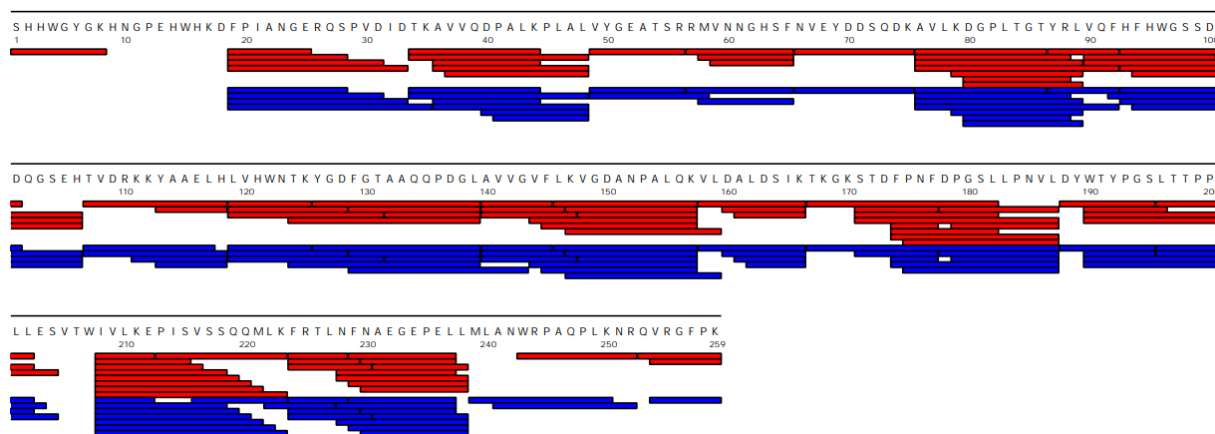


Obrázek 11: Pokrytí sekvence PYGM po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označené štěpení bez přítomnosti dalších látek. Modrou je označené štěpení za přítomnosti 1 M močoviny.

Nejlepší podmínky štěpení bCA byly pozorovány při 10 mM TCEPu (obrázek 12), který vedl k 93,44% pokrytí sekvence a 86 unikátním peptidům (tabulka 10). Nejvyšší počet peptidů (87) byl zaznamenán po přidání 1 M močoviny. Silná denaturace (3 M močovina nebo guanidin) zhoršila výsledky a všechny kombinace guanidinu s TCEPem vedly k nižšímu pokrytí sekvence ve srovnání s nativními podmínkami. Nejhorší výsledek byl zaznamenán při použití 200 mM TCEPu s 3 M guanidinem, kdy pokrytí kleslo na 55,6 % a bylo identifikováno pouze 18 unikátních peptidů.

bCA	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	67	91,89	9,81
1 M guanidinhydrochlorid	66	89,19	10,32
3 M guanidinhydrochlorid	42	74,9	11,62
1 M močovina	87	91,51	10,43
3 M močovina	59	80,69	10,46
10 mM TCEP	86	93,44	10,34
100 mM TCEP	79	91,89	10,25
200 mM TCEP	50	77,22	10,42
10 mM TCEP, 1 M guanidinhydrochlorid	48	78,38	10,6
100 mM TCEP, 1 M guanidinhydrochlorid	54	85,33	10,54
200 mM TCEP, 1 M guanidinhydrochlorid	35	71,43	10,2
10 mM TCEP, 3 M guanidinhydrochlorid	30	63,71	11
100 mM TCEP, 3 M guanidinhydrochlorid	35	72,2	11,94
200 mM TCEP, 3 M guanidinhydrochlorid	18	55,6	11,83

Tabulka 10: Pokrytí sekvence bCA, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

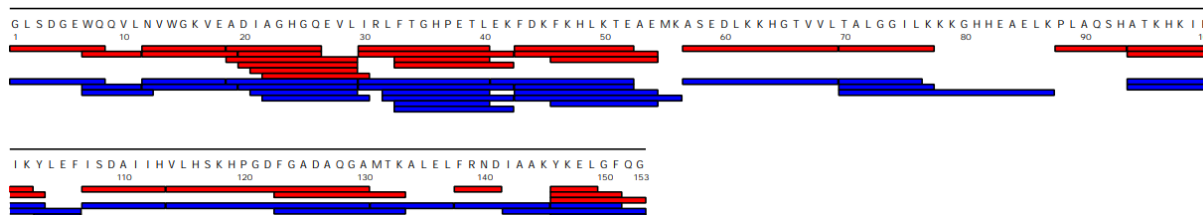


Obrázek 12: Pokrytí sekvence PYGM po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označené štěpení za přítomnosti 10 mM TCEP. Modrou je označené štěpení za přítomnosti 1 M močoviny.

MYG dosáhl nejlepšího pokrytí sekvence (96,08 %) (obrázek 13) a nejvyššího počtu unikátních peptidů (35) po použití 1 M močoviny (tabulka 11). Dobré výsledky poskytly i nativní podmínky, 10 mM TCEP a 1 M guanidinhydrochlorid. Silnější denaturační podmínky, zejména ty kombinující TCEP s guanidinem, vedly k výrazně snížené účinnosti štěpení. Nejnižší pokrytí sekvence (51,63 %) bylo zaznamenáno při 200 mM TCEPu s 3 M guanidinem.

MYG	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	29	84,97	8,9
1 M guanidínhydrochlorid	27	84,31	9,63
3 M guanidínhydrochlorid	23	65,36	9,61
1 M močovina	35	96,08	9,74
3 M močovina	30	78,43	9,93
10 mM TCEP	27	90,85	9,81
100 mM TCEP	28	78,34	9,36
200 mM TCEP	17	51,63	9,06
10 mM TCEP, 1 M guanidínhydrochlorid	23	69,93	9,35
100 mM TCEP, 1 M guanidínhydrochlorid	24	70,59	9,33
200 mM TCEP, 1 M guanidínhydrochlorid	23	71,9	9,65
10 mM TCEP, 3 M guanidínhydrochlorid	18	56,21	9,39
100 mM TCEP, 3 M guanidínhydrochlorid	23	62,75	9,57
200 mM TCEP, 3 M guanidínhydrochlorid	16	51,63	9,69

Tabulka 11: Pokrytí sekvence MYG, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.



Obrázek 13: Pokrytí sekvence PYGM po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označené štěpení bez přítomnosti dalších látek. Modrou je označené štěpení za přítomnosti 1 M močoviny.

Pro určení efektivity štěpení imobilizovaného mucorpepsinu byl jako substrát použit mix tří proteinů za různých podmínek pH a teploty. Cílem bylo zhodnotit, zda zvýšení teploty z 25 °C na 40 °C a změna pH mohou zlepšit účinnost štěpení. Bylo testováno také štěpení při 4 °C, při kterém vznikalo pouze zanedbatelné množství peptidů. Měření probíhala ve čtyřnásobném opakování, přičemž pro zpracování dat byly použity tři nejlepší výsledky.

PYGM byl nejlépe štěpen při pH 3,0 a teplotě 25 °C (tabulka 12), čímž bylo dosaženo nejvyššího pokrytí sekvence 63,03 % a nejvyššího počtu unikátních peptidů (105). Zvýšení teploty při tomto pH štěpení nezlepšilo. Naopak, při pH 2,5 a 3,5 bylo štěpení mírně lepší. Při pH 4,0 efektivita štěpení prudce klesla bez ohledu na teplotu.

PYGM	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,5; 25 °C	78	53,09	9,64
pH 2,5; 40 °C	81	53,68	9,8
pH 3,0; 25 °C	105	63,03	9,45
pH 3,0; 40 °C	79	58,31	9,85
pH 3,5; 25 °C	77	52,97	9,36
pH 3,5; 40 °C	80	54,28	9,62
pH 4,0; 25 °C	24	22,8	10,17
pH 4,0; 40 °C	7	7,36	8,86

Tabulka 12: Pokrytí sekvence PYGM, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Nejlepší podmínkou pro štěpení bCA bylo pH 4,0 a teplota 40 °C (tabulka 13), kde pokrytí sekvence dosáhlo 66,02 % a počet unikátních peptidů 36. Tento výsledek je v kontrastu se štěpením PYGM, kde pH 4,0 vedlo k dramatickému poklesu proteolýzy. Při pH 3,5 a teplotě 40 °C bylo pokrytí sekvence bCA nejnižší (50,58 %). V tomto případě bylo štěpení účinnější při nižší teplotě (pokrytí 62,16 %). Při pH 3,0 byly výsledky mírně lepší při teplotě 25 °C a při pH 2,5 bylo štěpení efektivnější při 40 °C.

bCA	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,5; 25 °C	26	53,97	12,08
pH 2,5; 40 °C	31	64,48	11,06
pH 3,0; 25 °C	32	59,85	11
pH 3,0; 40 °C	24	54,83	11,5
pH 3,5; 25 °C	30	62,16	11,1
pH 3,5; 40 °C	23	50,58	9,87
pH 4,0; 25 °C	31	63,32	10,71
pH 4,0; 40 °C	36	66,02	9,53

Tabulka 13: Pokrytí sekvence bCA, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Nejlepší výsledek štěpení MYG byl pozorován při pH 3,5 a teplotě 25 °C (tabulka 14) se 76,47% pokrytím sekvence a 32 unikátními peptidy. Při pH 2,5 a 40 °C bylo dosaženo stejného pokrytí sekvence, avšak s nižším počtem unikátních peptidů (23). Při pH 3,0 bylo štěpení účinnější při teplotě 25 °C a při pH 4,0 bylo o něco lepší při teplotě 40 °C.

