

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studijní program: Klinická a toxikologická analýza**



**Studium proteomu dentinu v lidských zubech**

**(Proteomic study of human tooth dentin)**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí práce:** RNDr. Michal Jágr, PhD.

**Konzultant:** Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Praha, 2013

Ludmila Zettlová

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma *Studium proteomu dentinu v lidských zubech* jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího a konzultanta bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v seznamu literatury.

Praha, 20. 5. 2013

.....

Ludmila Zettlová

## ABSTRAKT

Analýza proteomu dentinu v lidských zubech dospělých jedinců byla provedena za účelem optimalizace analýzy proteinů zubního dentinu metodou dvourozměrné gelové elektroforézy (2-DE). Zuby moudrosti byly očištěny, rozdrčeny a extrahovány v guanidinovém a EDTA pufru. Extrahované proteiny byly separovány 2-DE, naštípány trypsinem na peptidy a následně bylo ve vzorcích pomocí nLC-MS/MS identifikováno celkem 7 proteinů. Využití IPG stripů s různou škálou oblasti pH gradientu a následné srovnání 2-DE gelů bohužel nepřineslo významné nové informace, neboť byly identifikovány především keratiny, kolageny a sérový albumin.

**Klíčová slova:** dentin, proteomika, isoelektrická fokusace, dvourozměrná gelová elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, LC-MS/MS

## ABSTRACT

Proteome analysis of dentin in human teeth adult subjects was conducted to optimize the two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) analysis of proteins from the dental tissue. The third molar teeth were cleaned, crushed and extracted in guanidine and EDTA buffer. Extracted proteins were separated by 2-DE, digested with trypsin to peptides and subsequently analyzed using nLC-MS/MS. Totally, 7 unique proteins were identified in the samples. The use of IPG strips with different range of the pH gradient and the subsequent comparison of 2-DE gels unfortunately did not bring important new information, because common keratin, collagen and serum albumin proteins were identified.

**Keywords:** dentin, proteomics, isoelectric focusing, two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, LC-MS/MS

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala panu *prof. Ing. Ivanovi Mikšíkovi, DrSc.* za možnost pracovat na Fyziologickém ústavu AV ČR, v Praze 4 – Krči. Dále především děkuji svému vedoucímu bakalářské práce *RNDr. Michalovi Jágrovi, PhD.* za odborné vedení, užitečné rady a poskytnutí experimentálních dat. Taktéž patří dík konzultantovi mé práce *prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc.* za cenné připomínky, trpělivost a ohleduplnost. Děkuji také *Mgr. Adamovi Eckhardtovi, PhD.* za spolupráci v laboratoři a zpracování výsledků MS spekter na nLC-MS/MS. Ostatní pracovníci z oddělení *Analýzy fyziologicky aktivních látek* byli ochotní mi kdykoliv poradit a vždy vyjít vstříc.

# OBSAH

1 ÚVOD .....	7
2 CÍL PRÁCE .....	8
3 TEORETICKÁ ČÁST .....	9
<b>3.1 Zubní tkáň .....</b>	<b>9</b>
3.1.1 Vznik dentinu .....	9
3.1.2 Funkce dentinu .....	10
3.1.3 Studium dentinu .....	10
<b>3.2 Používané metody v proteomice .....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza .....	11
3.2.1.1 Isoelektrická fokusace .....	12
3.2.1.1.1 Chaotropní činidla .....	13
3.2.1.1.2 Detergenty .....	13
3.2.1.1.3 Redukční činidla .....	13
3.2.1.1.4 IPG – stripy .....	14
3.2.1.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného .....	15
3.2.1.3 Vizualizace gelů pomocí Commassie Brilliant Blue .....	15
3.2.2 Analýza a identifikace bílkovin dentinu pomocí nLC-MS/MS .....	16
3.2.3 Metoda podle Bradfordové .....	17
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	18
<b>4.1 Použité přístroje a materiál .....</b>	<b>18</b>
4.1.1 Přístroje .....	18
4.1.2 Chemikálie .....	18
4.1.3 Kity .....	19
4.1.4 Roztoky .....	19
4.1.5 Vzorky .....	20
<b>4.2 Použité metody .....</b>	<b>21</b>
4.2.1 Preanalytická část .....	21
4.2.1.1 Zisk G-extraktu dentinu .....	22
4.2.1.2 Zisk E-extraktu dentinu .....	22
4.2.1.3 Kontrola čistoty extraktů .....	23

4.2.2 Vlastní analýza .....	24
4.2.2.1 Stanovení proteinů ve vzorku .....	24
4.2.2.2 Optimalizace a použití 2-DE .....	26
4.2.2.3 Skenování gelů .....	29
4.2.2.4 Vyřezávání spotů z gelu a jejich další zpracování .....	29
4.2.2.5 Štěpení bílkovin trypsinem .....	30
4.2.2.6 Příprava vzorků dentinu pro analýzu nLC-MS/MS .....	31
4.2.2.7 Analýza peptidů na nLC-MS/MS .....	31
4.2.2.8 Vyhodnocování MS spekter .....	33
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>34</b>
5.1 Obsah proteinů ve vzorcích dentinu .....	34
5.2 Optimalizace množství vzorku pro 2-DE .....	36
5.3 Kvantifikace spotů pomocí PDQuest 8.0.1 .....	37
5.4 Spoty určené k identifikaci .....	38
5.5 Identifikované proteiny nLC-MS/MS .....	39
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>42</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>45</b>
SEZNAM ZKRATEK .....	46
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	48

# 1 ÚVOD

Složkami živé hmoty se zabývají dva vědecké obory – genomika a proteomika. Cílem genomiky je celková identifikace a analýza genomu, kdežto proteomika sleduje strukturu proteomu včetně jeho vlastností a snaží se jej zachytit ve všech obdobích života organismu. Termín „proteom“ jako označení souboru všech proteinů kódovaných genomem použil poprvé Marc R. Wilkins v roce 1994 na konferenci v Sieně [1]. Vznikl nový obor zvaný proteomika, jehož náplní je celková identifikace proteinů v určité zdravé nebo nemocné buňce či tkáni a studium jejich funkce a interakce. Velmi brzy se ukázalo, že proteomika bude ve srovnání s genomikou daleko složitější. Příčinou je nestálost proteomu, jehož složení se mění v závislosti na prostředí, stáří buňky a konkrétních podmínkách, ve kterých daná buňka žije.

Mezi nejčastěji používané metody v proteomice patří gelová elektroforéza, hmotnostní spektrometrie a imunochemické metody. Každá ze jmenovaných metod, mezi nimiž patří v současné době významné místo dvourozměrné elektroforéze (2-DE), má své klady i zápory. 2-DE je metodou schopnou separace celých komplexních směsí bílkovin.

V posledních desetiletích prochází metoda 2-DE velký rozvojem a stává se stále více a více žádanější technologií v biomedicíně výzkumu a v klinických laboratořích. Lze ji využít i např. při studiu proteomu dentinu v lidských zubech. Kvalitativní i kvantitativní rozdíly ve složení proteinů v dentinu zubů mohou být zodpovědné za různé sklony jednotlivých osob ke kazivosti zubů. Jejich odhalení může napomoci ke zjištění různých příčin chorob zubů, např. paradontózy, samovolného vypadávání zubů či různé míry žloutnutí zubů.

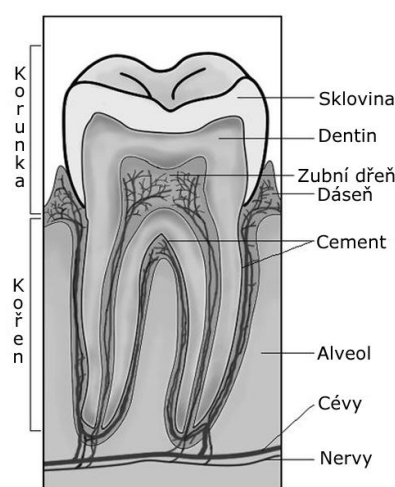
## 2 CÍL PRÁCE

Izolovat bílkoviny přítomné ve vzorcích zubů moudrosti. Analyzovat tyto proteiny pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy se zaměřením převážně na optimalizaci a výběr nejvhodnějšího pH rozsahu IPG stripů. Následně provést vzájemné porovnání jednotlivých 2-DE gelů a vytipované spoty analyzovat pomocí nLC-MS/MS. Poté kvalitativně vyhodnotit MS spektra na základě srovnání databázemi *IPI\_human* nebo *SwissProt*, a identifikovat proteiny přítomné ve spotech.

## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Zubní tkáň

Vrchní část zubu pokrývá sklovina, která je nejtvrdší tkání lidského těla a obsahuje 96 % anorganické složky a 4 % organické složky. Pod sklovinou se nachází zubovina (dentin), která obsahuje až 70 % neživé hmoty. Dentin dále obsahuje až 25 % živé hmoty, která je tvořena extracelulární matricí, a zbytek tvoří volně vázaná voda. Podíl živé hmoty v dentinu se s věkem člověka snižuje na úkor zvýšení obsahu neživé hmoty. Vnitřek zubu je tvořený zubní dřeň, která obsahuje i zubní nerv a cévy vyživující zub [2].



Obr. 1: Stavba lidského zubu [3]

V extracelulární matrici dentinu jsou přítomné především kolageny (typu I, III, V, VI, XI a XII), nekolagenní proteiny [dentinový sialofosfoprotein (DSPP), proteiny bohaté na kyselinu sialovou (osteopontin, osteonectin, osteokalcin, kostní sialoprotein, kostní kyselý glykoprotein)], fosfolipidy, enzymy a růstové faktory vykazující buněčné signalizace [2, 4].

#### 3.1.1 Vznik dentinu

Odontoblasty jsou vysoce specializované buňky zodpovědné za tvorbu a údržbu dentinu uvnitř zubu. Tyto buňky nejprve produkuje a vylučují organické látky extracelulární matrice dentinu, který lze popsat také jako predentin, a který není

zpočátku mineralizovaný. V návaznosti na uložené proteiny, vyskytující se v matrici, se začnou tvořit krystalky hydroxyapatitu, čímž je zahájena mineralizace predentinu a jeho přeměna na dentin. Vlákna kolagenů představují trojrozměrné lešení pro ukládání krystalů [2, 5].

### **3.1.2 Funkce dentinu**

Dentin je vysoce mineralizovanou tkání, která tvoří základní hmotu zubu, poskytuje ochranný obal pro dřeň a tvoří pilíř pro obložení sklovinou a cementem (vrstvička na kořeni zubu). [2]

Proteom dentinu představuje komplexní směs proteinů s různými funkcemi. V organismu proteiny mohou být zapojeny v metabolismu, buněčné organizaci a růstu, stálosti vnitřního prostředí organismu (homeostázi), regulaci biologických procesů, stresové odpovědi, transportu látek či imunitní odpovědi. Konkrétně, některé z nekolagenních proteinů predentinu (např. DSPP) mají jako jednu ze svých hlavních funkcí zprostředkovávat a regulovat ukládání minerálního fosforečnanu vápenatého na matrici kolagenních vláken [2, 6].

### **3.1.3 Studium dentinu**

Komplexní proteomická analýza zubů je relativně novým tématem v proteomice. Korejci byli první, kteří komplexně proteomicky analyzovali dentin metodou SDS-PAGE následované MS analýzou v roce 2009. O 2 roky později rozšířili analýzu o 29 známých, avšak nově nalezených proteinů v zubní tkáni. Vědci z FgÚ AV ČR poprvé provedli 2-DE analýzu proteinů z dentinu lidských zubů moudrosti a představili první proteinovou mapu lidského dentinu. Celkově lze konstatovat, že do dnešní doby byla velká pozornost věnována výzkumu jednotlivých proteinů v dentinu, avšak málo pozornosti se věnovalo komplexní proteomické analýze. Také byly provedeny proteomické analýzy ostatních částí zubu: enamelu (skloviny) a zubní dřeně [2, 4, 6].

