

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bakalářská práce

**Analýza změn sekretomu hepatocytárních buněk při zvýšené
koncentraci homocysteinu pomocí dvojrozměrné elektroforézy**

2-DE analysis of hepatocyte secretome under hyperhomocysteinemia

Martina Chrudinová

Školitel: Mgr. Irena Selicharová, Dr.

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Mgr. Ireny Selicharové, Dr. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ:

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Ireně Selicharové, Dr. za odborné vedení, cenné připomínky, trpělivost, ochotu a pochopení, a své garantce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za cenné připomínky, vstřícné jednání a podporu při realizaci této bakalářské práce.

Poděkování patří také celému vědeckému týmu RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji Dr. Zuzaně Demianové, Ph.D. za identifikaci proteinů.

ABSTRAKT

Homocystein je aminokyselina, která obsahuje ve své struktuře síru, a je odvozená od methioninu. Jedná se o nekódovanou aminokyselinu, která je součástí několika metabolických drah a vyskytuje se v krevní plazmě. Zvýšená koncentrace homocysteinu v krvi doprovází řadu onemocnění, jako jsou kardiovaskulární a neurodegenerativní choroby, cukrovka nebo osteoporóza. Proto v posledních dvou desetiletích dochází k velmi intenzivnímu zkoumání mechanismů souvisejících s metabolismem homocysteinu.

V rámci této bakalářské práce byla provedena proteomická analýza sekretomu jaterních buněk, konkrétně byly porovnávány proteiny sekretované primárními lidskými hepatocyty vystavenými 2mM koncentraci homocysteinu s proteiny sekretovanými stejnými buňkami v prostředí bez přidaného homocysteinu. Analýza byla provedena pomocí dvojrozměrné elektroforézy.

Buňky byly 48 hodin kultivovány v bezsérovém médiu (kontrolní skupina a skupina s 2mM homocysteinem) a proteiny sekretované do média byly vysráženy acetonitrilem. Byla provedena dvojrozměrná elektroforéza. Výsledné proteinové mapy byly vyhodnocovány pomocí počítačového programu PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software (Bio-Rad, USA). Jako rozdílně sekretované proteiny byly určeny ty, jejichž skvrny měly intenzitu větší než 500 ppm a u nichž byl rozdíl v intenzitě mezi kontrolní skupinou a skupinou s homocysteinem minimálně trojnásobný s 95% pravděpodobností vypočítanou Studentovým t-testem. Tyto proteiny byly vyřezány z preparativních gelů a identifikovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

Celkem bylo nalezeno 17 skvrn odpovídajících 15 proteinům, které byly označeny jako rozdílně exprimované. Mezi těmito proteiny byly jak proteiny sekretované, tak i proteiny vnitrobuněčné (cytoplazmatické, mitochondriální). U velkého množství z těchto proteinů bylo možné nalézt souvislost s metabolismem homocysteinu.

Klíčová slova

Homocystein, hyperhomocysteinemie, proteomika, dvojrozměrná elektroforéza, primární hepatocyty, sekretom, tandemová hmotnostní spektrometrie

ABSTRACT

Homocysteine is a plasmatic, sulphur-containing amino acid derived from methionin. It is an amino acid not used in protein synthesis and it's role is to serve as an intermediate in numerous metabolic pathways. Elevated concentrations of homocysteine in blood are associated with many pathologies, as cardiovascular and neurodegenerative diseases, diabetes or osteoporosis, thus homocysteine has been a common subject of many biochemical experiments in last two decades.

For this bachelor thesis, the proteomic comparison of proteins secreted by primary human hepatocytes under 2mM homocysteine and primary human hepatocytes with no homocysteine added to the incubation medium was made, using large-gel two-dimensional electrophoresis.

Hepatocytes were incubated in serum free medium for 48 hours. Proteins secreted to medium were precipitated by acetonitrile. Two dimensional electrophoresis was made. Protein maps were analysed by PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software (Bio-Rad, USA). Search criteria for differentially secreted proteins were three-fold change at the signicance level 95 %, Student's t-test. These proteins were cut off the preparative gels and identified by tandem mass spectrometry.