MYG	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,5; 25 °C	20	67,97	11,65
pH 2,5; 40 °C	23	76,47	10,17
pH 3,0; 25 °C	23	71,9	10,09
pH 3,0; 40 °C	18	68,63	10
pH 3,5; 25 °C	32	76,47	9,75
pH 3,5; 40 °C	19	71,24	10,47
pH 4,0; 25 °C	25	67,32	8,88
pH 4,0; 40 °C	29	73,2	9,34

Tabulka 14: Pokrytí sekvence MYG, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

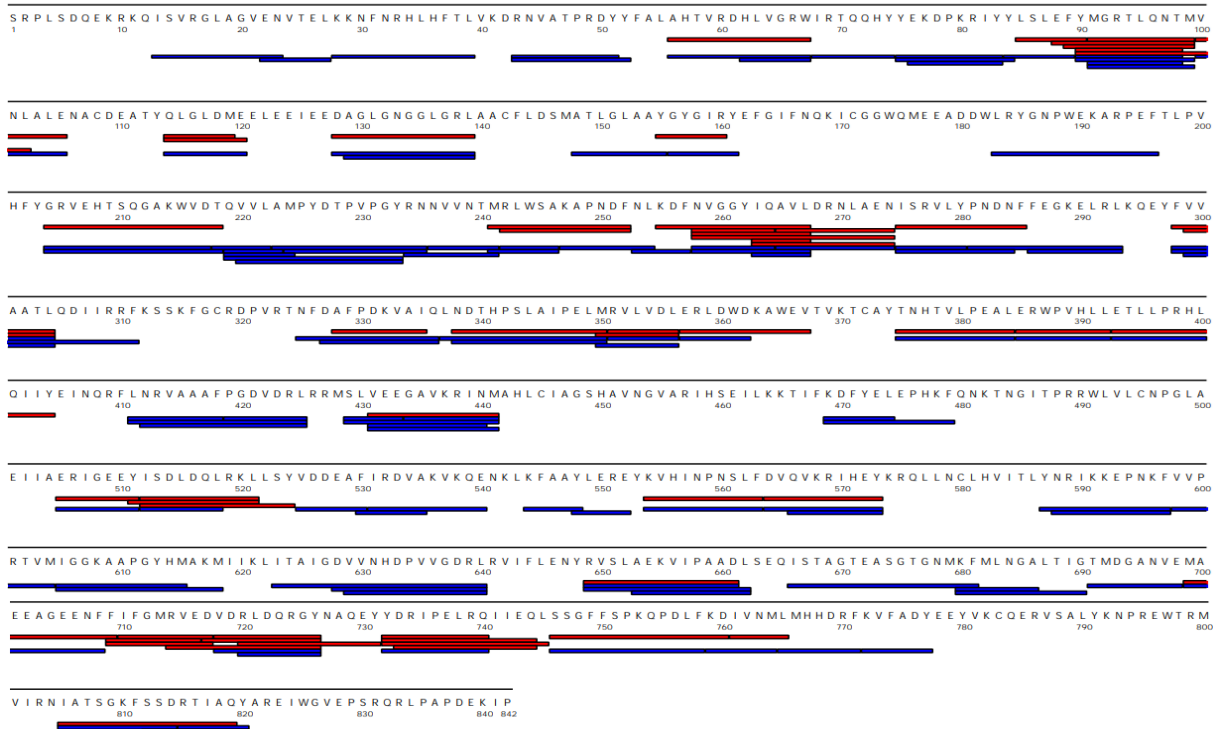
Ačkoli štěpení při 40 °C místy vedlo k mírně vyššímu pokrytí sekvencí ve srovnání s 25 °C, celkové zlepšení nebylo konzistentní napříč všemi proteiny a podmínkami. Dlouhodobý provoz při zvýšené teplotě navíc negativně ovlivňoval stabilitu a životnost kolony s imobilizovaným mucorpepsinem. Z tohoto důvodu se 25 °C ukázalo jako praktičtější a udržitelnější volba, která zajišťuje spolehlivou účinnost štěpení při zachování integrity kolony.

Za účelem zlepšení účinnosti imobilizovaného mucorpepsinu byla testována řada denaturačních podmínek s nebo bez TCEPu při pH 2,5 nebo 3,5 a teplotě 25 °C. U všech tří proteinů a téměř všech chemických podmínek bylo při pH 3,5 dosaženo vyššího pokrytí sekvence a počtu peptidů než při stejné úpravě při pH 2,5. PYGM dosáhl nejlepšího pokrytí sekvence (68,05 %) při 2 M močovíně a 1 M thiomočovíně při pH 3,5 (tabulka 15), zatímco při pH 2,5 za stejných podmínek pokrytí činilo pouze 40,02 % (obrázek 14). U bCA bylo pokrytí sekvence nejvyšší (71,04 %) po přidání 1 M močoviny a 0,5 M thiomočoviny (tabulka 16), přičemž při pH 2,5 bylo pokrytí jen 50,58 % (obrázek 15). MYG dosáhl nejlepšího pokrytí sekvence (98,04 %) při 1 M močovíně a 0,5 M thiomočovíně (tabulka 17), což bylo oproti podmínkám při pH 2,5 za stejných podmínek téměř dvojnásobné (obrázek 16).

Tyto výsledky tedy naznačují, že mucorpepsin štěpí účinněji při pH 3,5 než při pH 2,5, a to zejména v přítomnosti denaturačních činidel. Ačkoli je mucorpepsin stabilní i při pH 2,5, jeho kombinace s denaturačními látkami může snižovat jeho katalytickou účinnost.

PYGM	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
1 M močovina + 0,5 M thiomocovina pH 2,5	55	45,37	10,71
1 M močovina + 0,5 M thiomocovina pH 3,5	73	54,04	9,53
2 M močovina + 1 M thiomocovina pH 2,5	56	40,02	10,14
2 M močovina + 1 M thiomocovina pH 3,5	106	68,05	9,26
1 M močovina + 0,5 M thiomocovina + 100 mM TCEP pH 2,5	64	55,34	10,59
1 M močovina + 0,5 M thiomocovina + 100 mM TCEP pH 3,5	80	56,29	9,46
2 M močovina + 1 M thiomocovina + 100 mM TCEP pH 2,5	61	50,36	10,33
2 M močovina + 1 M thiomocovina + 100 mM TCEP pH 3,5	76	58,43	9,24
2 M guanidinhydrochlorid pH 2,5	35	37,05	10,43
2 M guanidinhydrochlorid pH 3,5	64	49,76	11,06
2 M guanidinhydrochlorid + 100 mM TCEP pH 2,5	56	50,59	10,21
2 M guanidinhydrochlorid + 100 mM TCEP pH 3,5	50	46,2	9,6

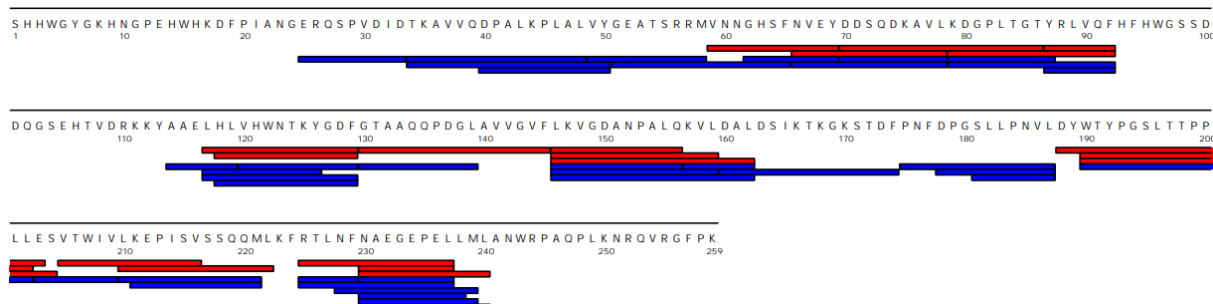
Tabulka 15: Pokrytí sekvence PYGM, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.



Obrázek 14: Pokrytí sekvence PYGM po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označené štěpení při pH 2,5 s 2 M močovinou a 1 M thiomocovinou. Modrou je označené štěpení při pH 3,5 s 2 M močovinou a 1 M thiomocovinou.

bCA	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
1 M močovina + 0,5 M thiomočovina pH 2,5	19	50,58	12,89
1 M močovina + 0,5 M thiomočovina pH 3,5	37	71,04	10,84
2 M močovina + 1 M thiomočovina pH 2,5	10	33,98	13,5
2 M močovina + 1 M thiomočovina pH 3,5	37	70,27	11,35
1 M močovina + 0,5 M thiomočovina + 100 mM TCEP pH 2,5	23	57,53	12,52
1 M močovina + 0,5 M thiomočovina + 100 mM TCEP pH 3,5	23	55,98	12,26
2 M močovina + 1 M thiomočovina + 100 mM TCEP pH 2,5	19	49,42	12,26
2 M močovina + 1 M thiomočovina + 100 mM TCEP pH 3,5	36	67,95	12,22
2 M guanidinhydrochlorid pH 2,5	15	50,97	13,33
2 M guanidinhydrochlorid pH 3,5	26	57,53	10,92
2 M guanidinhydrochlorid + 100 mM TCEP pH 2,5	23	62,55	13,09
2 M guanidinhydrochlorid + 100 mM TCEP pH 3,5	25	63,71	11,24

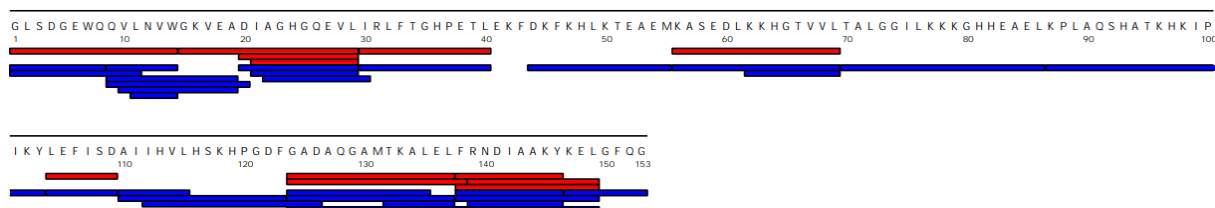
Tabulka 16: Pokrytí sekvence bCA, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.



Obrázek 15: Pokrytí sekvence bCA po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označené štěpení při pH 2,5 s 1 M močovinou a 0,5 M thiomočovinou. Modrou je označené štěpení při pH 3,5 s 1 M močovinou a 0,5 M thiomočovinou.

MYG	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
1 M močovina + 0,5 M thiomčovina pH 2,5	12	56,21	11,67
1 M močovina + 0,5 M thiomčovina pH 3,5	29	98,04	10,48
2 M močovina + 1 M thiomčovina pH 2,5	7	59,48	13,14
2 M močovina + 1 M thiomčovina pH 3,5	28	86,93	10,68
1 M močovina + 0,5 M thiomčovina + 100 mM TCEP pH 2,5	16	71,24	11,81
1 M močovina + 0,5 M thiomčovina + 100 mM TCEP pH 3,5	23	79,74	11,09
2 M močovina + 1 M thiomčovina + 100 mM TCEP pH 2,5	14	63,4	11,5
2 M močovina + 1 M thiomčovina + 100 mM TCEP pH 3,5	24	75,82	11,17
2 M guanidínhydrochlorid pH 2,5	15	68,63	11,47
2 M guanidínhydrochlorid pH 3,5	34	85,62	10,24
2 M guanidínhydrochlorid + 100 mM TCEP pH 2,5	15	73,2	11,73
2 M guanidínhydrochlorid + 100 mM TCEP pH 3,5	31	75,82	10,03

Tabulka 17: Pokrytí sekvence MYG, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.