## 3.2 Používané metody v proteomice

Do dnešní doby byly vyvinuty různé technologie s cílem studovat proteomy buněk, tkání a buněčných organel. Mezi ně patří jednorozměrná či dvourozměrná elektroforéza (2-DE) v polyakrylamidovém gelu, radioaktivní značení pro relativní a absolutní kvantifikaci, chromatografie, hmotnostní spektrometrie a proteinové metody microarray [7].

Výsledky proteomů mohou být použity pro sledování diferenciací kmenových buněk zubní dřene na odontoblasty, které syntetizují dentin. Pro studii exprese bílkovin během mineralizace dentinu lze použít molekulární techniky např. reverzní transkripční polymerázovou řetězovou reakci (RT-PCR), Western blot či imunoanalytické metody jako jsou ELISA anebo imunohistochemie [4]. Jmenované metody jsou také schopny rozpoznat antigeny na základě interakce antigen-protilátka a odhalit tak rakovinotvorné bujení [8]. Proteomika v kombinaci s imunometodami má tedy široké uplatnění v klinických výzkumech.

### 3.2.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza

V závislosti na velikosti polyakrylamidového gelu a pH použitého gradientu je možno najednou separovat a identifikovat až několik tisíc proteinů (rutinně kolem 2000 bílkovin). Jedná se i o metodu vhodnou pro studium posttranslačních modifikací a izoform proteinů [9]. Metoda 2-DE však klade vysoké nároky na pečlivou laboratorní práci i na použití velmi čistých chemikálií a její provedení je relativně časově náročné.

Důležitým krokem celého pracovního postupu je příprava vzorku tak, aby se podařilo analyzovat co největší množství bílkovin, pocházejících ze vzorku. Příprava vzorku by měla být zároveň co možno nejrychlejší a nejjednodušší, aby se zabránilo možné kontaminaci materiálu. Problémem u 2-DE bývá i separace hydrofobních proteinů. Nerozpustnost těchto bílkovin ve vodě způsobuje obtížnou extrahovatelnost proteinů ze vzorku a jejich nesnadný vstup do proužků s imobilizovaným pH gradientem (tzv. „IPG strip“) [9]. Z tohoto důvodu je často důležité se správně rozhodnout pro vhodné rozpouštědlo, do kterého se vyextrahují bílkoviny ze vzorků majících vesměs široké spektrum vlastností.

Prvním rozměrem 2-DE je isoelektrická fokusace (IEF), kdy se na IPG proužcích pod vloženým napětím dělí přítomné proteiny podle hodnot svých isoelektrických bodů

(pI), které jsou charakteristické pro jednotlivé bílkoviny. Druhým rozměrem 2-DE je klasická polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Polyakrylamidový gel, používaný nejčastěji v deskovém uspořádání, obsahuje dodecylsírany sodný, který denaturuje proteiny a dodává jim specifický náboj úměrný jejich relativní molekulové hmotnosti [9]. Tak se proteiny dělí podle své velikosti.

### 3.2.1.1 Isoelektrická fokusace

Principem IEF je dělení látek o různé hodnotě pI v prostředí se stabilním gradientem pH, který je získán přítomností amfolytických pufrů. Během IEF se všechny ionty pohybují směrem, který je dán jejich znaménkem náboje. Pohyblivost iontů  $H^+$  a  $OH^-$  je větší než rychlost pohybu složek amfolytického Je-li složka v oblasti, kde je  $pH > pI$ , pohybuje se k anodě, a je-li v oblasti, kde je  $pH < pI$ , je nabitá kladně a pohybuje se ke katodě. Složky amfolytického pufru vytvoří zóny, které se zaostří (fokusuji) a dále se nepohybují, neboť se zastavily v místě, kde  $pH = pI$  (jejich střední náboj se rovná nule a zároveň jsou nejméně rozpustné). [10].

Po aplikaci stejnosměrného proudu se sleduje postupné vytváření zóny. Postupem času vodivost systému klesá, a tudíž klesá proud. Pokud hodnota proudu dále neklesá, je fokusace ukončena. V důsledku kladeného odporu průchodu proudu se zařízení přehřívá, proto je třeba aparáty pro IEF účinně chladit [10].

Pro analytické účely je vhodná spíše stabilizace zón použitím gelové matrice na rozdíl od stabilizace zón gradientem hustoty roztoku. Gelové matrice mohou být použity ve vertikálním uspořádání (jako při PAGE) nebo v horizontální desce (*flat bed*) se Sephadexovými nosiči pro gelovou chromatografii sloužící jako stabilizující prostředí [10].

Požadavky kladené na amfolytický pufr a jeho složky je možné shrnout do následujících bodů [10]:

- 1) Musí pufrvat v okolí pI svých složek.
- 2) Musí mít určitou vodivost a rozpustnost i v okolí pI.
- 3) Jejich  $M_r$  musí být taková, aby se daly oddělit gelovou chromatografií, dialýzou či SDS-PAGE.

4) Neměly by vykazovat absorpci v UV oblasti pro umožnění detekce absorbujících komponent směsí.

5) Mají mít takový počet složek, aby vzniklý gradient pH byl rovnoměrný a hladký.

Pro vysoké rozlišení IEF je nutné odstranit neproteinové ionty, aby bylo umožněno vynaložit minimum elektrického proudu pro dosažení konečného napětí (8000 – 10000 V) [11].

#### 3.2.1.1.1 Chaotropní činidla

Tyto látky snižují povrchové napětí kapalin a denaturují proteiny v důsledku narušení mezimolekulových interakcí, zejména H-můstků zpevňujících jejich strukturu, čímž se stavba bílkoviny rozvolní a usnadní se rozpustnost. Tuto vlastnost má močovina, a proto se při IEF hojně používá. Příklad thiomčoviny též zlepšuje rozpouštění hydrofobních membránových proteinů, ale s výjimkou alkalické oblasti pH (8,5 – 9), kdy se stává atom síry thiomčoviny reaktivním [12].

#### 3.2.1.1.2 Detergenty

Pro zabránění ztrát bílkovin ve vzorku způsobené jejich agregací a srážením se používají povrchově aktivní látky = detergenty. V biochemii jedním z neúčinnějších je aniontový detergent SDS [9]. V IEF se SDS používá s přebytkem neiontového nebo zwitteriontového detergentu (např. 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-propan-1-sulfonát = CHAPS), který tvoří smíšené micely s SDS a ty migrují k anodě. Tento první postup v 2-DE navrhl O'Farrell v roce 1975 [11].

#### 3.2.1.1.3 Redukční činidla

Jejich úlohou je snížit tendenci ke spontánní tvorbě disulfidických můstků, kterou způsobuje vzdušný kyslík, v bílkovinách obsahující cystein. Nejčastěji používanými redukčními činidly jsou dithiothreitol (DTT) a 2-merkptoethanol. Jedná se o slabé kyseliny s hodnotami pKa 8 – 9, mají tedy tendenci se ionizovat a přecházet při IEF v alkalické části gelu k anodě. Aby se zabránilo ionizaci redukčními činidly, využívá se alkylačních činidel, jako je jodacetamid, který alkyluje –SH skupiny a zbavuje je jejich reaktivnosti [9, 11].

### 3.2.1.1.4 IPG – stripy

Moderní IEF metody 2-DE používají proužek polyakrylamidového gelu, který obsahuje imobilizovaný pH gradient (IPG). Obvykle se jedná o nízkoprocentní akrylamid (4 – 5%), protože omezovat migraci proteinů během IEF o velké molekulové hmotnosti je nežádoucí (čím více % akrylamidu, tím užší póry v gelu vzniknou) [11].

Vzorek bílkovin se nejprve rozpustí v rehydratačním roztoku (obsahujícím močovinu, zwitteriontový detergent, nosný amfolyt a redukční činidlo) a přenesse se pipetou na komerčně dodávané proužky gelu s imobilizovaným pH gradientem (IPG stripy). IPG strip je vložen gelem dolů ve štěrbině na fokusační destičce. V prvním kroku se na přístroji určeném pro IEF spustí tzv. pasivní rehydratace po dobu 60 minut, přičemž vzorek pasivně přechází do proužku gelu za bezproudového stavu. Poté se strip převrství minerálním olejem, aby při tzv. aktivní hydrataci nedocházelo k jeho vysoušení. Druhá fáze hydratace (aktivní) pobíhá za průchodu proudu, který umožňuje lepší vstup vysokomolekulárních proteinů do IPG stripu. U aktivní hydratace se nastavují různé hodnoty napětí a času podle pH rozmezí použitého IPG stripu [13].



Obr. 2 – vlevo: Umístění IPG stripu na fokusační destičku [13]

Obr. 3 – vpravo: Zařízení pro IEF (Protean IEF Cell, Bio-Rad) [14]

Při nanášení vzorku proteinů na IPG strip o vysoké molekulové hmotnosti ( $M_r > 150$  kDa), velmi alkalických ( $\text{pH} > 8$ ) či hydrofobních proteinů může docházet k obtížím při vstřebávání do gelu. U IPG stripů nad  $\text{pH} 7$  se může kvůli vyčerpání DTT objevit na konci gelu horizontální pruhování. Tomu lze předejít stabilizací cysteinů v podobě směsi sulfidů aplikací hydroxyethyl-disulfidového (HED) roztoku coby rehydratačního činidla místo redukčního činidla. HED také zlepšuje zřetelnost spotů

a reprodukovatelnost výsledků. Bílkoviny s vysokou  $M_r$  a velmi alkalické proteiny lépe přejdou do gelu, pokud se během pasivní rehydratace aplikuje pouze rehydratační pufr a vzorek se nanáší až před IEF – metoda *cup loading* [11].

### 3.2.1.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného

První postup metody SDS-PAGE popsal Laemmli v roce 1970 při studii proteinových genů v hlavičce bakteriofága T4 [15]. Kontinuálním dělením v gelu obsahujícím 10% akrylamid za přítomnosti SDS bylo odhaleno celkem 28 proteinů, které se dělily podle své relativní molekulové hmotnosti. Buňky infikované T4 bakteriofágem byly pulzně označeny radioaktivními aminokyselinami v krátkých intervalech (po 1 minutě), modifikace různých proteinů byly pak detekovány autoradiograficky a analyzovány v SDS gelech [15].

Mezi faktory, které ovlivňují migraci proteinů při SDS-PAGE, patří intenzita elektrického pole, relativní hydrofobnost proteinů, velikost a tvar molekul, iontová síla a teplota elektroforetického pufru (nejlépe 20 °C) [7].

Standardní matricí bývá homogenní vrstva gelu s 12,5% T (celkový akrylamid) a 2,6% C (bis-akrylamid pro zesílení gelu). Některé aplikace vyžadují optimální roztoky s nižším % T pro separaci vysokomolekulárních proteinů nebo s vyšším % T vhodném pro separaci nízkomolekulárních proteinů. Elektroforézu lze provádět (častěji používané) ve vertikálních nastaveních v kazetách mezi skleněnými deskami nebo na horizontálních plochých systémech. Horizontální uspořádání šetří spotřebu činidel a umožňuje snadnou manipulaci. Silnější gely mají lepší mechanickou odolnost, avšak spoty se zde pomocí barviv obtížněji detekují. Takovéto gely též přispívají k větším ztrátám a spotřebě vzorku během analýzy – trpí vyšším šumem pozadí v případě následného použití hmotnostní spektrometrie. Proto se doporučuje tloušťka gelu mezi 0,5 mm a 1,5 mm [11].