In total, there were 17 spots equal to 15 proteins found as differentially exprimed proteins. Among these proteins, there were secreted proteins as well as intracellular proteins (cytosolar, mitochondrial). In many cases, a connection between the protein and metabolism of homocysteine could be found. (In Czech)

Key Words

Homocysteine, hyperhomocysteinemia, proteomics, two-dimensional gel electrophoresis, primary hepatocytes, secretome, tandem mass spectrometry

OBSAH:

1 ÚVOD	5
1.1 Homocystein	5
1.1.1 Metabolismus homocysteinu	5
1.1.2 Regulace metabolismu homocysteinu	6
1.1.3 Hyperhomocysteinemie	7
1.1.3.1 Choroby spojené s hyperhomocysteinemií	8
1.2 Proteomika	8
1.2.1 Dvojrozměrná elektroforéza	9
1.2.1.1 První rozměr (izoelektrická fokusace)	9
1.2.1.2 Druhý rozměr (SDS-PAGE)	10
1.2.2 Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií	10
1.3 Buněčný sekretom, příprava vzorků a jejich proteomická analýza	11
1.4 Jaterní buňky (hepatocyty)	11
2 CÍL PRÁCE	13
3 MATERIÁL	14
4 METODY	16
4.1 Zpracování buněk, příprava vzorků	16
4.2 Stanovení množství proteinů	17
4.3 Dvojrozměrná elektroforéza	17
4.3.1 První rozměr elektroforézy	17
4.3.1.1 Aktivní rehydratace	17
4.3.1.2 Izoelektrická fokusace	18
4.3.1.3 Ekvilibrace	18
4.3.2 Druhý rozměr elektroforézy (SDS-PAGE)	18
4.3.2.1 Průběh SDS-PAGE	19
4.4 Detekce proteinů v gelu	20
4.5 Vyhodnocování gelů	20
4.6 Identifikace vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich příprava	20
4.6.2 Extrakce vzorků z gelu	21

4.6.3 Identifikace proteinů pomocí MS	21
5 VÝSLEDKY	23
5.1 Množství proteinů sekretovaných primárními jaterními hepatocyty	23
5.2 Analytické gely	24
5.3 Rozdílne sekretované proteiny	25
5.4 Identifikace proteinů	27
6 DISKUSE.....	31
7 ZÁVĚR	34
SEZNAM LITERATURY	35

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- 2-DE – dvojrozměrná elektroforéza/ vytvořený pomocí dvojrozměrné elektroforézy
- 5,10-CH₂-THF – 5,10-methyltetrahydrofolát
- 5-CH₃-THF – 5-methyltetrahydrofolát
- ACN – acetonitril
- APS – peroxodisulfát amonný
- ATP – adenosintrifosfát
- BHMT – betain-homocystein S-methyltransferasa
- CBS - cystathion β-synthasa
- CoA – koenzym A
- DMG - dimethylglycin
- DTT – dithiothreitol
- ESI – ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
- FBS – fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
- GAMT - guanidinoacetát methyltransferasa
- GNMT - glycin N-methyltransferasa
- CHAPS – 3-(cyklohexylamino)-1-propansulfonová kyselina
- IEF – izoelektrická fokusace
- IPG strip – plastový proužek s napolymerovaným gelem s imobilizovaným pH gradientem
(z anglického „immobilized pH gradient“)
- IT – iontová past (z anglického „ion trap“)
- MALDI - laserová desorpce za přítomnosti matrice (z anglického „matrix-assisted laser desorption/ionization“)
- MALDI-TOF – hmotnostní analyzátor MALDI spojený s detektorem doby letu
(z anglického „time-of-flight“)
- Milli Q – deionizovaná voda
- Mr – relativní molekulová hmotnost (z anglického „relative molecular weight“)
- MS – hmotnostní spektrometrie (z anglického „mass spectrometry“)
- MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie
- MTHFR – methyltetrahydrofolátreduktasa
- MTs – methyltransferasy
- PEMT – fosfatidylethanolamin N-methyltransferasa
- pI – izoelektrický bod

Q – kvadrupólový hmotnostní analyzátor

Q-TOF – kvadrupólový hmotnostní analyzátor spojený s detektorem doby letu (z anglického „time-of-flight“)

RLB – rehydratační lyzační pufr (z anglického „rehydration lysis buffer“)

SAH – S-adenosylhomocystein

SAM – S-adenosylmethionin

SDS – dodecylsulfát sodný

SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza (z anglického „polyacrylamide gel electrophoresis“) využívající jako detergent dodecylsulfát sodný

TFA – kyselina trifluoroctová

THF - tetrahydrofolát

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylendiamin

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 ÚVOD

1.1 Homocystein

Homocystein je aminokyselina, která obsahuje ve své struktuře síru, a je odvozená od methioninu. Jedná se o nekódovanou aminokyselinu, která je součástí několika metabolických drah (*obrázek 1*, str. 6) a vyskytuje se v krevní plazmě [1, 2].