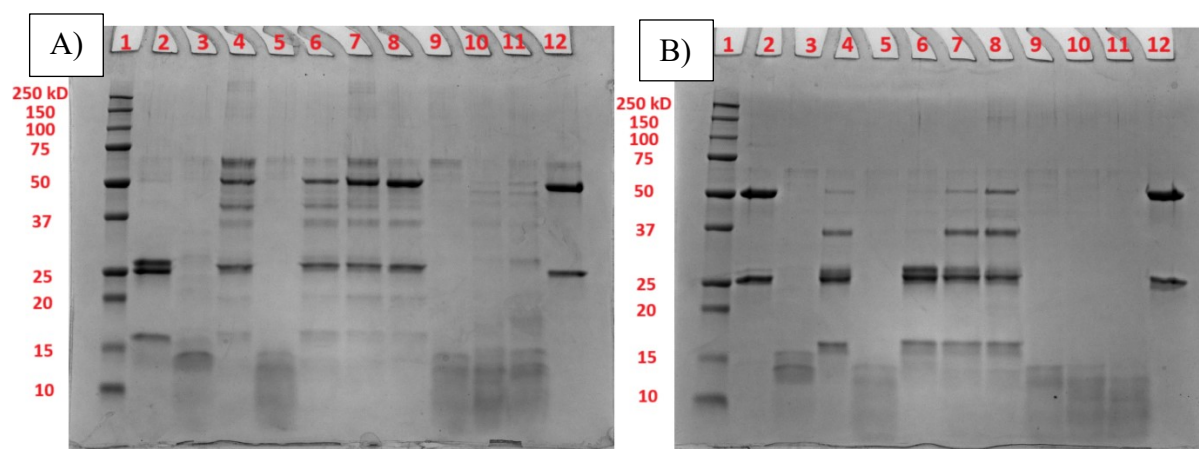
Obrázek 16: Pokrytí sekvence MYG po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označené štěpení při pH 2,5 s 1 M močovinou a 0,5 M thiomčovinou. Modrou je označené štěpení při pH 3,5 s 1 M močovinou a 0,5 M thiomčovinou.

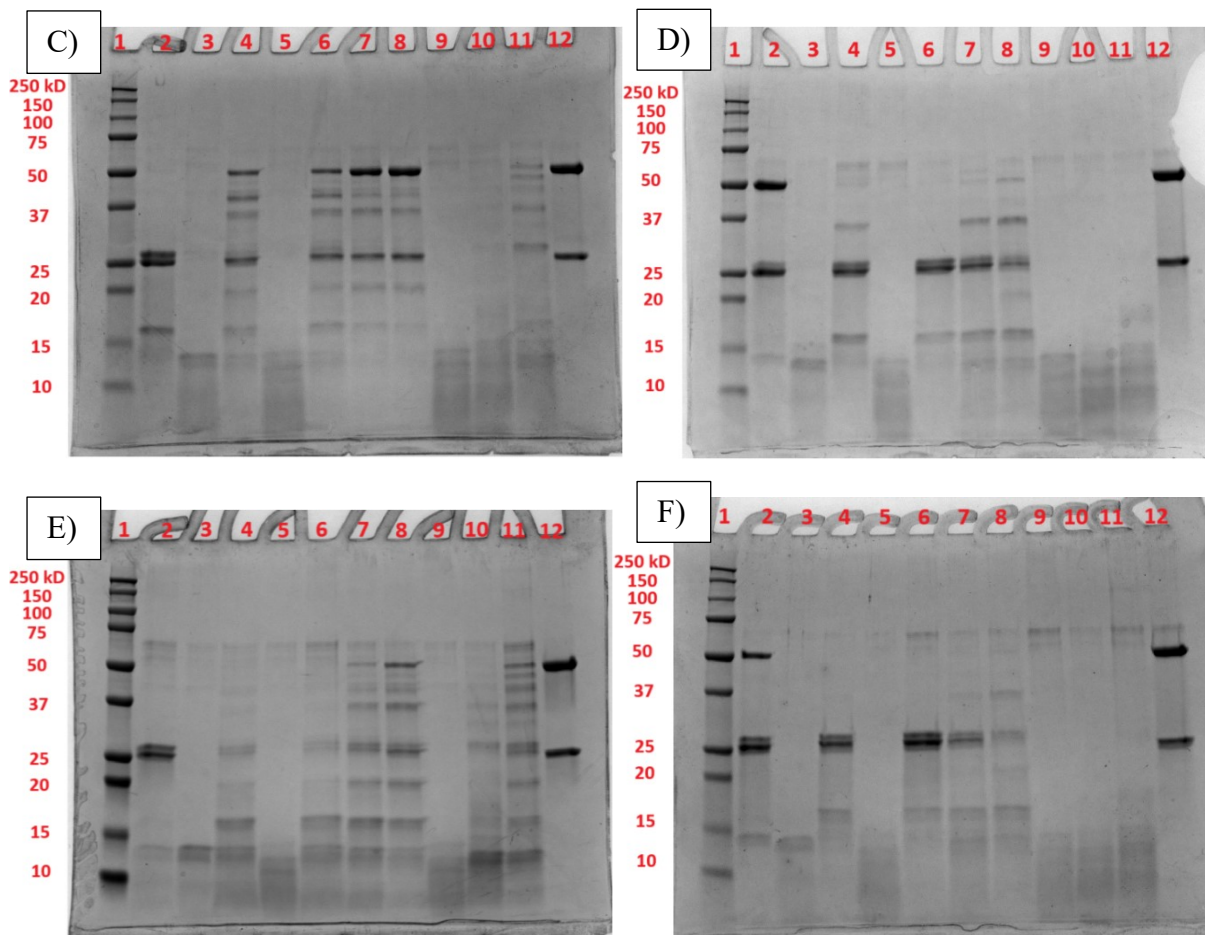
8.6. Analýza štěpení protilátky Trastuzumab pomocí SDS-PAGE

Po optimalizaci podmínek štěpení tří modelových proteinů následovalo štěpení protilátky Trastuzumab. Příprava reakční směsi byla popsána v kapitole 7.6 a výsledky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Z gelů bylo zjištěno, že těžký řetězec byl dobře naštěpen při pH 2,5 i samotnými proteázami bez přidavku redukčního nebo denaturačního činidla (sloupec 2 Obrázek 17 A); C); E) a sloupec 2 Obrázek 18 A); C); E)). Naopak při pH 3,5 proteázy nebyly schopny štěpit ani jeden z řetězců bez přidavku redukčních nebo denaturačních látek (sloupec 2 Obrázek 17 B); D); F) a sloupec 2 Obrázek 18 B); D); F)). Z výsledků SDS-PAGE bylo dále

zjištěno, že největší vliv na štěpení protilátky mělo přidání redukčního činidla TCEP (sloupce 3; 5; 9; 10; 11 Obrázek 17 A); B); C); D); E); F) a obrázek 18 A); B); C); D); E); F)). Při štěpení protilátky mucorpepsinem za přítomnosti denaturačních činidel – buď samotné 3M močoviny nebo kombinace různých koncentrací močoviny a thiomčoviny – při pH 2,5 došlo ke zhoršení účinnosti štěpení těžkého řetězce (sloupce 4; 6; 7; 8 Obrázek 17 A); C); E)), zatímco lehký řetězec byl za těchto podmínek štěpen lépe. Přidání močoviny a její kombinace s thiomčovinou při pH 2,5 nejvíce přispěly ke štěpení obou řetězců při teplotě 30 °C a nejlepší podmínky se jevily po přidání 3M močoviny (sloupec 4 Obrázek 17 E)) a 1M močoviny s 500 mM thiomčovinou (sloupec 6 Obrázek 17 E)). Zvýšení teploty na 30 °C negativně ovlivnilo štěpení při pH 2,5 za přítomnosti 2M močoviny, 1M thiomčoviny a 100 mM TCEPu (sloupec 11 Obrázek 17 E)).

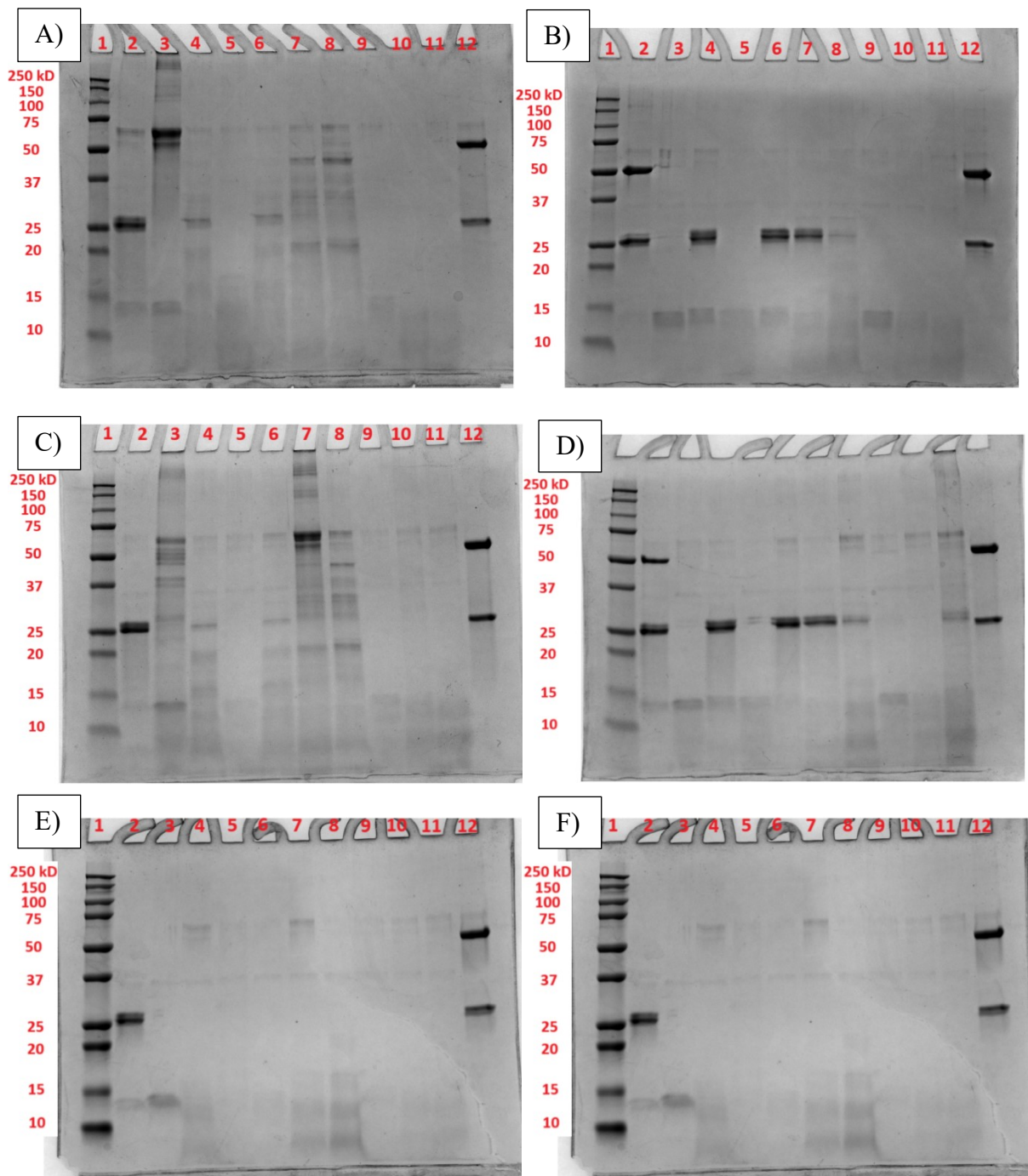
Přidání denaturačních činidel napomohlo štěpení při pH 3,5 ve všech teplotních podmínkách (sloupce 4; 6; 7; 8 Obrázek 17 B); D); F)), a to v porovnání se štěpením při pH 2,5. Se zvyšující se teplotou rostla účinnost štěpení po přidání denaturačních činidel při pH 3,5, přičemž jako nejvhodnější podmínka se jevilo přidání 2 M močoviny s 1 M thiomčovinou (sloupec 8 Obrázek 17 F)).