### 3.2.1.3 Vizualizace gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue

Po skončení SDS-PAGE se separované proteiny obarví vhodným barvivem. Často používanou metodou vizualizace je barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue, protože

se jedná o kvantitativní barvicí postup, který je navíc vhodný pro následnou analýzu peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Původně se používalo citlivější barvení stříbrem, jenže toto detekování není dostatečně kompatibilní pro hmotnostní analýzy. Jinou, modernější alternativou mohou být fluorescenční barviva pod názvem *CyDye* (kyanidová barviva) nebo *SYPRO Ruby* na bázi ruthenia. Dále se nabízí možnost reverzního barvení, které využívá faktu, že kovové ionty vázané na proteiny (např.  $K^+$ ,  $Cu^{2+}$  nebo  $Zn^{2+}$ ) migrují pomaleji než v podobě volných solí bez přítomnosti bílkovin. Radioaktivní značení začleňováním izotopů do bílkovin je v dnešní době potlačováno alternativními a bezpečnějšími barvicími postupy uvedenými výše [7, 9].

Výběr vhodného barviva se volí na základě šířky lineárního dynamického rozsahu detekce, detekčního limitu, reprodukovatelnosti spotů a kompatibility s analýzou pomocí MS [9].

Před identifikací se jednotlivé proteiny, přítomné v gelu, vyříznou. Poté se proteiny štěpí proteolytickým enzymem, nejčastěji trypsinem, čímž se získají jednotlivé peptidy, které se analyzují MS. Trypsin štěpí sekvence aminokyselin v bílkovinách za lysinem a argininem, nenásleduje-li prolin. Štěpení probíhá uvnitř řetězce (jedná se o endopeptidázu). Finální výsledky se získávají pomocí speciálního softwaru, který porovnává naměřená hmotnostní spektra s databázemi.

### 3.2.2 Analýza a identifikace bílkovin

Po vizualizaci spotů jsou 2-DE gely naskenovány a analyzovány pomocí speciálního softwaru. Mezi běžně používané softwary patří *DeCyder*, *ProFinder*, *Phoretix 2D Advanced*, *Melanie 4*, *PDQuest* a *ImageMaster 2D Elite* [7].

Hmotnostní spektrometrie zvýšila použitelnost proteomických technologií díky vývoji ionizace elektrosprejem (ESI) a nových hmotnostních analyzátorů s jejich stále vzrůstající citlivostí. Hmotnostní spektrometrie nahradila tzv. Edmandovo odbourávání pro identifikaci sekvencí aminokyselin a používá se pro určení typu i umístění posttranslačních modifikací proteinů a peptidů. *Peptide mass fingerprinting* (PMF) a kapalinná chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) se běžně používají pro identifikaci proteinů na dvourozměrných proteomických modelech. Úspěšnost MS identifikací proteinů se v současnosti zvýšila na asi 80 %. PMF nefunguje dobře, pokud nejsou genomy některých organismů plně sekvenovány,

pokud bílkoviny určené k identifikaci obsahují labilní posttranslační modifikace jako např. glykosylaci nebo sulfataci (nemusí si tudíž odpovídat s nemodifikovaným proteinem v databázi), anebo pokud se několik různých proteinů překrývá navzájem v jednom spotu na gelu [7, 9].

Štěpení proteinů izolovaných v gelu po elektroforéze je nezbytným předpokladem úspěšného provedení MS identifikace proteinů. V roce 1996 kolektiv A. Shevchenka popsal návod, který optimalizoval zvýšení rychlosti a citlivosti detekce spotů nativních bílkovin [16]. Návod se týkal štěpení v gelu proteinových spotů barvených stříbrem nebo Coomassie Blue, které bylo následováno *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* (MALDI-MS) nebo LC-MS/MS analýzou s citlivostí detekce řádově na úrovni femtomolů (1 fmol) proteinu výchozího materiálu [16].

Identifikace proteinů v polyakrylamidovém gelu nabízí několik důležitých předností pro proteomiku na rozdíl od metod bez použití gelu jako matrice. Gel usnadňuje bezpečnou manipulaci, derivatizaci proteinů chemickými reakcemi a archivaci dokonce i femtomolárního množství proteinů. Sekvenování ostře oddělených pruhů podle relativní molekulové hmotnosti ( $M_r$ ) zvyšuje dynamický rozsah analýzy proteinových směsí. Použitím gelové elektroforézy lze zároveň s výhodou odstranit nízkomolekulární nečistoty, včetně detergentů a složek pufrů, které mohou vadit během analýzy vzorku hmotnostní spektrometrií [16].

### 3.2.3 Metoda podle Bradfordové

Stanovení celkového proteinu zahrnuje barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue. Barvení tímto barvivem způsobuje posun absorpčního maxima proteinů z 365 nm na 595 nm. Nárůst absorpce při 595 nm umožňuje stanovit protein spektrofotometricky ve VIS oblasti pomocí spektrometru nebo readeru. Metoda je reproduktivní a rychlá (hotová asi za 2 minuty) s hodinovou stabilitou zbarvení modrých komplexů. Nehrozí zde žádné interference kationtů ani sacharidů. První zmínka o této metodě pochází z roku 1976 od Marion M. Bradfordové [17].

# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Použité přístroje a materiál

### 4.1.1 Přístroje

- centrifuga s vakuovou pumpou (Vacufuge Speed Vac, Eppendorf, Německo)
- termostatový inkubátor s třepačkou (Mixing Block MB – 102, BIOER, Čína)
- lyofilizátor (Laboratory Freeze Dryers ALPHA 1 – 2/LD plus, Christ, Německo)
- sonikační lázeň (Elmasonic S Ultrasonic cleaning units, Elma, Německo)
- spektrofotometrický reader (Versa Max Elisa Microplate Reader s programem spektrofotometrického měření SoftMax<sup>®</sup> Pro Software, Molecular Devices, USA)
- aparatura na SDS-PAGE (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell, Bio-Rad, USA)
- zařízení pro IEF (Protean IEF Cell, Bio-Rad, USA)
- skener (GS – 800<sup>TM</sup> Calibrated Densitometer, Bio-Rad, USA) vybavený se softwarem pro analýzu gelů Quantity One<sup>®</sup> 4.6.8 (Bio-Rad, USA) a PDQuest Advanced 8.0.1 (Bio-Rad, USA)
- nanokapalinový chromatograf (Proxeon Easy nLC, Proxeon, Dánsko) připojený k tandemovému hmotnostnímu spektrometru Maxis (ESI-Q-TOF - ElectroSpray Ionization Quadrupole Time of Flight, Bruker Daltonics, Německo) a vybavený ovládacím softwarem HyStar 3.2 (Bruker Daltonics) a micrOTOF 3.0 (Bruker Daltonics). Naměřená data byla sbírána a zpracována softwarem DataAnalysis 4.0 a ProteinScape 2.0 (Bruker Daltonics) připojeným k serveru MASCOT (Matrix Science, Velká Británie).

### 4.1.2 Chemikálie

Kapalný dusík, guanidin, TEMED (N, N, N', N' – tetramethylethylendiamin), močovina, thiomčovina, glycerol, EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové), azid sodný, DTT (dithiothreitol), Tris (tris(hydroxy-methyl)aminomethan), kyselina chlorovodíková, denaturovaný ethanol, hydroxid sodný, jodacetamid, akrylamid, N', N' – bis-methylen-akrylamid, 2 – merkaptoethanol,

peroxidisíran amonný (APS), dodecylsíran sodný (SDS), agaróza, acetonitril, glycin, uhličitan amonný, trypsin, hydrogenuhličitan amonný, kyselina mravenčí. Rozpouštědlo: redestilovaná voda. Čistota všech jmenovaných chemikálií byla nejméně p. a.

#### 4.1.3 Kity

Tablety s proteázovými inhibitory (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete, Roche, Švýcarsko), bromfenolová modř (Bio-Rad), minerální olej (Bio-Rad), barvivo Bio-Safe™ Coomassie (Bio-Rad), standard hovězího sérového albuminu (Bovine Serum Albumin, 2 mg/ml, Bio-Rad), směs standardů bílkovin pro SDS-PAGE (Precision Plus Protein™ All Blue Standards/Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad).

#### 4.1.4 Roztoky

- guanidinový pufr (6 M guanidin, 1,2 M Tris-HCl, 2,5 M EDTA, 1% azid sodný s antibakteriálním účinkem, přidána půlka tablety s koktejlem inhibitorů proteáz na 25 ml pufru, pH 8,4)
- EDTA-pufr (0,6 M EDTA, pH 8,0)
- 1 M DTT
- 1 M jodacetamid
- 10% APS
- 10% SDS
- 10× elektrodový pufr na SDS-PAGE (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS)
- gelový pufr (1,5 M Tris-HCl, 8,8)
- 30% akrylamid-bis (akrylamid, N', N' – bis-methylen-akrylamid)
- SDS-PAGE redukující pufr (0,5 M Tris-HCl o pH 6,8; glycerol, 10% SDS, 0,5% bromfenolová modř)
- agarosový pufr (0,5% agarosa v 25 mM Tris, 192 mM glycinu a 0,1% SDS, pH 8,3 se stopami bromfenolové modři)

- lyzační pufr (7 M močovina, 2 M thiomčovina, 4 % CHAPS, 0,6% Bio-Lyte<sup>®</sup> 3/10 amfolyty, 1% DTT)
- ekvilibrační pufr I (0,375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 6 M močovina, 20% glycerol, 2% SDS, stopa bromfenolové modři, 2% DTT)
- ekvilibrační pufr II (0,375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 6 M močovina, 20% glycerol, 2% SDS, stopa bromfenolové modři, 4% jodacetamid)
- odbarvovací roztok (0,1 M uhličitan amonný a acetonitril (1 : 1) + 100% acetonitril)
- roztok trypsinu na štěpení proteinů v gelu (0,013 mg · ml<sup>-1</sup> trypsin, 10 M hydrogenuhličitan amonný)
- extrakční pufr (5% kyselina mravenčí a 100% acetonitril; 1 : 2)

#### 4.1.5 Vzorky

K experimentům bylo použito 5 zubů moudrosti bez kazu, které byly z ortodontických důvodů preventivně odebrány pacientům na zubní klinice. Z etických důvodů pacienti předem podepsali informovaný souhlas s anonymním odebráním vzorků k výzkumným účelům. Zuby byly poté zpracovány na pracovišti v FgÚ AV ČR. Všichni jedinci byli muži ve věku 31 let. Celková váha všech zubů byla 8,70 g.

## 4.2 Použité metody

### 4.2.1 Preanalytická část

Nejprve bylo nutné vzorky zubů důkladně omýt pod proudem vody či pod hladinou vody v kádince a zbavit všech měkkých tkání špachtličkou nebo skalpelem. Vrstvička cementu na kořeni byla též oškrábána skalpelem. Poté byl diamantovým pilníkem značky *Narex* obroušen a uhlazen povrch kořene, čímž se zároveň odstranily poslední zbytky cementu.

Stejným pilníkem byl zub naříznut na rozmezí mezi korunkou a kořenem ze všech stran co nejvíce hluboko (cca do  $\frac{1}{3}$  tloušťky). Obklopený alobalem (aby se zamezilo případným ztrátám vzorku) byl zub púlen za pomoci dláta, přiloženým na naříznutou část zubu a úderem kladiva. Tím byl zub rozpúlen na dvě části: korunku (obsahující sklovinu a dentin) a kořen (obsahující dentin a dřeň). V dalších krocích byl zpracováván pouze kořen.

Potom bylo nutno oddělit dřeň, obsahující velké množství krevních proteinů, od dentinu. Postup byl následující: před zahájením tohoto kroku byly zuby důkladně omyty v destilované vodě. Každý zub byl zvlášt' zabalen z obou dvou stran dvěma vrstvami alobalu a umístěn mezi čelisti svěráku. Čelisti byly pomalu utahovány, dokud se neozval zvuk prasknutí, kdy se právě zub podařilo rozdrtit na malé části. Úlomky zubu byly shromažd'ovány do mikrozkuavek. Čistou pinzetou se odebírala dřeň žluto-červené barvy zvlášt' do jiné mikrozkuavky a byla uchována při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro jiné studie.