Obrázek 17: **Obrázek A)** štěpení protilátky mucorpepsinem při teplotě 4 °C a pH 2,5 a **Obrázek B)** štěpení protilátky mucorpepsinem při teplotě 4 °C a pH 3,5. **Obrázek C)** štěpení protilátky mucorpepsinem při teplotě 25 °C a pH 2,5 a **Obrázek D)** štěpení protilátky mucorpepsinem při teplotě 25 °C a pH 3,5. **Obrázek E)** štěpení protilátky mucorpepsinem při teplotě 30 °C a pH 2,5 a **Obrázek F)** štěpení protilátky mucorpepsinem při teplotě 30 °C a pH 3,5. Čísly jsou na všech obrázcích označeny stejné podmínky. 1 – Precision Plus Protein™ Standards; od 2 do 11 protilátka s mucorpepsinem za různých podmínek; 2 – proteáza s protilátkou; 3 – s přidaným 100 mM TCEPem; 4 – s přidanou 3M močovinou; 5 – s přidanou 3M močovinou a 100 mM TCEPem; 6 – s přidanou 1 M močovinou a 500 mM thiomčovinou; 7 – s přidanou 1M močovinou a 1 M thiomčovinou; 8 – s přidanou 2M močovinou a 1 M thiomčovinou; 9 – s přidanou 1 M močovinou, 500 mM thiomčovinou a 100 mM TCEPem; 10 – s přidanou 1M močovinou, 1 M thiomčovinou a 100 mM TCEPem; 11 – s přidanou 2M močovinou, 1 M thiomčovinou a 100 mM TCEPem; 12 – protilátka bez přidané proteázy.

Rhizopuspepsin byl po přidání redukčního nebo denaturačního činidla při pH 2,5 schopen dobře štěpit těžký řetězec a částečně i lehký řetězec za všech podmínek. Efektivita štěpení lehkého řetězce rostla se zvyšující se teplotou, což je patrné při teplotě 30 °C (obrázek 18 E)), kde se v gelu nenacházely výrazné peptidové pásy. Při pH 3,5 byl lehký řetězec štěpen po přidání samotného 100 mM TCEPu nebo jeho kombinace s denaturačními činidly (sloupec 3; 5; 9; 10; 11 obrázek 18 B); D); F)) a po přidání 2 M močoviny s 1 M thiomčovinou (sloupec 8 obrázek 18 B); D); F)). Změna teploty nehrála u rhizopuspepsinu významnou roli. Při nízkém pH však místy docházelo k vysrážení protilátky (sloupec 3 obrázek 18 A) a sloupec 3 a 7 obrázek 18 C)).



Obrázek 18: **Obrázek A)** štěpení protilátky rhizopuspepsinem při teplotě 4 °C a pH 2,5 a **Obrázek B)** štěpení protilátky rhizopuspepsinem při teplotě 4 °C a pH 3,5. **Obrázek C)** štěpení protilátky rhizopuspepsinem při teplotě 25 °C a pH 2,5 a **Obrázek D)** štěpení protilátky rhizopuspepsinem při teplotě 25 °C a pH 3,5. **Obrázek E)** štěpení protilátky rhizopuspepsinem při teplotě 30 °C a pH 2,5 a **Obrázek F)** štěpení protilátky mucorpepsinem při teplotě 30 °C a pH 3,5. Čísly jsou na všech obrázcích označeny stejné podmínky. 1 – Precision Plus Protein™ Standards; od 2 do 11 protilátka s rhizopuspepsinem za různých podmínek; 2 – proteáza s protilátkou; 3 – s přidaným 100 mM TCEPem; 4 – s přidanou 3M močovinou; 5 – s přidanou 3M močovinou a 100 mM TCEPem; 6 – s přidanou 1 M močovinou a 500 mM thiomočovinou; 7 – s přidanou 1M močovinou a 1 M thiomočovinou; 8 – s přidanou 2M močovinou a 1 M thiomočovinou; 9 – s přidanou 1 M močovinou, 500 mM thiomočovinou a 100 mM TCEPem; 10 – s přidanou 1M močovinou, 1 M thiomočovinou a 100 mM TCEPem; 11 – s přidanou 2M močovinou, 1 M thiomočovinou a 100 mM TCEPem; 12 – protilátka bez přidané proteázy.

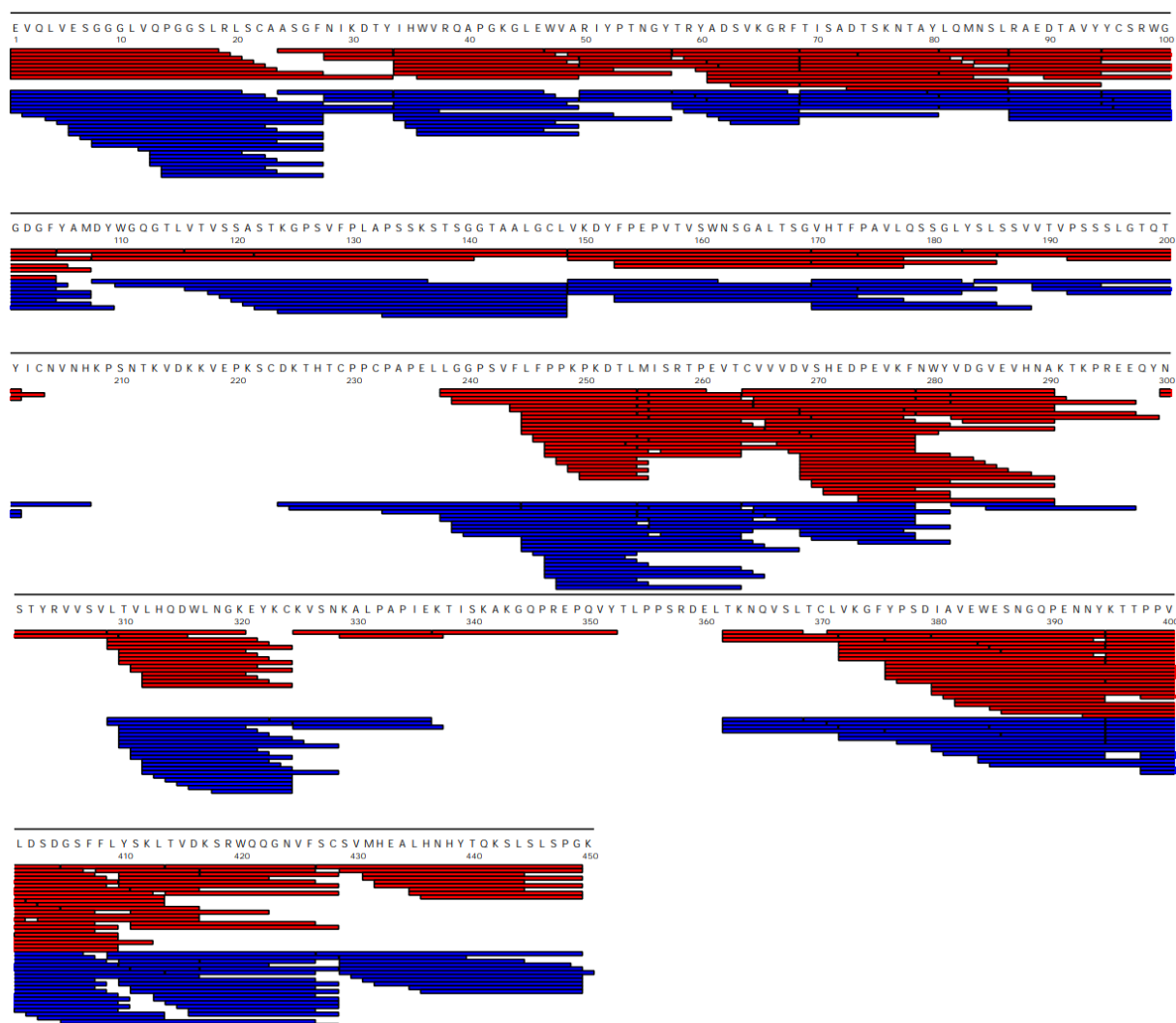
8.7. Analýza štěpení protilátky Trastuzumab pomocí LC-MS/MS

Pro zhodnocení vlivu denaturačních a redukčních podmínek na enzymatické štěpení Trastuzumabu byly původně naplánovány experimenty při více hodnotách pH a teplotách. Konkrétně byly testovány podmínky štěpení při pH 2,5 a 3,5 vždy při 4 °C a 25 °C, aby se posoudilo, jak různá hodnota pH a teplota ovlivňují štěpení protilátky. Z důvodu časových omezení a dostupnosti MS systému však nebylo možné dokončit štěpení při pH 3,5 a 4 °C. Kromě toho, aby byla zachována přehlednost a hlavní část práce nebyla zatížena nadměrným množstvím vizuálních dat, jsou podrobně uvedeny pouze výsledky ze dvou nejzajímavějších podmínek při pH 2,5 a teplotě 25 °C. Důvodem bylo, že tyto podmínky poskytly nejkonzistentnější výsledky ze všech testovaných, zatímco ostatní budou shrnuty do tabulky v dodatku. Pro ověření účinnosti štěpení Trastuzumabu za různých podmínek byly pomocí programu Digidig vypočítány statistické parametry na úrovni peptidů. Každá podmínka byla analyzována ve třech opakováních, přičemž pro analýzu dat byla použita 100% úroveň spolehlivosti. Ačkoli byl experiment původně proveden ve čtyřech opakováních, nejhorší z nich bylo vyloučeno, aby uvedené hodnoty lépe odpovídaly skutečnému trendu.

Štěpení těžkého řetězce Trastuzumabu dosáhlo nejlepšího sekvenčního pokrytí (90,22 %) a nejvyššího počtu unikátních peptidů (229) v nativních podmínkách (tabulka 18). Přidání samotného redukčního činidla výsledky nezlepšilo a všechny denaturační podmínky vedly k nižšímu pokrytí sekvence a menšímu počtu jedinečných peptidů ve srovnání s nativním štěpením. Se zvyšující se koncentrací močoviny a thiomčoviny účinnost štěpení výrazně klesala, což mohlo být způsobeno agregací nebo suboptimální dostupností substrátu mucorpepsinu. Na obrázku 19 je graficky znázorněné pokrytí sekvence těžkého řetězce.

Těžký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	229	90,22	15,03
100 mM TCEP	221	88,67	15,81
3 M močovina	158	80,67	16,55
3 M močovina + 100 mM TCEP	124	83,33	15,08
1M močovina + 0,5 M thiomochovina	151	76,89	15,85
1M močovina + 0,5 M thiomochovina + 100mM TCEP	106	71,78	15,25
1M močovina + 1 M thiomochovina	60	63,11	16,48
1M močovina + 1 M thiomochovina + 100mM TCEP	131	69,11	14,91
2M močovina + 1 M thiomochovina	55	60,44	16,16
2M močovina + 1 M thiomochovina + 100mM TCEP	131	79,11	15,82

Tabulka 18: Pokrytí sekvence těžkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

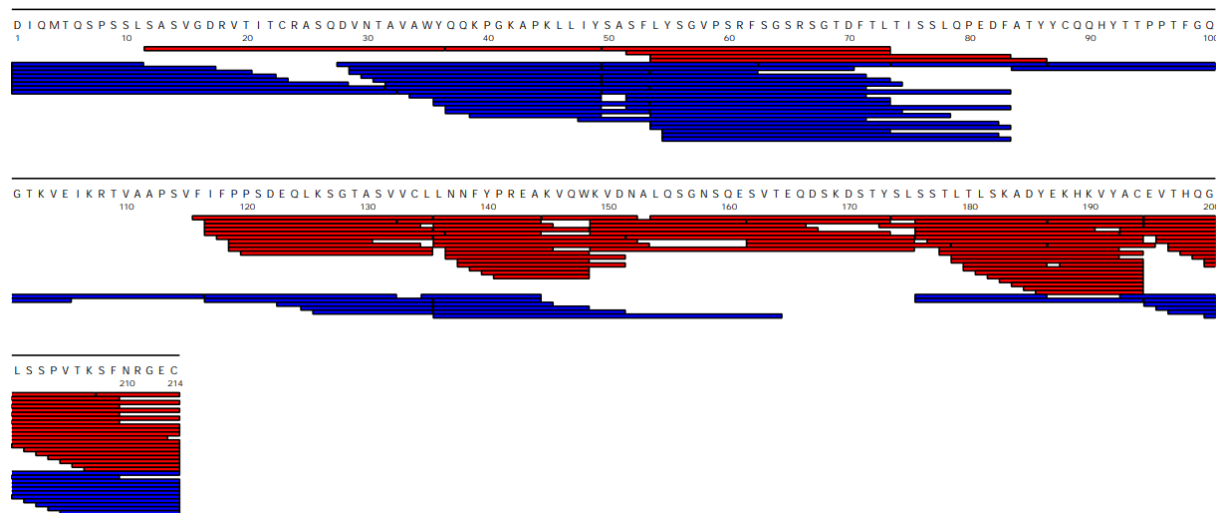


Obrázek 19: Pokrytí sekvence těžkého řetězce po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označena inkubace samotné proteázy s protilátkou. Modrou je označena inkubace so 100 mM TCEP.

Na rozdíl od těžkého řetězce vyžadoval lehký řetězec denaturaci a redukcí disulfidových můstků, aby jej mucorpepsin účinně naštěpil (tabulka 19). V nativních podmínkách bylo pokrytí sekvence omezené (58,41 %) a identifikováno bylo pouze 17 unikátních peptidů. Použití samotného TCEPu výrazně zlepšilo štěpení s 81,31% pokrytím sekvence a 87 unikátními peptidy. Nejlepší podmínkou byla 2 M močovina s 1 M thiomočovinou a 100 mM TCEPem, která vedla k 94,86% pokrytí sekvence a 71 unikátním peptidům. Rozsáhlé pokrytí sekvence na úrovni 91,59 % poskytly také podmínky s 1 M močovinou, 1 M thiomočovinou se 100 mM TCEPem a 3 M močovina se 100 mM TCEPem. Na obrázku 20 je graficky znázorněné pokrytí sekvence lehkého řetězce při dvou nejlepších podmínkách.

Lehký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	17	58,41	17,47
100 mM TCEP	87	81,31	15,08
3 M močovina	52	80,84	20,58
3 M močovina + 100 mM TCEP	58	91,59	15,07
1M močovina + 0,5 M thiomočovina	55	84,58	19,93
1M močovina + 0,5 M thiomočovina + 100mM TCEP	55	85,05	16,45
1M močovina + 1 M thiomočovina	39	64,95	20,18
1M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	66	91,59	17,41
2M močovina + 1 M thiomočovina	36	61,68	20,08
2M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	71	94,86	18,9

Tabulka 19: Pokrytí sekvence lehkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

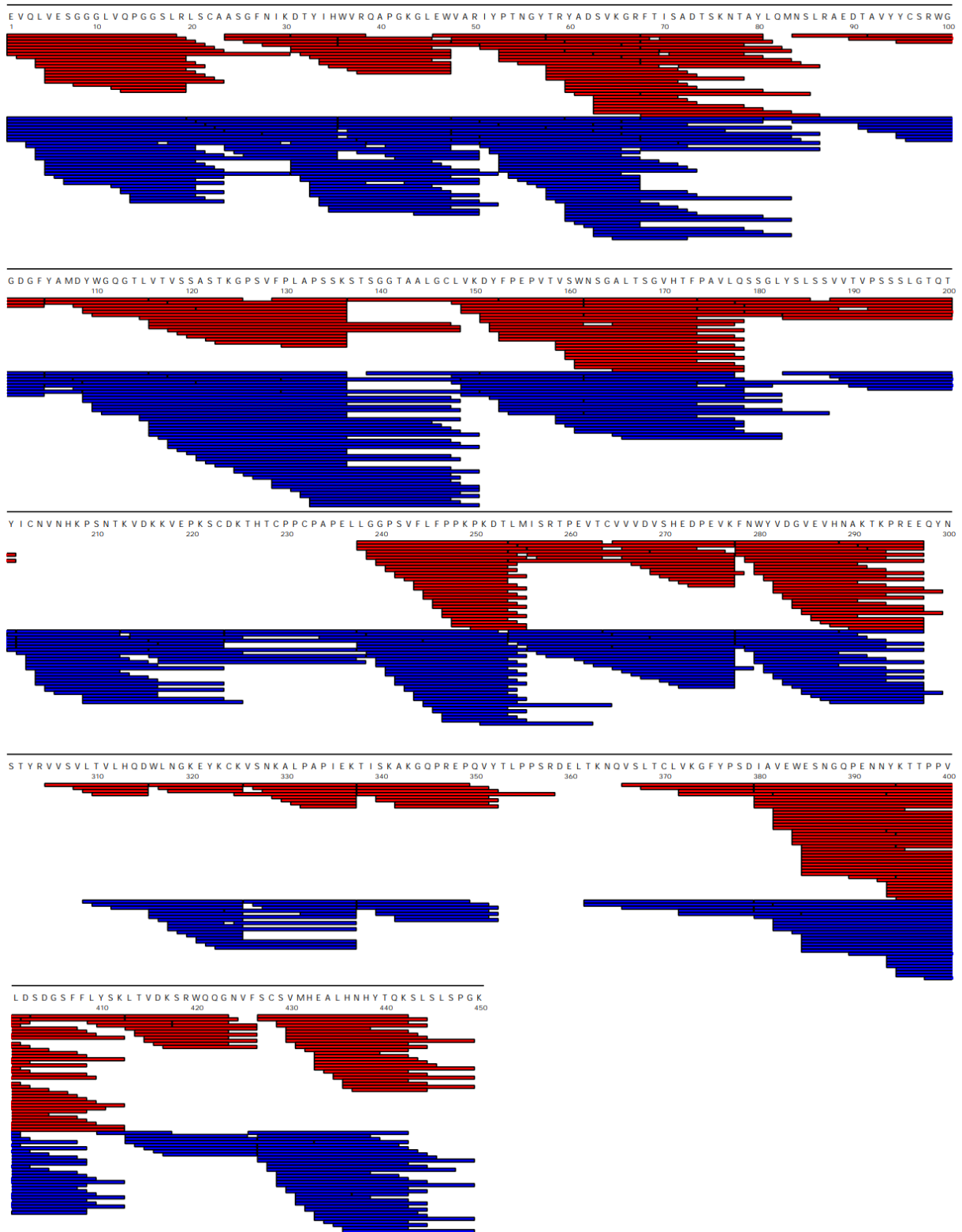


Obrázek 20: Pokrytí sekvence lehkého řetězce po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označena inkubace s 100 mM TCEP. Modrou je označena inkubace s 2 M močovinou, 1 M thiomočovinou a 100 mM TCEP

Rhizopuspepsin prokázal účinnost štěpení těžkého řetězce Trastuzumabu za různých podmínek (tabulka 20). Nejlepší pokrytí sekvence (95 %) a nejvyšší počet unikátních peptidů (432) bylo dosaženo se 100 mM TCEPem. Silné denaturační prostředí rovněž poskytlo dobré výsledky (86,89 % pokrytí, 379 peptidů). Podobně jako u mucorpepsinu, rhizopuspepsin štěpil efektivně i za nativních podmínek. Kombinace denaturačních látek s TCEPem vedla ke snížení pokrytí sekvence a nižšímu počtu peptidů, přičemž nejhorší výsledek poskytla 2 M močovina s 1 M thiomočovinou a 100 mM TCEPem (pouze 74,67 % pokrytí sekvence). Pokrytí sekvence dvou nejlepších podmínek je znázorněné na obrázku 21.