Všechny kousky čistého dentinu z kořene byly nadrceny na jemný prášek v třecí misce s tloučkem zalité v tekutém dusíku, aby dentin zkřehl a lépe se drtil. Miska byla během práce přikrytá alobalem a pouze uprostřed byl otvor pro tlouček. Tím se minimalizovalo riziko ztrát vzorku během drcení. Získaný bílý prášek vážil 3,14 g. Jednalo se však o „mokrú váhu“, protože kvůli zchlazení tekutým dusíkem tento prášek pohlcoval do sebe vzdušnou vlhkost. Pro odstranění vlhkosti vzorku byl prášek přes noc lyofilizován. Konečná váha po lyofilizaci byla 2,43 g.

#### 4.2.1.1 Zisk G-extraktu dentinu

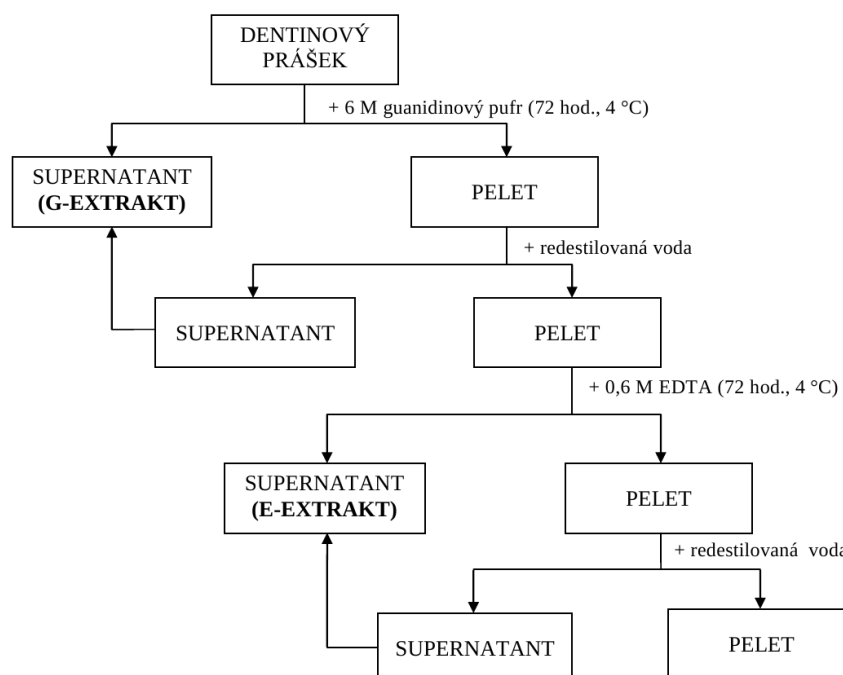
Bylo připraveno dostatečné množství guanidinového pufru (na 1 g dentinového prášku bylo zapotřebí 2,5 ml guanidinového pufru, pH 8,4). Po úpravě pH bylo pipetováno 250  $\mu$ l 1% azidu sodného s baktericidním účinkem. Proti rozkladu bílkovin ve vzorku byla do pufru přidána půlka tablety s koktejlem inhibitorů proteas Protease Inhibitor Cocktail Tablets, dodávanou komerčně (1 tableta na 50 ml pufru).

Bylo odměřeno potřebné množství guanidinového pufru (6,25 ml) na navážku dentinového prášku (2,43 g). Následovala 72-hodinová extrakce roztoku dentinu v chladárně při 4 °C za stálého míchání míchadélkem na magnetické míchače. Po ukončení extrakce byla suspenze rozdělena do mikrozkušavek, neboť dalším krokem byla centrifugace (1000 g, 15 minut), aby se oddělil supernatant od peletu. Odpipetován byl vždy jen supernatant, který byl shromažďován do zkumavky. V 0,5 ml redestilované vody byl znovu resuspendován pelet a následovala tatáž centrifugace, přičemž byl postup zopakován. Oba vodné supernatanty byly spojeny, čímž byl získán „G-extrakt“. Zbylý pelet dentinové suspenze se použil na extrakci EDTA pufrům.

Celkový objem G-extraktu činil 9 ml, proteiny v extraktu byly posléze redukovány přídatkem 450  $\mu$ l 1 M DTT a roztok byl zahříván na 37 °C po dobu 30 minut na třepače. Po 30-ti minutách byla provedena alkylace inkubací roztoku s 1080  $\mu$ l 1 M jodacetamidu po dobu 40 minut při pokojové teplotě v temnu. Poté byla alkylace zastavena přídatkem polovičního množství 1M DTT, tj. 225  $\mu$ l.

#### 4.2.1.2 Zisk E-extraktu dentinu

Pelet byl resuspendován a demineralizován v 15,15 ml 0,6 M EDTA pufru (pH 8,0) po dobu 72 hodin při 4 °C za stálého míchání míchadélkem na magnetické míchače. Po centrifugaci (1000 g, 15 minut) byl supernatant oddělen, zbylý pelet znovu promyt v redestilované vodě a opět centrifugován. Spojením vodných supernatantů po opakované centrifugaci byl získán „E-extrakt“. Následovala redukce pomocí 1 M DTT a alkylace přídatkem 1 M jodacetamidu, kdy se postupovalo stejně jako u G-extraktu.



Obr. 4: Schéma postupu zpracování vzorku dentinu G- a E-extraktu [2]

Všechny vzorky (G- i E-extrakt) byly dialyzovány ve střívkách po dobu 36 hodin. Hypotonickým prostředím byla destilovaná voda (během dialýzy 3× vyměněná) ve velké kádince, hypertonické prostředí představoval vzorek dentinu a samovolnou difúzí byly vzorky zbaveny nadbytku solí. Poté byly vzorky lyofilizovány a výsledné preparáty byly skladovány při  $-80\text{ °C}$ .

#### 4.2.1.3 Kontrola čistoty extraktů

Po lyofilizaci byla pomocí SDS-PAGE kontrolována čistota extraktů, a také to, zda byla dialýza dostatečně účinná. Uspořádání SDS-PAGE elektroforézy bylo vertikální (deskové). Dělení proteinů bylo provedeno na 10% polyakrylamidovém gelu. Na 1 mg suchého vzorku dentinu jsem aplikovala 100  $\mu\text{l}$  SDS redukujícího pufru s přídatkem 2-merkptoethanolu, který má redukující účinky na disulfidické můstky cysteinů. Rozpuštěné vzorky byly zahřívány na termostátovém přístroji Mixing Block MB-102 ( $95\text{ °C}$ , 4 minuty) a po ochlazení dávkovány do jamek v horním gelu. Po ukončení elektroforézy byly gely 3× promyty v destilované vodě vždy po dobu 15 minut a inkubovány 24 hodin v barvicí lázni Bio-Safe Coomassie Brilliant Blue. U vzorku

s nízkým obsahem solí se po obarvení objevily zřetelné, nerozmazané proužky (bandy) proteinů (G-extrakt). V opačném případě byl vzorek znovu dialyzován a kontrolní procedura byla zopakována (E-extrakt).

## 4.2.2 Vlastní analýza

### 4.2.2.1 Stanovení proteinů ve vzorku

Koncentrace proteinu ve vzorku byla určena pomocí metody dle Bradfordové a použitím standardu sérového albuminu (Bio-Rad).

Postup: Na mikrotitrační destičku byl pipetován vzorek dentinu rozpuštěný zvlášť v 1% kyselině chlorovodíkové a ve 4 M močovíně tak, aby koncentrace vzorku v roztoku byla  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Tato rozpouštědla pro metodu Bradfordové jsou jednou z možných alternativ komerčně dodávaného reagentu (Quick Start Bradford 1× Dye Reagent, Bio-Rad). Při aplikaci byla věnována zvýšená pozornost tomu, aby se zamezilo vzniku vzduchových bublin, které mohou rušit spektrofotometrická měření v Elisa readeru. Navážka G-extraktu byla 0,64 mg a E-extraktu 1,06 mg. Celkový objem směsi v jedné jamce byl vždy 255  $\mu\text{l}$ .

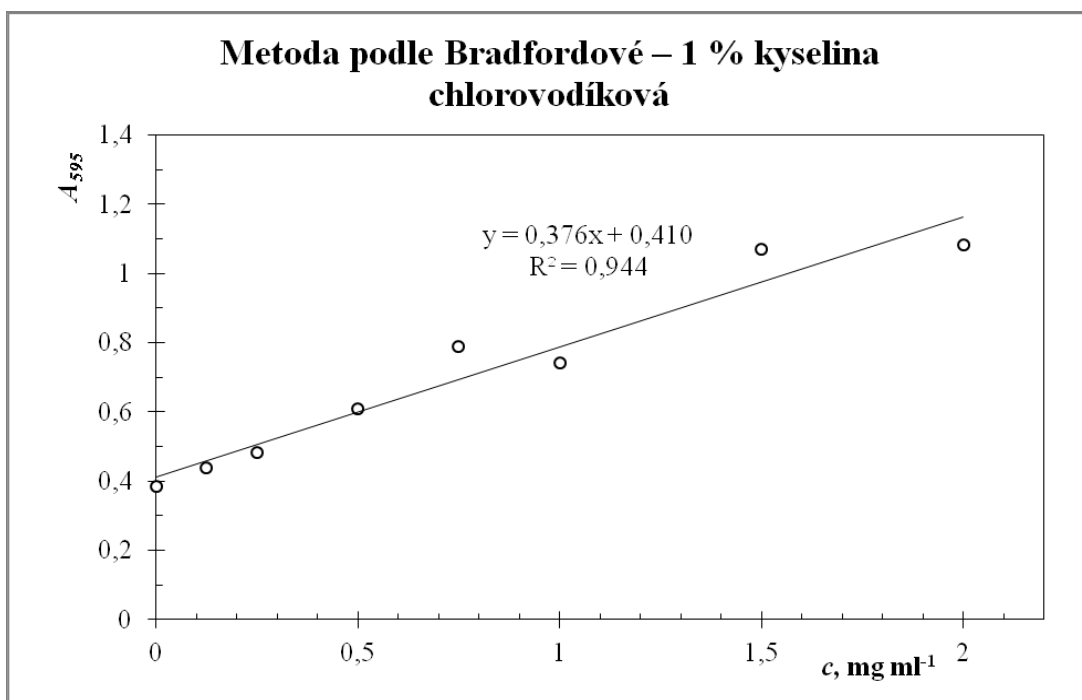
Tabulka 1: Kalibrační řada standardu hovězího sérového albuminu

BSA [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]	Aplikovaný objem BSA [ $\mu\text{l}$ ]
2,0	255
1,5	191
1,0	128
0,75	96
0,50	64
0,25	32
0,125	16
0 (blank)	–

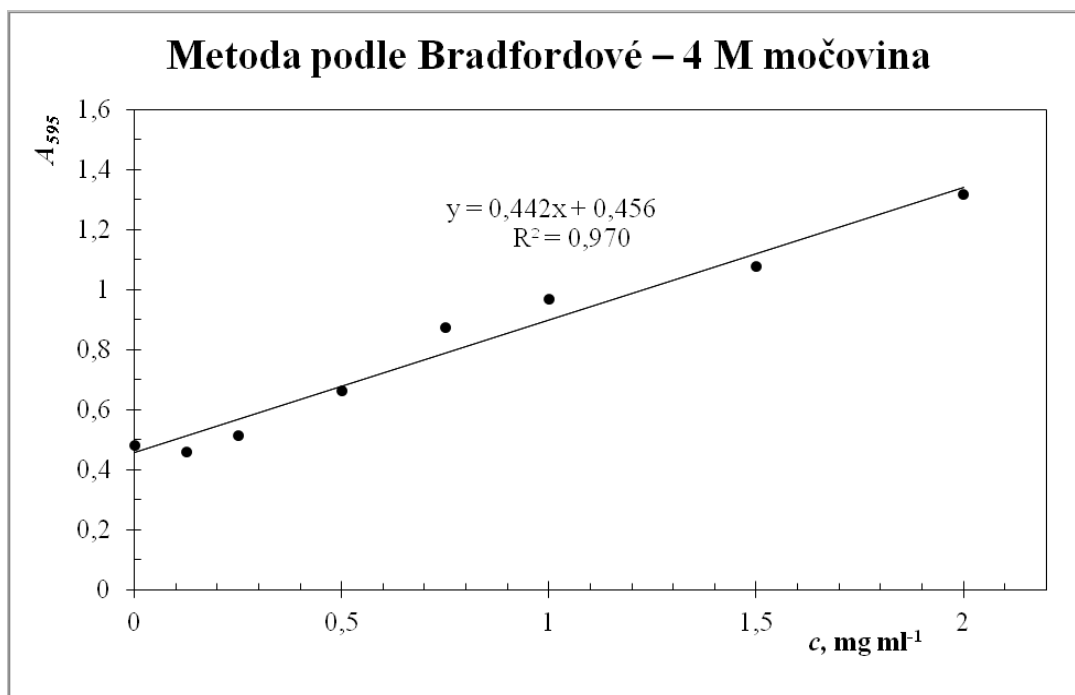
Tabulka 2: Pipetované množství G- a E-extraktu o koncentraci  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