Těžký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	334	89,11	14,31
100 mM TCEP	432	95,78	16,19
3 M močovina	379	86,89	15,18
3 M močovina + 100 mM TCEP	249	92	16,28
1M močovina + 0,5 M thiomočovina	372	86	14,96
1M močovina + 0,5 M thiomočovina + 100mM TCEP	174	86	14,85
1M močovina + 1 M thiomočovina	303	86,44	15,55
1M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	152	78,67	14,24
2M močovina + 1 M thiomočovina	226	83,78	15,74
2M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	172	74,67	14,16

Tabulka 20: Pokrytí sekvence těžkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

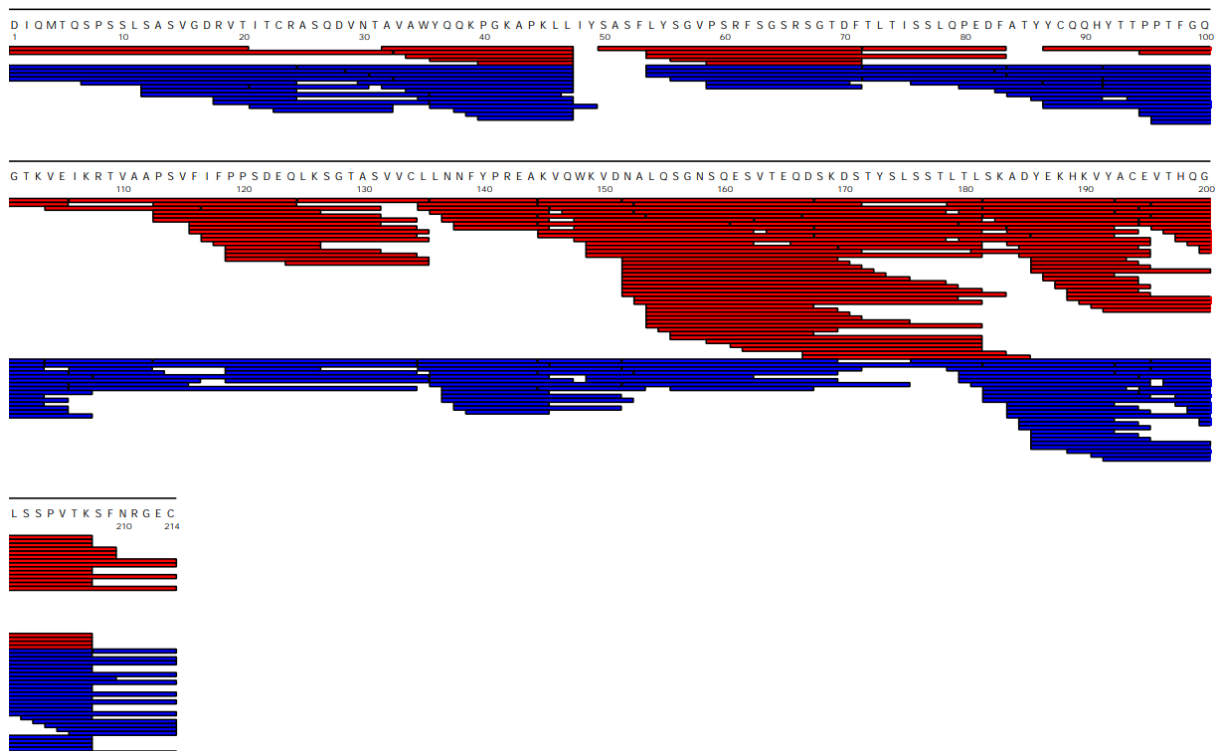


Obrázek 21: Pokrytí sekvence těžkého řetězce po štěpení rhizopuspepsinem. Červenou je označena inkubace samotné proteázy s protilátkou. Modrou je označena inkubace so 100 mM TCEP.

Rhizopuspepsin vykazoval konzistentně vysokou účinnost štěpení lehkého řetězce Trastuzumabu za všech testovaných podmínek, jak je patrné v tabulce 21. Nejlepší pokrytí sekvence (98,13 %) bylo dosaženo při použití 3 M močoviny se 100 mM TCEPem a 1 M močoviny s 0,5 M thiomocovinou a 100 mM TCEPem, což ukazuje, že silná denaturace v kombinaci s redukcí disulfidových vazeb vede k optimální proteolýze. Samotný 100 mM TCEP rovněž dosáhl velmi dobrých výsledků (97,66 % pokrytí sekvence a 139 unikátních peptidů), což naznačuje, že redukce disulfidových vazeb bez použití chaotropních látek je dostatečná pro účinné štěpení. Nativní podmínky rovněž přinesly poměrně dobré výsledky, zejména ve srovnání s mucorpepsinem. Podmínky kombinující 2 M močovinu a 1 M thiomocovinu, s nebo bez 100 mM TCEPu, poskytly mírně nižší pokrytí sekvence, pravděpodobně v důsledku nadměrné denaturace. Na obrázku 22 je graficky znázorněné pokrytí sekvence lehkého řetězce při dvou nejlepších podmínkách.

Lehký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	80	86,92	16,71
100 mM TCEP	139	97,66	15,99
3 M močovina	149	95,33	16,2
3 M močovina + 100 mM TCEP	139	98,13	14,81
1M močovina + 0,5 M thiomocovina	141	96,26	15,49
1M močovina + 0,5 M thiomocovina + 100mM TCEP	117	98,13	14,32
1M močovina + 1 M thiomocovina	160	95,33	17,41
1M močovina + 1 M thiomocovina + 100mM TCEP	132	97,2	13,89
2M močovina + 1 M thiomocovina	139	91,12	17,45
2M močovina + 1 M thiomocovina + 100mM TCEP	111	88,79	13,63

Tabulka 21: Pokrytí sekvence lehkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.



Obrázek 22: Pokrytí sekvence těžkého řetězce po štěpení rhizopuspepsinem. Červenou je označena inkubace so 100 mM TCEP. Modrou je označena inkubace s 3 M močovinou a 100 mM TCEP.

8.8. Analýza štěpení protilátky Trastuzumab v průtokovém reaktoru pomocí LC-MS/MS

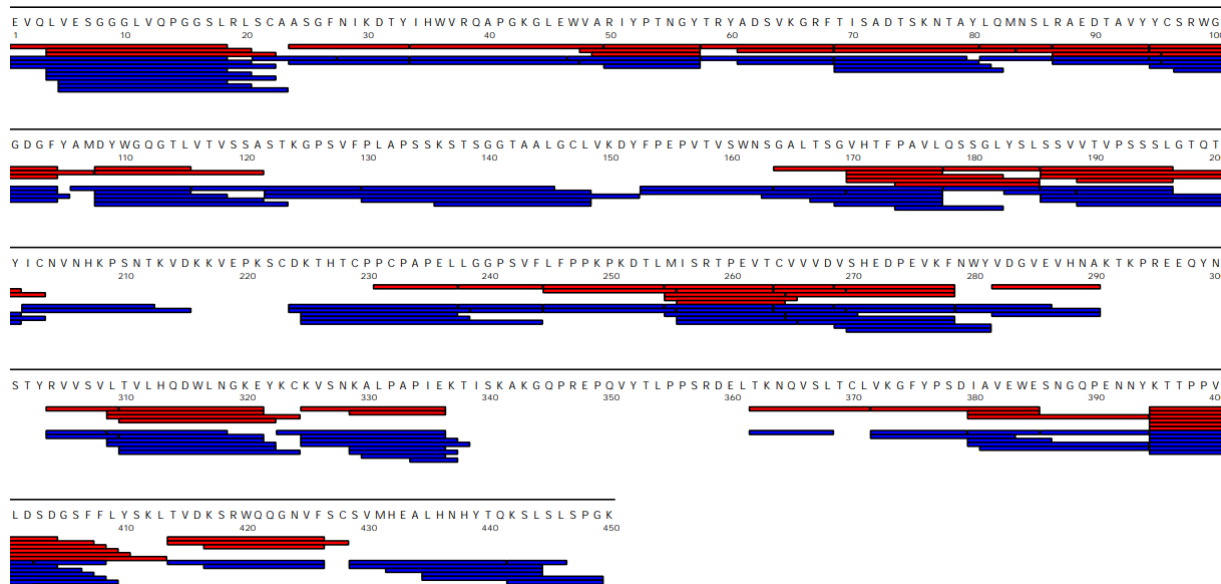
Posledním krokem bylo zhodnocení účinnosti imobilizovaného mucorpepsinu při štěpení protilátky Trastuzumab při 25 °C za čtyř různých podmínek (pH 2,5 a 3,5 s 100 mM TCEP nebo bez něj). Vzhledem k předchozím výsledkům, které ukázaly, že největší vliv na štěpení protilátky má právě přítomnost TCEP, byla denaturační činidla z těchto experimentů vynechána. Toto rozhodnutí bylo učiněno i s ohledem na skutečnost, že vyšší koncentrace denaturantů narušovaly reprodukovatelnost injekce vzorku v použitém maloobjemovém formátu (5 µL). Každá podmínka byla testována ve čtyřech opakováních, přičemž pro finální analýzu byla vybrána tři nejúspěšnější opakování na základě počtu identifikovaných unikátních peptidů.

Z důvodu časových omezení nebyla testována kolona s imobilizovaným rhizopuspepsinem, ačkoli v předchozích částech práce byla tato proteáza detailně popsána.

Štěpení těžkého řetězce Trastuzumabu bez TCEPu vedlo k omezenému pokrytí sekvence bez ohledu na hodnotu pH (tabulka 22). Přídavek 100 mM TCEPu (obrázek 23) významně zvýšil účinnost štěpení, zejména při pH 3,5, kdy bylo dosaženo 88 % pokrytí sekvence a identifikováno 125 unikátních peptidů. Tyto výsledky potvrzují, že redukce disulfidových můstků je pro efektivní proteolýzu nezbytná a že prostředí o pH 3,5 poskytuje optimální podmínky pro enzymatickou aktivitu mucorpepsinu.

Těžký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,5	28	40	11,07
100 mM TCEP pH 2,5	66	70,44	11,36
pH 3,5	42	42,89	9,83
100 mM TCEP pH 3,5	125	88	11,64

Tabulka 22: Pokrytí sekvence těžkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

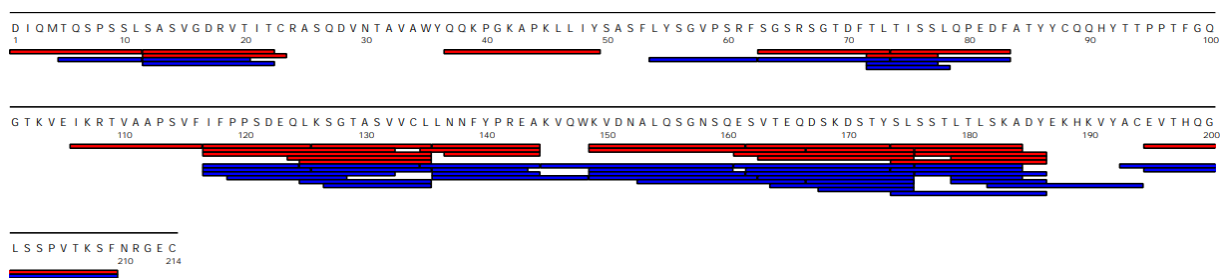


Obrázek 23: Pokrytí sekvence těžkého řetězce po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označené štěpení při pH 2,5 s 100 mM TCEP. Modrou je označené štěpení při pH 3,5 s 100 mM TCEP.

Lehký řetězec Trastuzumabu nebyl bez přítomnosti TCEPu vůbec štěpen (tabulka 23). Po přidavku TCEPu (obrázek 24) se pokrytí sekvence výrazně zlepšilo při obou hodnotách pH. V tomto případě však bylo vyššího pokrytí sekvence dosaženo při pH 2,5 (69,63 %), zatímco pH 3,5 vedlo k identifikaci většího počtu unikátních peptidů (41).