G- extrakt [ $\mu\text{l}$ ]	E-extrakt [ $\mu\text{l}$ ]
5	5
10	10
20	20

Pro doplnění objemu standardů BSA i vzorků dentinu na  $255 \mu\text{l}$  byla jako rozpouštědlo použita buď 1% kyselina chlorovodíková anebo 4 M močovina. Poté se aplikovalo trifenylmethanové barvivo CBB G-250 za vzniku modrých komplexů v případě, že byla přítomná bílkovina. Vzorky byly změřeny při vlnové délce  $595 \text{ nm}$ , rychlosti detekce *slow* a teplotě měření  $26,8 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Obr. 5: Kalibrační přímka BSA v 1% kyselině chlorovodíkové



Obr. 6: Kalibrační přímka BSA ve 4 M močovine

#### 4.2.2.2 Optimalizace a použití 2-DE

Podle aplikovaného množství rozpuštěného suchého preparátu G- i E-extraktu při pH 3 – 10 s nelineárním rozsahem (non-linear, NL) byla optimalizována 2-DE. Porovnávaly se hotové 2-DE gely s odlišnou navázkou vzorku (0,5 mg a 1,0 mg).

Zbývající použité IPG stripy (7 cm) měly rozmezí pH:

3 – 6	3,9 – 5,1
4 – 7	4,7 – 5,9
5 – 8	5,5 – 6,7
7 – 10	6,3 – 8,3

Postup: Suchý vzorek G-extraktu byl rozpuštěn ve 130  $\mu$ l lyzačního pufru. Na fokusační destičku jsem nanasla rozpuštěný vzorek o objemu 125  $\mu$ l a poté na to položila IPG strip gelem dolů. Bylo třeba dávat pozor, aby se pod gelem nezachytily vzduchové bublinky.

Tabulka 3: Navážky suchých vzorků dentinu pro jednotlivé IPG stripy

<b>pH 3 – 6</b>	1,08 mg	<b>pH 3,9 – 5,1</b>	1,09 mg
<b>pH 4 – 7</b>	1,00 mg	<b>pH 4,7 – 5,9</b>	1,00 mg
<b>pH 5 – 8</b>	1,02 mg	<b>pH 5,5 – 6,7</b>	1,22 mg
<b>pH 7 – 10</b>	1,05 mg	<b>pH 6,3 – 8,3</b>	1,00 mg

Nejprve byla spuštěna pasivní rehydratace (za bezproudového stavu, 60 minut) na přístroji Protean IEF Cell (Bio-Rad), aby gel nabobtnal. Po hodině byl gel se vzorkem převrstven 800  $\mu$ l minerálního oleje a 12 hodin aktivně rehydratován při 50 V v rehydratačním pufru na stejném zařízení pro IEF. Následná IEF fokusace probíhala při maximálním napětí 4000 V, maximálním proudem 50  $\mu$ A na 1 strip a doba fokusace závisela na počtu nastavených Volt-hodin, potřebných pro správnou IEF fokusaci konkrétního IPG stripu (Tabulky 4 – 7).

Tabulka 4: Podmínky IEF pro IPG stripy (7 cm) o pH 3 – 10 NL; 3 – 6; 4 – 7; 5 – 8

	<b>Nastavené hodnoty a podmínky</b>
<b>Krok č. 1</b>	50 V, 12 hodin, <i>rapid</i> 250 V, 15 minut, <i>rapid</i>
<b>Krok č. 2</b>	4000 V, 2 hodiny, <i>rapid</i>
<b>Krok č. 3</b>	20000 V $\cdot$ h <sup>-1</sup>
<b>Teplota</b>	20 °C

Tabulka 5: Podmínky IEF pro IPG stripy (7 cm) o pH 7 – 10

	<b>Nastavené hodnoty a podmínky</b>
<b>Krok č. 1</b>	50 V, 12 hodin, <i>rapid</i> 250 V, 15 minut, <i>rapid</i>
<b>Krok č. 2</b>	4000 V, 2 hodiny, <i>rapid</i>
<b>Krok č. 3</b>	25000 V $\cdot$ h <sup>-1</sup>
<b>Teplota</b>	20 °C

Tabulka 6: Podmínky IEF pro IPG stripy (7 cm) o pH 3,9 – 5,1; 4,7 – 5,9

	<b>Nastavené hodnoty a podmínky</b>
<b>Krok č. 1</b>	50 V, 12 hodin, <i>rapid</i> 250 V, 15 minut, <i>rapid</i>
<b>Krok č. 2</b>	4000 V, 2 hodiny, <i>slow</i>
<b>Krok č. 3</b>	26000 V · h <sup>-1</sup>
<b>Teplota</b>	20 °C

Tabulka 7: Podmínky IEF pro IPG stripy (7 cm) o pH 5,5 – 6,7; 6,3 – 8,3

	<b>Nastavené hodnoty a podmínky</b>
<b>Krok č. 1</b>	50 V, 12 hodin, <i>rapid</i> 250 V, 15 minut, <i>rapid</i>
<b>Krok č. 2</b>	4000 V, 1 hodina, <i>slow</i>
<b>Krok č. 3</b>	35000 V · h <sup>-1</sup>
<b>Teplota</b>	20 °C

Po ukončení IEF byl IPG strip přenesen na destičku se žlábkou, otočený gelem nahoru. Následovala ekvilibrace stripu převrstvením 1 ml ekvilibračního pufru I a strip byl třepán po dobu 10 minut. Ekvilibrační pufr I byl následně vylit a strip převrstven 1 ml ekvilibračního pufru II a opět 10 minut třepán. Takto hotový strip byl připraven k použití pro 2. rozměr 2-DE (SDS-PAGE).

Polyakrylamidový gel (12,5%) byl připraven smícháním 6,5 ml redestilované vody + 8,3 ml 30% akrylamid-bis + 5,0 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 + 0,2 ml 10% SDS + 10 µl TEMED + 100 µl 10% APS, a nalit do skleněných desek. Na nalitý gel bylo pipetováno malé množství denaturovaného ethanolu, který udržuje hladinu gelu rovnou a brání přístupu vzduchu, čímž gel lépe polymeruje. Po zpolymerování PAGE gelu byl ethanol vylit a gel 3× promyt redestilovanou vodou. Mezitím jsem si připravila elektrodový pufr ze zásobního roztoku (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS), který byl ředěn redestilovanou vodou v poměru 1 : 9 (100 ml 10× elektrodového pufru a 900 ml redestilované vody).

IPG strip, propláchnutý v elektrodovém pufru, byl položen na polyakrylamidový gel a zalit rozehřátou agarosou. Pak do ní byla vložena špička od hřebenu, určenému k tvorbě jamek v gelu. Po ztuhnutí agarózy byl do jamky aplikován komerčně dodávaný standard směsi bílkovin (objem cca 7  $\mu$ l). Elektroforetické napětí bylo nastaveno prvních 5 minut na 50 V, kvůli lepšímu fokusování proteinů na vstupu do gelu. Dalších 50 minut elektroforéza pokračovala při 200 V, dokud čelo bromfenolové modři nepostoupilo až na konec gelu. Aparatura pro SDS-PAGE byla během procesu temperována ve vodní lázni s ledem na cca 20 °C, aby nedošlo k přehřátí elektrodového pufru. Po ukončení separace bílkovin byl gel 3 $\times$  promyt redestilovanou vodou na třepačce (15 minut). Nakonec byl vložen do barvicí lázně s CBB přes noc.

#### 4.2.2.3 Skenování gelů

Pomocí skeneru GS – 800<sup>TM</sup> od společnosti Bio-Rad byly pořízeny obrázky 2-DE gelů. Za použití softwaru Quantity One<sup>®</sup> 4.6.8 (Bio-Rad, USA) byly všechny oskenované gely upraveny (úprava intenzity odstínů, oříznutí snímků, převedení obrázku na univerzální formát .jpeg, atd.). Softwarem PDQuest Advaced 8.0.1 (Bio-Rad, USA) byly identifikovány jednotlivé spoty na gelu. Program nejprve provedl automatické odečtení pozadí a detekci spotů na jednotlivých gelech. Následně bylo provedeno srovnání a přiřazení spotů na jednotlivých gelech. Protože tyto kroky nebyly vždy zcela správně provedeny programem, musely se u některých přiřazení spotů provést manuální úpravy.

#### 4.2.2.4 Vyřezávání spotů z gelu a jejich další zpracování

Vybrané intenzivní spoty určené k identifikaci proteinů pomocí nLC-MS/MS (např. obr. 7) jsem vyřízla z gelu za pomoci špiček určených do automatické pipety. Pracovala jsem na skle podloženém bílým papírem, aby spoty byly lépe rozpoznatelné, a každý výřez jsem přenášela do mikrozkuřavky.



Obr. 7: Vybrané spoty (celkem 18) k identifikaci nLC-MS/MS u 2-DE gelu (pH 4 – 7)

Pro odbarvení spotů bylo do každé mikrozkušavky s kouskem gelu aplikováno 100  $\mu\text{l}$  odbarvovacího roztoku a třepáno po dobu 30 – 60 minut (dokud nevytizelo modré barvivo CBB). Poté bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  100% acetonitrilu a třepáno 15 minut. Po dehydrataci kousků gelu byly výřezy v otevřených mikrozkušavkách dosušeny ve vakuovém koncentrátoru (1000 g, 20 minut).

#### 4.2.2.5 Štěpení bílkovin trypsinem

Vzhledem k tomu, že nelze přesně navázat na analytických vahách velmi malé potřebné množství trypsinu, byl předem připraven 100 $\times$  koncentrovanější roztok trypsinu. Trypsinový roztok o potřebné koncentraci byl získán ředěním tohoto roztoku v poměru 1 : 99 (50,5  $\mu\text{l}$  100 $\times$  konc. roztoku trypsinu + 5 ml redestilované vody) tak, aby koncentrace trypsinu byla 0,013  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Roztok hydrogenuhličitanu amonného o koncentraci 10 mM byl použit jako vhodný pufr o pufrací kapacitě při pH  $\sim$  8, nejlépe vyhovující pro štěpení proteinů trypsinem.

K odbarveným a vysušeným výřezům gelů bylo pipetováno 20  $\mu\text{l}$  štěpícího roztoku trypsinu. Suché gely byly nabobtnány trypsinovým roztokem v chladničce po dobu 30 minut. Nabobtnané gely byly inkubovány a třepány ve vodní lázni při 37  $^{\circ}\text{C}$  přes noc.

#### 4.2.2.6 Příprava vzorků dentinu pro analýzu nLC-MS/MS

Peptidy z gelu byly extrahovány přidavkem 200  $\mu\text{l}$  extrakčního pufru za inkubace v ultrazvukové vodní (sonikační) lázni (37 °C, 15 minut). Vzniklý extrakt nad gelem byl odebrán do mikrozkuřavky. Extrakce byla ještě jednou zopakována s 200  $\mu\text{l}$  extrakčního pufru, po které byl druhý extrakt spojen s předchozím. Následovalo zamražení extraktů a jejich lyofilizace.