Lehký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
pH 2,5	2	10,28	11
100 mM TCEP pH 2,5	29	69,63	11,59
pH 3,5	3	14,49	10,33
100 mM TCEP pH 3,5	41	65,89	10,93

Tabulka 23: Pokrytí sekvence lehkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.



Obrázek 24: Pokrytí sekvence lehkého řetězce po štěpení mucorpepsinem. Červenou je označené štěpení při pH 2,5 s 100 mM TCEP. Modrou je označené štěpení při pH 3,5 s 100 mM TCEP.

9. Závěr

Na základě SDS-PAGE analýzy směsi tří proteinů se ukázalo, že optimální pH pro proteolytickou aktivitu mucorpepsinu i rhizopuspepsinu se pohybuje v rozmezí 2,5–4,0, což bylo následně potvrzeno také pomocí LC-MS/MS. Z dat hmotnostní spektrometrie dále vyplynulo, že mucorpepsin vykazuje vyšší štěpící selektivitu, zatímco rhizopuspepsin štěpí spíše nespecificky. Přídavek redukčního činidla TCEP neměl výrazný vliv na účinnost enzymatické hydrolyzy, naproti tomu přítomnost denaturačních činidel vedla ke zvýšení rozsahu štěpení, zejména při vyšších hodnotách pH, pravděpodobně v důsledku rozrušení terciární struktury substrátu.

Při štěpení protilátky Trastuzumab byla podle SDS-PAGE nejvýraznější štěpení pozorováno po přidavku TCEP, což bylo potvrzeno i LC-MS/MS analýzou, kde tyto podmínky vedly k nejvyššímu pokrytí sekvence. Nejvhodnější inkubační podmínky se ukázaly být při pH 2,5 a teplotě 25 °C.

SDS-PAGE analýza taky ukázala, že v některých případech proteiny nebyly zcela rozštěpeny, přestože následná LC-MS/MS analýza poskytla vysoké pokrytí sekvence. Tento rozpor naznačuje, že proteolýza může být na makroskopické úrovni neúplná, i když z hlediska identifikace peptidů se jeví jako efektivní.

Při štěpení modelových proteinů v průtokovém reaktoru s imobilizovaným mucorpepsinem došlo ve srovnání s enzymem v roztoku k poklesu pokrytí sekvence, což však mohlo být ovlivněno i rozdílnými analytickými podmínkami. Rhizopuspepsinová kolona vykazovala nejvyšší účinnost štěpení za mírně denaturačních podmínek, přičemž podobný trend byl pozorován i u mucorpepsinové kolony.

Štěpení Trastuzumabu v mucorpepsinové koloně bylo nejúčinnější při pH 3,5 a teplotě 25 °C s přidavkem TCEP. Z důvodu časového omezení nebylo možné provést analogický experiment s rhizopuspepsinovou kolonou.

Získané výsledky naznačují, že mucorpepsin i rhizopuspepsin mají potenciál jako alternativní proteázy pro použití v proteomice, zejména při štěpení obtížně přístupných nebo vysoce strukturovaných proteinů, jako jsou terapeutické protilátky. Zároveň však výsledky poukazují na nutnost další optimalizace imobilizačních protokolů a fyzikálních parametrů reaktoru s cílem zajistit vyšší reprodukovatelnost a účinnost štěpení. Do budoucna by bylo vhodné prozkoumat širší spektrum substrátů, zlepšit vazbu enzymu na nosič a případně využít kombinace proteáz

ke zvýšení sekvenčního pokrytí. Tyto poznatky představují důležitý krok směrem k vývoji robustních proteolytických platforem pro detailní charakterizaci biologických vzorků v diagnostice a vývoji léčiv.

10. Zdroje

1. *80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf*. (b.r.). Získáno 25. březen 2025, z https://assets.thermofisher.cn/TFS-Assets/LSG/manuals/80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf
2. Abdeen, A. H., Trist, B. G., Nikseresht, S., Harwood, R., Roudeau, S., Rowlands, B. D., Kreilaus, F., Cottam, V., Mor, D., Richardson, M., Siciliano, J., Forkgen, J., Schaffer, G., Genoud, S., Li, A. A., Proschogo, N., Antonio, B., Falkenberg, G., Brueckner, D., ... Double, K. L. (2025). Parkinson-like wild-type superoxide dismutase 1 pathology induces nigral dopamine neuron degeneration in a novel murine model. *Acta Neuropathologica*, *149*(1), 22. <https://doi.org/10.1007/s00401-025-02859-6>
3. Aktayeva, S., Akishev, Z., & Khassenov, B. (2018). PROTEOLYTIC ENZYMES IN CHEESE MAKING. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, *1*, Article 1. <https://doi.org/10.11134/btp.1.2018.2>
4. Al-Amrani, S., Al-Jabri, Z., Al-Zaabi, A., Alshekaili, J., & Al-Khabori, M. (2021). Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World Journal of Biological Chemistry*, *12*(5), 57–69. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v12.i5.57>
5. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, *55*(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
6. Dunn, B. M. (2013). Rhizopuspepsin. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (s. 151–154). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00030-2>
7. Duong, V.-A., & Lee, H. (2023). Bottom-Up Proteomics: Advancements in Sample Preparation. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms24065350>
8. Dupree, E. J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B. A., & Darie, C. C. (2020). A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes*, *8*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>
9. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I.-L.,

- Tlustos, C., Van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Roos, Y., Andryszkiewicz, M., ... Chesson, A. (2024). Safety evaluation of the food enzyme mucorpepsin from the non-genetically modified *Rhizomucor miehei* strain M19-21. *EFSA Journal*, 22(2), e8633. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8633>
10. Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Rodriguez-Rama, J., Barros-Velazquez, J., Miguel, T., Sanchez-Perez, A., & Villa, T. (2014). Recent Patents on Microbial Proteases for the Dairy Industry. *Recent Advances in DNA & Gene Sequences (Formerly Recent Patents on DNA & Gene Sequences)*, 8(1), 44–55. <https://doi.org/10.2174/2352092208666141013231720>
 11. Gemmete, J. J., & Mukherji, S. K. (2011). Trastuzumab (Herceptin). *American Journal of Neuroradiology*, 32(8), 1373–1374. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2619>
 12. Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>
 13. Guo, T., Steen, J. A., & Mann, M. (2025). Mass-spectrometry-based proteomics: From single cells to clinical applications. *Nature*, 638(8052), 901–911. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08584-0>
 14. Han, X., Aslanian, A., & Yates, J. R. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>
 15. Harries, M., & Smith, I. (2002). *The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin)*. <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/9/2/12121832.xml>
 16. Hossain, M. A., Brahme, R. R., Miller, B. C., Amin, J., de Barros, M., Schneider, J. L., Auclair, J. R., Mattos, C., Wang, Q., Agar, N. Y. R., Greenblatt, D. J., Manetsch, R., & Agar, J. N. (2025). Mass spectrometry methods and mathematical PK/PD model for decision tree-guided covalent drug development. *Nature Communications*, 16(1), 1777. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56985-6>
 17. Jia, D., Jiang, Z., Cui, M., & Ding, X. (2024). Proteomics efforts for hepatocellular carcinoma drug development. *Clinical Cancer Bulletin*, 3(1), 22. <https://doi.org/10.1007/s44272-024-00027-7>

18. Jia, F., Jiang, T., & Xu, W. (2025). Recent Advances in Mass Spectrometry-based Separation of Native Proteins. *Chemical Research in Chinese Universities*. <https://doi.org/10.1007/s40242-025-4242-6>
19. Ketron, G. L., Grun, F., Grill, J. D., Feldman, H. H., Rissman, R. A., & Brewer, G. J. (2025). Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral nicotinamide in the NEAT clinical trial for early Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, *17*, 59. <https://doi.org/10.1186/s13195-025-01693-y>
20. Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: A comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, *45*(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00649-0>
21. Kim, D., & Nita-Lazar, A. (2024). Progress in mass spectrometry approaches to profiling protein–protein interactions in the studies of the innate immune system. *Journal of Proteins and Proteomics*, *15*(3), 545–559. <https://doi.org/10.1007/s42485-024-00156-6>
22. Mamo, J., & Assefa, F. (2018). The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. *Journal of Food Quality*, *2018*(1), 7957269. <https://doi.org/10.1155/2018/7957269>
23. Nagy, C., Szabo, R., & Gaspar, A. (2022). Microfluidic Immobilized Enzymatic Reactors for Proteomic Analyses—Recent Developments and Trends (2017–2021). *Micromachines*, *13*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/mi13020311>
24. Nanni, P., Gehrig, P., & Schlapbach, R. (2022). Mass Spectrometry in Proteomics: Technologies, Methods, and Research Applications for the Life Sciences. *CHIMIA*, *76*(1–2), 73. <https://doi.org/10.2533/chimia.2022.73>
25. Ohtsuru, M., Tang, J., & Delaney, R. (1982). Purification and characterization of rhizopuspepsin isozymes from a liquid culture of *rhizopus chinensis*. *International Journal of Biochemistry*, *14*(10), 925–932. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(82\)90077-5](https://doi.org/10.1016/0020-711X(82)90077-5)
26. O'Neill, J. R. (2019). An Overview of Mass Spectrometry-Based Methods for Functional Proteomics. In X. Wang & M. Kuruc (Ed.), *Functional Proteomics* (Roč. 1871, s. 179–196). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8814-3_13

27. Po, A., & Eyers, C. E. (2023). Top-Down Proteomics and the Challenges of True Proteoform Characterization. *Journal of Proteome Research*, 22(12), 3663–3675. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00416>
28. Prajapati, P., Ardesana, P., Kansara, Y., Shah, P., Pulusu, V. S., Haque, A., Kalam, M. A., & Shah, S. (2025). In-vivo microwave-aided spectrofluorimetric characterization of teneligliptin-loaded solid dispersion adsorbate using quality by design approach. *Analytical Biochemistry*, 700, 115785. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2025.115785>
29. Rahmani, E. S., Lingasamy, P., Khojand, S., Lawarde, A., Moreno, S. V., Salumets, A., & Modhukur, V. (2025). *OncoProExp: An Interactive Shiny Web Application for Comprehensive Cancer Proteomics and Phosphoproteomics Analysis* (s. 2025.03.06.641407). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2025.03.06.641407>
30. Safdar, M., Sproß, J., & Jänis, J. (2014). Microscale immobilized enzyme reactors in proteomics: Latest developments. *Journal of Chromatography A*, 1324, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.045>
31. Santos, M. P. F., de Souza Junior, E. C., Villadóniga, C., Vallés, D., Castro-Sowinski, S., Bonomo, R. C. F., & Veloso, C. M. (2024). Proteases: Importance, Immobilization Protocols, Potential of Activated Carbon as Support, and the Importance of Modifying Supports for Immobilization. *BioTech*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/biotech13020013>
32. Shuken, S. R. (2023). An Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 22(7), 2151–2171. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00838>
33. Thihekar, A. K., Rathod, V. S., Panchal, V. P., Raut, S. A., Raut, R. S., & Jain, K. S. (2023). A review on-analytical tools in proteomics. *Journal of Proteins and Proteomics*, 14(3), 201–221. <https://doi.org/10.1007/s42485-023-00108-6>
34. Toby, T. K., Fornelli, L., & Kelleher, N. L. (2016). Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 9(1), 499–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041550>
35. Tsiatsiani, L., Akeroyd, M., Olsthoorn, M., & Heck, A. J. R. (2017). Aspergillus niger Prolyl Endoprotease for Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry and