Sloučené a vysušené extrakty peptidů byly znovu rozpuštěny ve 20  $\mu\text{l}$  1% kyseliny mravenčí a vloženy do sonikační lázně na 5 minut. Po rozpuštění byly vzorky centrifugovány (6,7 g; 15 minut), aby se případný kal usadil na dně. Mikrostríkačkou Hamilton bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  čirého extraktu bez usazeného kalu do insertu ve vialkách, uzavřených víčkem s teflonovou membránou. Takto byly připraveny vzorky pro analýzu nLC-MS/MS. Vzorky byly před analýzou uchovávány při – 80 °C.

#### 4.2.2.7 Analýza peptidů na nLC-MS/MS

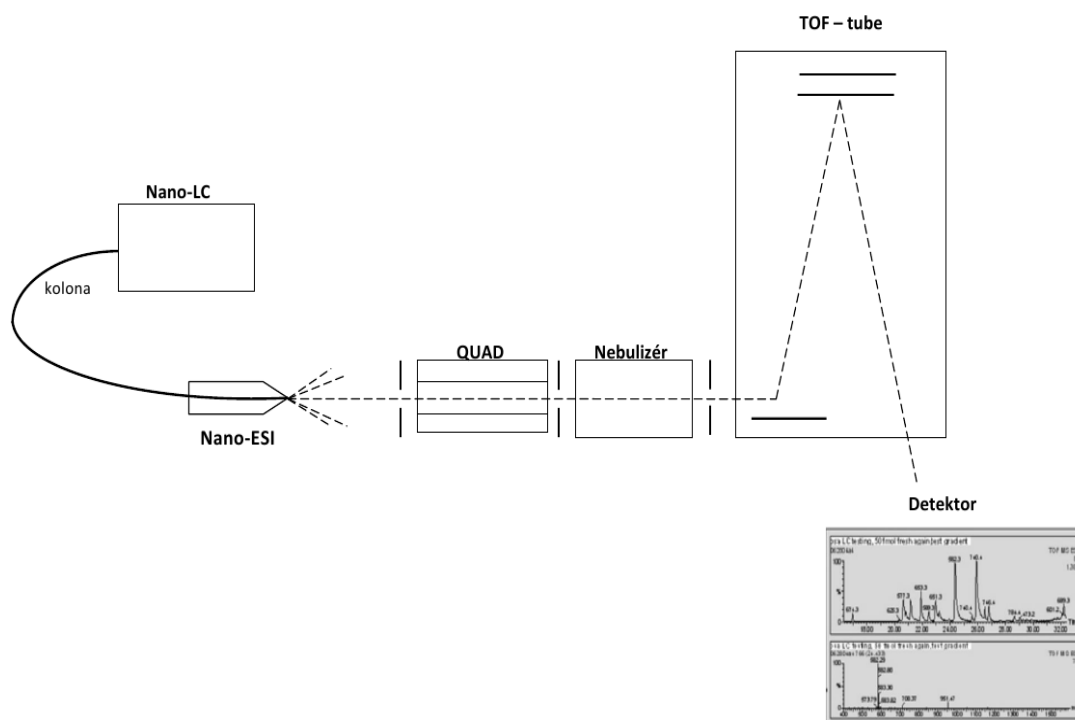
Separace peptidů byla provedena na nanokapalinovém chromatografu (Proxeon Easy nLC, Proxeon Odense, Dánsko) a jejich následné měření MS/MS spekter pomocí skloubeného ESI-Q-TOF (MaXis, Bruker Daltonics – obr. 10). Stacionární fázi představovala komerčně dodávaná kolona s Biosphere C18 (Nieuwkoop, Nizozemsko). Použitou mobilní fází byly A (redistilovaná voda s 0,1% kyselinou mravenčí) s B (acetonitril též s 0,1% kyselinou mravenčí).

Parametry měření pro nLC byly následující: průtoková rychlost 0,25  $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ ; teplota kolony 25 °C; délka kolony 150 mm; vnitřní průměr kolony 75  $\mu\text{m}$ ; aplikovaný objem vzorku 5  $\mu\text{l}$  a lineární gradient mezi mobilními fázemi A a B (zahájení separace 5 % mobilní fáze B, následovaná gradientovou elucí do 30 % B za 70 minut; poté další gradientová eluce do 50 % B po 10 minutách, pak gradient do 100 % B po 8 minutách; vymytí kolony 100 % B po dobu 2 minut).



Obr. 8: Kompletní sestava nLC-MS/MS (MaXis, Bruker Daltonics) [18]

Podmínky měření pro MS byly následující: napětí ESI +4,5 kV; ultrazvuk 1,3 Hz; vysoušecí plyn (dusík) o průtoku  $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ; teplota plynu  $160 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tlak nebulizéru 40 kPa; skenování látek o  $M_r$  100 – 2000  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ; referenční jednomocný iont  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{F}_{36}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}_3$  a analýza vzorků v dupletu.



Obr. 9: Schéma ESI-Q-TOF [19]

#### 4.2.2.8 Vyhodnocování MS spekter

Údaje o jednotlivých peptidech byly zpracovány a proteiny byly identifikovány za pomoci softwaru Data Analysis a ProteinScape 2.0. Proteiny byly rozpoznány na základě shody MS/MS spekter s dostupnými databázemi proteinů (IPI a SwissProt) za pomoci serveru MASCOT. Program ProteinScape ve výsledku informuje uživatele mimo jiné o kódu proteinu, kompletním názvu proteinu, relativní molekulové hmotnosti, hodnotě isoelektrického bodu nebo MASCOT skóre proteinu. Čím je vyšší MASCOT skóre proteinu, tím vyšší je pravděpodobnost detekce a identifikace proteinu (tzv. validita proteinu). Aby byl protein validní (platný), musí mít skóre alespoň 80 (u peptidů alespoň 20). Byly zvoleny tyto parametry vyhledávání: enzymovým parametrem byl zvolen trypsin, tolerance hmotnostní detekce byla nastavena na  $\pm 10$  ppm, taxonomie byla omezena pro *Homo sapiens*, bylo zvoleno rozpoznávání možných modifikací aminokyselin jako je karbamidomethylace cysteinu, hydroxylace lysinu a prolinu, oxidace methioninu. Náboj monoisotopického peptidu byl nastaven na 1+, 2+ a 3+, a pro odstranění falešně pozitivních výsledků byla vybrána volba *Peptide Decoy*.

## 5 Výsledky

### 5.1 Obsah proteinů ve vzorcích dentinu

Podle spektrofotometrického stanovení při 595 nm byly zjištěny absorbance vzorků v 1% kyselině chlorovodíkové a ve 4 M močovíně, které byly následně použity k výpočtu hmotnostního procenta proteinů ve vzorcích dentinu.

Tabulka 8: Výsledné absorbance vzorků dentinu

	1% kyselina chlorovodíková	4 M močovina
<b>G-extrakt (5 µl)</b>	0,396	0,567
<b>G-extrakt (10 µl)</b>	0,411	0,804
<b>G-extrakt (20 µl)</b>	0,405	1,091
<b>E-extrakt (5 µl)</b>	0,378	0,601
<b>E-extrakt (10 µl)</b>	0,400	0,843
<b>E-extrakt (20 µl)</b>	0,411	1,047

Regresní rovnici kalibrační přímky u 1% kyseliny chlorovodíkové nebylo možné použít, protože výsledkem byly záporné hodnoty koncentrací vzorků. Močovina rozpouští vzorky proteinů zřejmě lépe než kyselina chlorovodíková, a proto byla regresní rovnice 4 M močoviny použita k výpočtu koncentrace vzorků v hmotnostních procentech. U reakčních směsí s 10 µl a 20 µl vzorku byla provedena korekce objemu na 5 µl (výpočet Tabulka 9 – viz další strana).

Tabulka 9: Výsledné koncentrace vzorků dentinu

Objem vzorku ve směsi	G-extrakt	E-extrakt
5 $\mu\text{l}$	$0,567 = 0,442x + 0,456$ $\Rightarrow x = 0,251 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	$0,601 = 0,442x + 0,456$ $\Rightarrow x = 0,328 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
10 $\mu\text{l}$	$0,804 = 0,442x + 0,456$ $\Rightarrow x = \frac{0,787}{2}$ $x = 0,394 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	$0,843 = 0,442x + 0,456$ $\Rightarrow x = \frac{0,876}{2}$ $x = \mathbf{0,438 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}^*}$
20 $\mu\text{l}$	$1,091 = 0,442x + 0,456$ $\Rightarrow x = \frac{1,437}{4}$ $x = 0,359 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	$1,047 = 0,442x + 0,456$ $\Rightarrow x = \frac{1,337}{4}$ $x = 0,334 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

\* odlehlý výsledek - nezahrnut do výpočtu průměrné koncentrace proteinů ve vzorku

Dixonův test na odlehlé výsledky (hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ ):

$$Q \text{ pro vyloučení nejvyšší hodnoty ... } Q_{\text{MAX}} = \frac{(x_n - x_{n-1})}{(x_n - x_1)}$$

$$Q \text{ pro vyloučení nejnižší hodnoty ... } Q_{\text{MIN}} = \frac{(x_2 - x_1)}{(x_n - x_1)}$$

kritická hodnota pro  $n = 3$  ...  $Q_k = 0,941$

Tabulka 10: Test pro vyloučení maximální a minimální hodnoty měření

	$Q_{\text{MAX}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$	$Q_{\text{MIN}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$
<b>G-extrakt</b>	0,245	0,755
<b>E-extrakt</b>	0,945	0,042

Statistické zpracování výsledků:

$$\text{směrodatná odchylka ... } s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

$$\text{relativní směrodatná odchylka ... } s_r = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 [\%]$$

Tabulka 11: Statistické zpracování výsledků

	$\bar{x}$	s [mg · ml <sup>-1</sup> ]	s <sub>r</sub> [%]
<b>G-extrakt</b>	0,335	0,075	22,3
<b>E-extrakt</b>	0,331	0,004	1,28

G-extrakt:  $\bar{x} = (0,335 \pm 0,075) \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (n = 3; s<sub>r</sub> = 22,3 %)

5 mg · ml<sup>-1</sup> ..... 100 %

0,335 mg · ml<sup>-1</sup> ..... x %

$$x = 100 \cdot \frac{0,335}{5} = \underline{6,7 \%}$$

E-extrakt:  $\bar{x} = (0,331 \pm 0,004) \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (n = 3; s<sub>r</sub> = 1,28 %)

5 mg · ml<sup>-1</sup> ..... 100 %

0,331 mg · ml<sup>-1</sup> ..... x %

$$x = 100 \cdot \frac{0,331}{5} = \underline{6,6 \%}$$

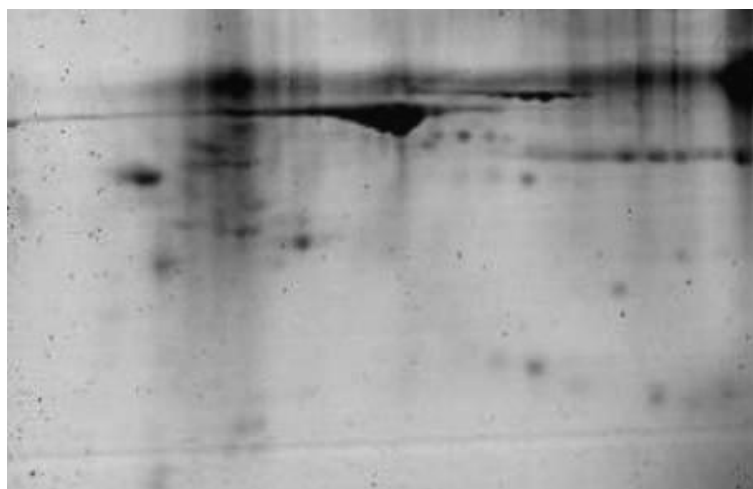
Podle stanovení celkového proteinu metodou podle Bradfordové a následného výpočtu obsahuje G-extrakt srovnatelné množství proteinů jako E-extrakt dentinu. Správnost a přesnost výsledku byla pouze u E-extraktu, výsledek u G-extraktu je sice správný, ale nepřesný (dáno vyšší hodnotou relativní směrodatné odchylky).