- Protein Structural Studies. *Analytical Chemistry*, 89(15), 7966–7973.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01161>
36. Tsiatsiani, L., & Heck, A. J. R. (2015). Proteomics beyond trypsin. *The FEBS Journal*, 282(14), 2612–2626. <https://doi.org/10.1111/febs.13287>
37. Willems, S. (b.r.). *Enzymatic Digestion of Proteins in Biological Samples for Quantification with LC-MS/MS*.
38. Wouters, B., Currivan, S. A., Abdulhussain, N., Hankemeier, T., & Schoenmakers, P. J. (2021). Immobilized-enzyme reactors integrated into analytical platforms: Recent advances and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 144, 116419. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116419>
39. Yang, M., Hoepfner, M., Rey, M., Kadek, A., Man, P., & Schriemer, D. C. (2015). Recombinant Nepenthesin II for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 87(13), 6681–6687. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00831>

11. Dodatek ke kapitole 8.7.

Při štěpení protilátky Trastuzumab při pH 2,5 a teplotě 4 °C bylo nejvyšší efektivity štěpení těžkého řetězce mucorpepsinem pozorováno za nativních podmínek (pokrytí sekvence 86,22 % a počet unikátních peptidů 167) a při použití samotného 100 mM TCEP (tabulka 24). Přidání chaotropních činidel (močoviny a thiomočoviny) nevedlo ke zlepšení výkonnosti štěpení a ve většině případech došlo k výraznému snížení pokrytí sekvence, zejména v kombinaci s TCEP. Nejhorší podmínky byly po přidání 2 M močoviny, 1 M thiomočoviny a TCEP, kdy bylo pokrytí sekvence pouze 53,33 %.

Těžký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	167	86,22	14,39
100 mM TCEP	174	85,78	15,98
3 M močovina	159	77,33	16,85
3 M močovina + 100 mM TCEP	49	52,67	17,14
1M močovina + 0,5 M thiomočovina	178	80,22	16,35
1M močovina + 0,5 M thiomočovina + 100mM TCEP	131	70	15,4
1M močovina + 1 M thiomočovina	85	67,11	16,58
1M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	87	65,56	16,79
2M močovina + 1 M thiomočovina	47	60,89	16,72
2M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	47	53,33	17,87

Tabulka 24: Pokrytí sekvence těžkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

U lehkého řetězce bylo nejlepší pokrytí sekvence (85,05 %) dosaženo při podmínkách s 3 M močovinou + 100 mM TCEP (tabulka 25). Přidání denaturačních činidel (močoviny a thiomočoviny) štěpení lehkého řetězce nepomohlo ani po přidání TCEP, který ve výsledcích z kapitoly 8.7. výrazně napomohl štěpení lehkého řetězce.

Lehký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	14	73,83	21,21
100 mM TCEP	78	80,84	15,53
3 M močovina	51	82,24	20,84
3 M močovina + 100 mM TCEP	58	85,05	17,57
1M močovina + 0,5 M thiomčovina	18	75,23	23
1M močovina + 0,5 M thiomčovina + 100mM TCEP	45	80,37	16,64
1M močovina + 1 M thiomčovina	11	50,93	21,64
1M močovina + 1 M thiomčovina + 100mM TCEP	38	77,57	19,79
2M močovina + 1 M thiomčovina	27	69,63	20,96
2M močovina + 1 M thiomčovina + 100mM TCEP	32	64,02	22,06

Tabulka 25: Pokrytí sekvence lehkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Při podmínkách při pH 3,5 a teplotě 25 °C byl těžký řetězec nejlíp pokrytý (92,44 %) za nativních podmínek (tabulka 26). Nejvyšší počet unikátních peptidů byl po přidání 100 mM TCEP. Kombinace močoviny a thiomčoviny s TCEP výrazně snížili pokrytí sekvence a počet unikátních peptidů ve srovnání s výsledky bez TCEP. Při výsledcích z kapitoly 8.7. byl pozorován opačný trend.

Těžký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	140	92,44	14,78
100 mM TCEP	224	86,22	16,59
3 M močovina	107	77,56	14,55
3 M močovina + 100 mM TCEP	163	80,89	15
1M močovina + 0,5 M thiomčovina	212	76	14,58
1M močovina + 0,5 M thiomčovina + 100mM TCEP	128	79,78	15,38
1M močovina + 1 M thiomčovina	169	79,56	15,2
1M močovina + 1 M thiomčovina + 100mM TCEP	95	66,89	15,25
2M močovina + 1 M thiomčovina	162	81,33	15,67
2M močovina + 1 M thiomčovina + 100mM TCEP	120	68,44	14,82

Tabulka 26: Pokrytí sekvence těžkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Na rozdíl od výsledků v kapitole 8.7. byla sekvence lehkého řetězce dobře pokryta i za nativních podmínek (94,86 % a počet peptidů 42) (tabulka 27). Nejlepších výsledků však bylo dosaženo po přidání 3 M močoviny a TCEP (98,13 % pokrytí sekvence a 62 unikátních peptidů). Kombinace močoviny s thiomocovinou výsledky více méně zhoršili a to i po přidání TCEP.

Lehký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	42	94,86	15,48
100 mM TCEP	65	89,72	16
3 M močovina	23	71,96	18,43
3 M močovina + 100 mM TCEP	62	98,13	16,79
1M močovina + 0,5 M thiomocovina	36	80,84	19,97
1M močovina + 0,5 M thiomocovina + 100mM TCEP	47	76,17	14,96
1M močovina + 1 M thiomocovina	44	88,32	17,84
1M močovina + 1 M thiomocovina + 100mM TCEP	35	93,93	17
2M močovina + 1 M thiomocovina	48	83,64	17,02
2M močovina + 1 M thiomocovina + 100mM TCEP	60	96,73	17,17

Tabulka 27: Pokrytí sekvence lehkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Štěpení těžkého řetězce v pH 2,5 a teplotě 4 °C rhizopuspepsinem bylo nejlepšího pokrytí sekvence (95,56 %) dosaženo po přidání 100 mM TCEP (tabulka 28). Nejvyšší počet unikátních peptidů byl získán v přítomnosti 3 M močoviny. Při kombinacích močoviny s thiomocovinou byl pozorovaný pokles v počtu peptidů a pokrytí sekvence.

Těžký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	302	86	14,31
100 mM TCEP	330	95,56	16,49
3 M močovina	421	89,78	15,87
3 M močovina + 100 mM TCEP	219	94,67	15,43
1M močovina + 0,5 M thiomocovina	215	78	16,34
1M močovina + 0,5 M thiomocovina + 100mM TCEP	213	86,67	15,43
1M močovina + 1 M thiomocovina	292	85,11	15,76
1M močovina + 1 M thiomocovina + 100mM TCEP	174	84,67	14,81
2M močovina + 1 M thiomocovina	289	83,78	15,83
2M močovina + 1 M thiomocovina + 100mM TCEP	114	74,67	14,8

Tabulka 28: Pokrytí sekvence těžkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Pokrytí sekvence lehkého řetězce bylo v některých případech lepší než v kapitole 8.7. 100 % pokrytí sekvence bylo dosaženo při čtyřech podmínkách (tabulka 29), přičemž nejvyšší počet unikátních peptidů byl získán v přítomnosti samotné 3 M močoviny.

Lehký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	61	87,85	15,7
100 mM TCEP	157	97,2	15,39
3 M močovina	176	100	16,36
3 M močovina + 100 mM TCEP	138	100	14,66
1M močovina + 0,5 M thiomočovina	94	88,32	15,74
1M močovina + 0,5 M thiomočovina + 100mM TCEP	140	100	14,29
1M močovina + 1 M thiomočovina	164	92,99	17,66
1M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	141	100	15,31
2M močovina + 1 M thiomočovina	171	87,85	18,58
2M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	110	90,19	16,6

Tabulka 29: Pokrytí sekvence lehkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Při pH 3,5 a teplotě 25 °C bylo štěpení těžkého řetězce téměř ve všech podmínkách horší než v kapitole 8.7. Nejvyšší počet peptidů (386) a nejlepší pokrytí sekvence (96 %) bylo dosaženo po přidání 100 mM TCEP (tabulka 30). Pokrytí sekvence těžkého řetězce bylo při všech podmínkách nad 80 %. Počet peptidů však klesal, přičemž nejnížší množství peptidů bylo získáno v nativních podmínkách a po přidání 2 M močoviny, 1 M thiomočoviny s 100 mM TCEP.

Těžký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	154	91,11	14,18
100 mM TCEP	386	96	16,9
3 M močovina	207	89,33	15,41
3 M močovina + 100 mM TCEP	277	95,33	16,06
1M močovina + 0,5 M thiomočovina	314	88,67	14,57
1M močovina + 0,5 M thiomočovina + 100mM TCEP	246	91,78	16,09
1M močovina + 1 M thiomočovina	366	84,22	15,27
1M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	195	91,11	15,66
2M močovina + 1 M thiomočovina	292	83,11	14,79
2M močovina + 1 M thiomočovina + 100mM TCEP	159	81,11	14,5

Tabulka 30: Pokrytí sekvence těžkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.

Pokrytí sekvence lehkého řetězce bylo ve většině případů lepší. Naopak počet peptidů byl nižší než v kapitole 8.7. 100 % pokrytí sekvence a nejvyšší počet peptidů byl získán po přidání 3 M močoviny s 100 mM TCEP (tabulka 31).

Lehký řetězec	Počet unikátních peptidů	Pokrytí sekvence [%]	Průměrná délka peptidů
nativní podmínky	39	94,86	16,1
100 mM TCEP	111	100	16,34
3 M močovina	51	94,86	14,94
3 M močovina + 100 mM TCEP	146	100	15,11
1M močovina + 0,5 M thiomčovina	58	95,33	16,48
1M močovina + 0,5 M thiomčovina + 100mM TCEP	105	98,13	14,81
1M močovina + 1 M thiomčovina	124	96,73	15,9
1M močovina + 1 M thiomčovina + 100mM TCEP	95	98,13	14,66
2M močovina + 1 M thiomčovina	122	94,86	14,85
2M močovina + 1 M thiomčovina + 100mM TCEP	117	100	15,8

Tabulka 31: Pokrytí sekvence lehkého řetězce, počet unikátních peptidů a jejich průměrná délka.