Vzhledem k tomu, že 2-DE gely E-extraktů obsahovaly podle pilotních pokusů nedokonale fokusované spoty kvůli velkému množství přítomných nežádoucích vápenatých iontů, byla optimalizace 2-DE analýzy nadále prováděna pouze s G-extraktem.

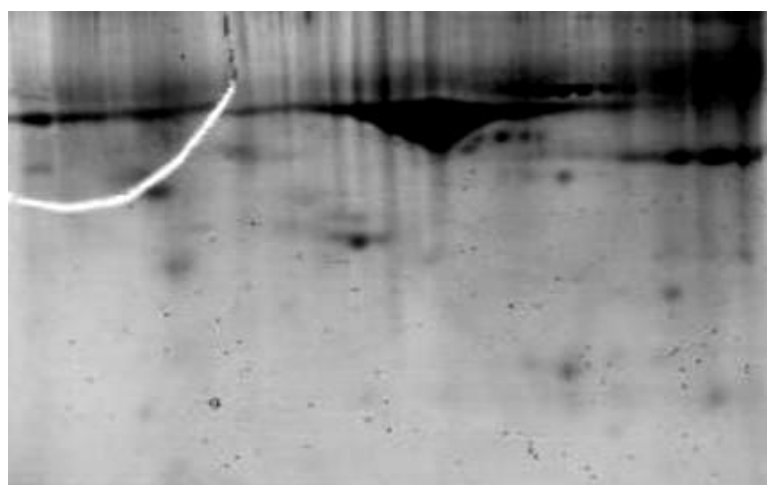
## 5. 2 Optimalizace množství vzorku pro 2-DE

Bylo navažováno 0,5 mg a 1,0 mg suchého vzorku dentinu. Obě dvě navážky byly rozpuštěny v lyzačním pufru a aplikovány na stripy s nejširším IPG gradientem (pH 3 – 10, NL). Podle předběžných výsledků byly nalezeny spoty u obou 2-DE gelů, avšak gel

s vyšším množstvím vzorku poskytl intenzivnější spoty. Tudíž na zbývajících IPG stripech (7 cm) byl dávkován rozpuštěný vzorek G-extraktu s navázkou 1,0 mg.



Obr. 9: Oskenovaný 2-DE gel s nižší navázkou (0,5 mg) suchého vzorku G-extraktu



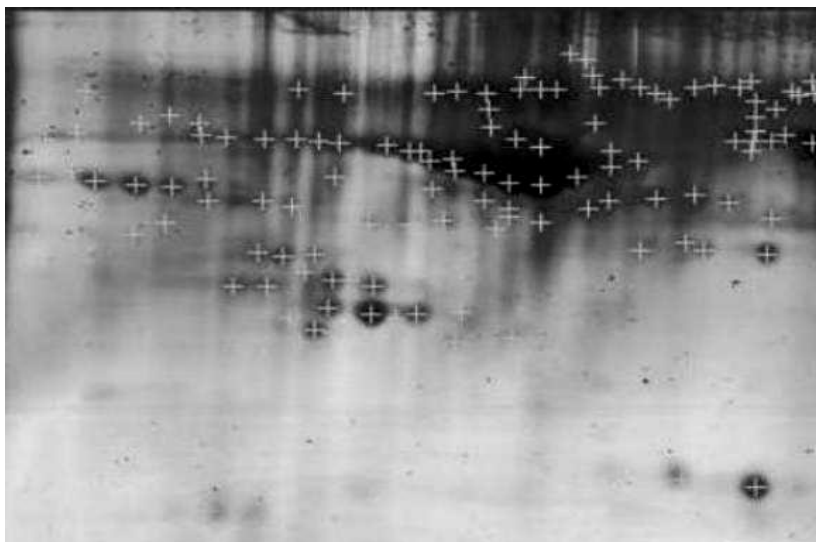
Obr. 10: Oskenovaný 2-DE gel s vyšší navázkou (1,0 mg) suchého vzorku G-extraktu

### 5.3 Kvantifikace spotů pomocí PDQuest 8.0.1

Pomocí programu PDQuest 8.0.1 byl zjištěn celkový počet detekovatelných spotů. Největší množství spotů automaticky detekovaných programem u gelu o pH 5 – 8 (Obr. 11 – viz další strana) činil celkem 147. Následující tabulka uvádí sečtené spoty programem po manuálních úpravách u ostatních reprodukovatelných 2-DE gelů (Tabulka 12 – viz další strana).

Tabulka 12: Počty spotů detekovaných automaticky PDQuestem 8.0.1 u vybraných 2-DE gelů

<b>pH 3 – 10, NL</b>	104 spotů
<b>pH 4 – 7</b>	75 spotů
<b>pH 5 – 8</b>	147 spotů
<b>pH 7 – 10</b>	54 spotů



Obr. 11: 2-DE gel (pH 5 – 8) s vyznačenými všemi spoty bílkovin

#### 5.4 Spoty určené k identifikaci

U IPG stripů s pH rozmezí 3 – 6; 3,9 – 5,1; 4,7 – 5,9; 5,5 – 6,7 a 6,3 – 8,3 se bohužel nepodařilo reprodukovat dobré výsledky. Na těchto gelech nebylo možné nalézt dobře rozlišené spoty vhodné k identifikaci a kromě toho, přítomné vertikální pruhy zhoršily detekci případných přítomných spotů. Zdrojem chyb mohou být buď manuální nedbalost během postupu 2-DE anebo rušivé vlivy zbytků solí ve vzorku, které nevedly u stripů s širšími oblastmi pH. Stripy s úzkým IPG gradientem jsou pravděpodobně citlivější na nečistoty ve vzorku na rozdíl od širšího IPG gradientu, proto je nezbytné pracovat co nejpečlivěji.

Gely o pH 3 – 10, NL; 4 – 7; 5 – 8 a 7 – 10 byly porovnávány, detekovatelné spoty vyříznuty a proteiny v nich byly identifikovány na nLC-MS/MS.

Tabulka 13: Počet vyřiznutých spotů u jednotlivých IPG stripů a parametry identifikace

Rozsah pH	3 – 10, NL	4 – 7	5 – 8	7 – 10
Počet spotů	19	18	25	9

Největší celkový počet spotů byl vyřiznut u gelu 5 – 8 (25 spotů) a u gelu 3 – 10, NL s 19 vyřiznutými spoty. Zde byly spoty u obou gelů zřetelné a snadno rozpoznatelné lidským okem. U gelu 4 – 7 bylo 18 vyřiznutých spotů, ale jejich ostrost byla o něco horší ve srovnání s předchozími gely (způsobené rušivými solemi). Nejméně vybraných spotů k identifikaci bylo u gelu 7 – 10 (9 spotů).

### 5.5 Identifikované proteiny nLC-MS/MS

V tabulkách uvedených níže jsou vyjmenovány pouze lidské proteiny, nalezené ve vzorcích dentinu. Jednotlivé proteiny v jednom vzorku jsou seřazeny podle jejich MASCOT skóre. Pokud objevený protein nebyl lidského původu anebo byly detekovány pouze peptidy patřící enzymu trypsinu, nejsou v tabulce uvedeny.

Tabulka 14: Detekované proteiny u 2-DE gelu (pH 3 – 10, NL)

Označení spotu	Název proteinu (SwissProt kód proteinu)	MASCOT skóre
1.	Keratin, typ II cytoskeletální 1 (K2C1_HUMAN)	387,3
	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	353,8
	Keratin, typ I cytoskeletální 10 (K1C10_HUMAN)	334,7
2.	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	134,4
3.	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	92,2
4.	Keratin, typ I cytoskeletální 10 (K1C10_HUMAN)	225,6
	Keratin, typ II cytoskeletální 2 epidermální (K22E_HUMAN)	78,7*
5.	Keratin, typ II cytoskeletální 1 (K2C1_HUMAN)	397,6
	Keratin, typ I cytoskeletální 10 (K1C10_HUMAN)	167,5
	Keratin, typ II cytoskeletální 2 epidermální (K22E_HUMAN)	154,1
	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	134,2
11.	Keratin, typ II cytoskeletální 1 (K2C1_HUMAN)	165,9

\* protein není validní

Tabulka 15: Detekované proteiny u 2-DE gelu (pH 4 – 7)

Označení spotu	Název proteinu (SwissProt kód proteinu)	MASCOT skóre
6.	Sérový albumin (ALBU_HUMAN)	322,0
11.	Sérový albumin (ALBU_HUMAN)	95,4
15.	Sérový albumin (ALBU_HUMAN)	315,9

Tabulka 16: Detekované proteiny u 2-DE gelu (pH 5 – 8)

Označení spotu	Název proteinu (SwissProt kód proteinu)	MASCOT skóre
5.	Keratin, typ I cytoskeletální 10 (K1C10_HUMAN)	214,9
6.	Kolagen, alfa-1 řetězec (CO1A1_HUMAN)	379,0
8.	Keratin, typ I cytoskeletální 10 (K1C10_HUMAN)	137,4
13.	Sérový albumin (ALBU_HUMAN)	158,2
16.	Keratin, typ II cytoskeletální 2 epidermální (K22E_HUMAN)	106,9
21.	Keratin, typ II cytoskeletální 1 (K2C1_HUMAN)	233,3
22.	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	77,6
23.	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	137,6
25.	Keratin, typ I cytoskeletální 10 (K1C10_HUMAN)	250,7
	Sérový albumin (ALBU_HUMAN)	108,4

Tabulka 17: Detekované proteiny u 2-DE gelu (pH 7 – 10)

Označení spotu	Název proteinu (SwissProt kód proteinu)	MASCOT skóre
3.	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	91,0
7.	Sérový albumin (ALBU_HUMAN)	716,8
	Keratin, typ I cytoskeletální 10 (K1C10_HUMAN)	245,2
	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	125,7
10.	Keratin, typ II cytoskeletální 1 (K2C1_HUMAN)	441,8
	Kolagen, alfa-1 řetězec (CO1A1_HUMAN)	368,2
	Keratin, typ I cytoskeletální 10 (K1C10_HUMAN)	301,2
	Keratin, typ I cytoskeletální 9 (K1C9_HUMAN)	197,8
	Kolagen, alfa-2 řetězec (CO1A2_HUMAN)	195,6

## 6 Diskuze

Proteomika dentinu přináší užitečné informace o složení extracelulární matrice dentinu a také nám pomáhá charakterizovat osteoblasty.

V nedávné korejské studii byly zuby moudrosti demineralizovány v pufru disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) a proteiny byly následně extrahovány RIPA puftrem a následně analyzovány v 10% SDS-polyakrylamidovém gelu. Po vyříznutí jednotlivých bandů a naštipání proteinů trypsinem bylo metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií následně odhaleno 233 proteinů [4]. V další podobné studii vědců z téže země bylo v dentinu nalezeno 147 zubních proteinů, přičemž z toho bylo detekováno 29 známých proteinů, avšak jako poprvé se vyskytující v zubní tkáni [6].

V recentní studii pracovníků proteomické laboratoře FgÚ AV ČR v Praze byla poprvé použita 2-DE pro proteomické zkoumání dentinu lidských zubů [2]. Využitím dvoukrokové extrakce vzorků v guanidinovém pufru a poté v EDTA pufru následované 2-DE a nLC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením bylo odhaleno 289 proteinů, z toho 90 proteinů bylo poprvé popsáno v lidském dentinu, 20 proteinů byly keratiny a dále bylo identifikováno 9 hypotetických proteinů, podobných imunoglobulinům, které byly v lidském organismu detekovány vůbec poprvé [2]. Princip experimentální části mé práce vychází převážně z tohoto článku.

Hlavním cílem mé odborné práce bylo optimalizovat metodu 2-DE na stripech s různým IPG gradientem, následně porovnat jednotlivé 2-DE gely a určit, jaké jsou optimální podmínky pro dělení zubních proteinů.

Příprava vzorku dentinu spočívala v rozdrčení očištěných zubů na prášek, který byl posléze extrahován buď v guanidinovém anebo EDTA pufru. Při extrakci suchého vzorku dentinu byla do G-extraktu navíc přidána komerčně dodávaná tableta koktejlu inhibitorů proteáz, a tudíž se enzymy staly inaktivními a nemohly tak degradovat proteiny přítomné ve vzorku. EDTA je chemikálií s inhibujícími účinky některých proteáz (např. metaloproteináz), proto nebylo nutné přidávat do jejího roztoku tabletu s koktejlem inhibitorů proteáz.

Kvantitativní test obsahu bílkovin ve vzorku založený na metodě podle Bradfordové ukázal, že větší podíl proteinů obsahuje G-extrakt na rozdíl od E-extraktu. Nízký obsah proteinů v obou extraktech (6,7 % G-extrakt a 6,6 % E-extrakt) je dán nedostatečnou

extrakcí a odsolení vzorku nebylo úplně dokonalé. Aby omezené množství vzorku dentinu vystačilo na celou komplexní analýzu, byly použity 7 cm formáty IPG stripů.

Před proteomickou analýzou zubních proteinů se optimalizovalo množství vzorku pro 2-DE metodu aplikací dvou různých navážek G-extraktu (při kontrole čistoty vzorků pomocí SDS-PAGE byly jeho gely zřetelnější). Lepší reprodukovatelné výsledky poskytl gel s vyšší navázkou (1,0 mg), kdy se při IEF vstřebalo do IPG stripu větší množství vzorku, čímž následovně vznikaly intenzivnější spoty. Toto množství vzorku bylo proto v dalších analýzách navažováno a rozpouštěno ve 130  $\mu$ l lyzačního pufru a aplikováno na IPG stripy po celou dobu zkoumání proteomu dentinu v lidských zubech moudrosti.

Co se IEF týče, její průběh došel vždy do předpokládané doby (19 – 22 hodin podle nastavených podmínek pro příslušný IPG strip), tzn. že v mých vzorcích dentinu se neprojeví rušivé účinky solí ani nízkomolekulárních látek (organické kyseliny jako produkty metabolismu odontoblastů, lipidové složky z biologických membrán či sacharidy vzniklé při buněčných procesech). Pokud by ve vzorku zůstaly nějaké soli nebo nízkomolekulární látky pocházející původně z dentinu, doba dosažení požadovaných volt-hodin by se prodlužovala (krok č. 3 aktivní rehydratace – viz *Experimentální část*), neboť dosažení konečné hodnoty napětí 4000 V by bylo zdržováno rušivými solemi.

Bohužel žádný z IPG stripů s úzkým rozsahem pH (3,9 – 5,1; 4,7 – 5,9; 5,5 – 6,7; 6,3 – 8,3) a jeden IPG strip s rozsahem pH 3 – 6 neposkytl reprodukovatelné výsledky, jen nezřetelné mapy. Příčinou může být změna složení vzorku po měsíčním skladování při – 80 °C (opakované zmrazování a rozmrazování preparátu, nedostatečná IEF, nerovnoměrný výskyt proteinů v suchém vzorku (nereprezentativnost vzorku), interference nízkomolekulárních látek či vápenatých iontů, nedbalost při manipulaci se vzorkem. SDS-PAGE fungovala správně – důkazem je zřetelné rozdělení standardu směsi proteinů podle jejich  $M_r$  (ukázka jednoho ze špatných 2-DE gelů – obr. 12).



Obr. 12: Nezřetelné mapy na 2-DE gelu s úzkým rozsahem pH 4,7 – 5,9; vlevo rozdělení standardu směsi proteinů

U zbývajících IPG stripů s rozsahem pH 3 – 10, NL; 4 – 7; 5 – 8 a 7 – 10 bylo k nLC-MS/MS analýze vybráno celkem 71 spotů, avšak identifikováno bylo 47 spotů. Z toho pouze u 21 spotů byly rozpoznány některé proteiny shodné s předchozími studiemi. Ve zbylých vzorcích byl přítomen pouze trypsin, nevalidní proteiny či proteiny jiného původu než lidského. Pravděpodobně za to byla zodpovědná nedostatečná extrakce spotů v sonikační lázni po naštěpení trypsinem na peptidy nebo hardwarové problémy s hmotnostně spektrometrickým detektorem.

Z proteinů identifikovaných ve vzorcích se jednalo především o keratiny (K1C9\_HUMAN, K1C10\_HUMAN, K2C1\_HUMAN, K22E\_HUMAN), kolageny (CO1A1\_HUMAN, CO1A2\_HUMAN) a sérový albumin (ALBU\_HUMAN). Je známo, že keratiny mohou pocházet z lidské kůže nebo laboratorního prachu a kolageny tvoří majoritní složku dentinové matrice. Je zřejmé, že nejvíce spotů bylo detekováno u 2-DE gelu s pH rozsahem 5 – 8, protože většina lidských bílkovin má svůj pI ~ 7. Naopak v alkalické oblasti pH 7 – 10 bylo detekováno nejméně spotů, neboť při IEF silně alkalických (pH > 8) proteinů se komplikuje vstup vzorku do IPG stripu, čímž se zhoršuje detekovatelnost spotů na výsledných 2-DE gelech.

## 7 Závěr

Proteomická analýza proteomu dentinu ve zdravých lidských zubech moudrosti mužů ve věku 31 let odhalila celkem 7 proteinů. Z toho nejčastěji a opakovaně detekovanými proteiny byly keratiny, celkem byly identifikovány 4 keratinové proteiny typu I cytoskeletální 9, typu I cytoskeletální 10, typu II cytoskeletální 1 a typu II cytoskeletální 2 epidermální (K1C9\_HUMAN, K1C10\_HUMAN, K2C1\_HUMAN a K22E\_HUMAN). Dále byly detekovány 2 kolagenní proteiny typu alfa-1 řetězec a typu alfa-2 řetězec (CO1A1\_HUMAN a CO1A2\_HUMAN) a sérový albumin (ALBU\_HUMAN).

Použití IPG stripů s různě úzkými rozsahy pH bohužel nepřineslo nové výsledky pro optimalizaci 2-DE metody. Příčinou snad mohly být rušivé účinky nečistot ve vzorku, když se jedná o velmi citlivé stripy s IPG gradientem, ale důvodů může být více a jsou podrobněji rozebrány v 6. kapitole *Diskuze*. Gel s pH 3 – 6 též neposkytl dobrý výsledek. Zde zřejmě nebylo úspěšné vstřebání vzorku do IPG proužku během IEF a navíc se jedná o slabě kyselou až neutrální oblast pH a přítomné bílkoviny ve vzorku, až na některé výjimky, měly svůj isoelektrický bod v blízkosti neutrálního pH 7. Nejlepší výsledky přinesly 2-DE gely s nejširší oblastí pH 3 – 10, NL (s rozšířeným měřítkem pH zhruba 5 – 7), 4 – 7 a 5 – 8, neboť u jmenovaných gelů byly neoptimálnější podmínky pro separaci dentinových proteinů.

## SEZNAM ZKRATEK

2-DE	dvourozměrná gelová elektroforéza
APS	peroxodisíran amonný
CBB	barvivo Coomassie Brilliant Blue
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-propan-1-sulfonát
DSPP	dentinový sialofosfoprotein
DTT	dithiothreitol
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESI	ionizace elektrosprejem
ESI-Q-TOF	tandemový hmotnostní spetrometr (kvadrupól a průletový analyzátor) s ionizací elektrosprejem
HED	hydroxyethyl-disulfid
IEF	isoelektrická fokusace
IPG strip	strip s imobilizovaným pH gradientem
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem
MALDI-MS	hmotnostní spektrometr s laserovou ionizací/desorpcí za přítomnosti matrice
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NL	nelineární měřítko rozsahu pH
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
pI	isoelektrický bod
PMF	„Peptide mass fingerprinting“ (peptidové hmotnostní mapování)
RT-PCR	reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsírán sodný

SDS-PAGE	gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TEMED	N, N, N', N' – tetramethylethyldiamin
Tris	(tris(hydroxy-methyl)aminomethan)

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpa-Poljak A., Yan J. X., Gooley A. A., Wilkins M. R., Duncan M. W., Harris R., Williams K. L., Humphrey-Smith I.: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**: 1090 – 1094 (1995).
- [2] Jágr M., Eckhardt A., Pataridis S., Mikšík I.: Comprehensive proteomics analysis of human dentin. *European Journal of Oral Sciences* **120**: 259 – 268 (2012).
- [3] *Správná dentální hygiena*. Dostupné z URL: <<http://www.spravna-dentalni-hygiena.mypage.cz/menu/vyvoj-a-stavba-zubu>> [cit. 10. 4. 2013].
- [4] Park E. S., Cho H. S., Kwon T. G., Jang S. N., Lee S. H., An C. H.: Proteomics analysis of human dentin reveals distinct protein expression profiles. *Journal of Proteome Research* **8**: 1338 – 1346 (2009).
- [5] Butler W. T., Brunn J. C., Qin C.: Dentin Extracellular Matrix (ECM) Proteins: Comparison to Bone ECM and Contribution to Dynamics of Dentinogenesis. *Connective Tissue Research* **44**: 171 – 178 (2003).
- [6] Chun S. Y., Lee H. J., Choi Y. A., Kim K. M., Baek S. H., Park H. S., et al.: Analysis of the soluble human tooth proteome and its ability to induce dentin/tooth regeneration. *Tissue Engineering A* **17**: 181 – 191 (2011).
- [7] Vercauteren F. G. G., Arckens L., Quirion R.: Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. *Amino Acids* **33**: 405 – 414 (2007).
- [8] Rabilloud T., Chevallet M., Luche S., Lelong C.: Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of Proteomics* **73**: 2064 – 2077 (2010).
- [9] Görg A., Weiss W., Dunn M. J.: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**: 3665 – 3685 (2004).
- [10] Anzenbacher P., Kovář J.: *Metody chemického výzkumu pro biochemiky (dočasná vysokoškolská učebnice)*. 1. vydání Praha, Tiskařské závody, n. p. (1986).
- [11] Friedman D. B., Hoving S., Westermeier R.: Isoelectric Focusing and Two-dimensional Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology* **463**: 515 – 540 (2009).

- [12] Shaw M. M., Riederer B. M.: Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3**: 1408 – 1417 (2003).
- [13] Bio-Rad Laboratories, Inc.: ReadyStrip™ IPG Strip Instruction Manual. *Catalog # 163-2099* (2012).
- [14] Charles E. Schmidt College of Science: *Department of Chemistry and Biochemistry*. Dostupné z URL. <<http://proteomics.nmr.fau.edu/protean.html>> [cit. 15. 4. 2013].
- [15] Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 – 685 (1970).
- [16] Shevchenko A., Tomas H., Havliš J., Olsen J. V., Mann M.: In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**: 2856 – 2860 (2006).
- [17] Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248 – 254 (1976).
- [18] Bruker Daltonics: *Bruker Announces New Quantitative Proteomics Capabilities with Skyline Software*. Dostupné z URL. <<http://www.bruker.com/en/products/mass-spectrometry-and-separations/news/single-view/article/bruker-announces-new-quantitative-proteomics-capabilities-with-skyline-software.html>> [cit. 22. 4. 2013].
- [19] Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung: *ESI-Quad-Tof*. Dostupné z URL. <[http://onion81.mpiz-koeln.mpg.de/websiteZuechtungsforschung/bildobjekte/Maldi\\_2009/ESI-Quad-Tof/index.html](http://onion81.mpiz-koeln.mpg.de/websiteZuechtungsforschung/bildobjekte/Maldi_2009/ESI-Quad-Tof/index.html)> [cit. 22. 4. 2013].