Biologická role homocysteinu byla zkoumána od roku 1932, kdy Vincent du Vigneaud popsal tuto sloučeninu jako produkt demethylace methioninu [3]. Zvýšená koncentrace homocysteinu v krvi doprovází řadu onemocnění [1, 2]. Proto v posledních dvou desetiletích dochází k velmi intenzivnímu zkoumání mechanismů souvisejících s metabolismem homocysteinu.

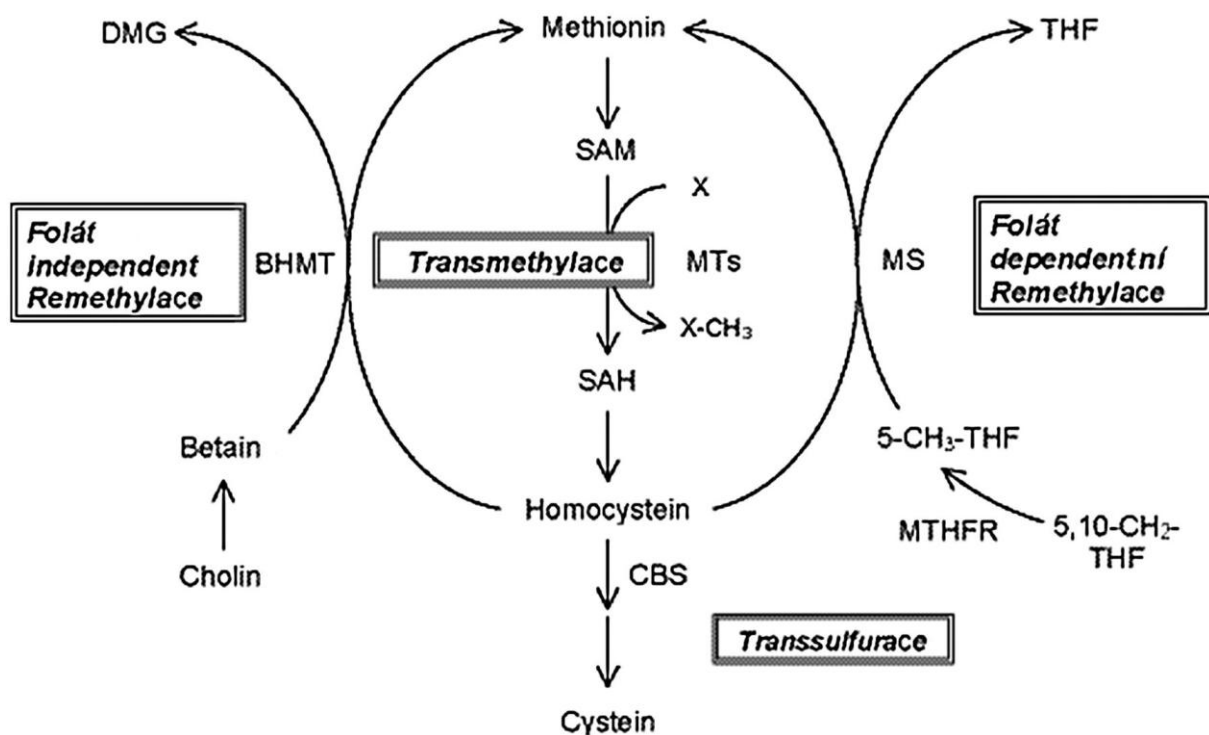
1.1.1 Metabolismus homocysteinu

Homocystein vzniká z methioninu v několikakrokovém procesu (*obrázek 1*, str. 6). Methionin je nejdříve aktivován pomocí ATP, kdy přijímá adenosinovou skupinu a vzniká S-adenosylmethionin (SAM). Reakce je katalyzována S-adenosylmethioninsynthetasou. Přenosem methylové skupiny na akceptorovou molekulu vzniká S-adenosylhomocystein (SAH), který je za katalýzy SAH-hydrolasou přeměněn na homocystein [1].

SAM slouží jako univerzální donor methylové skupiny pro metylaci řady substrátů, jako jsou nukleové kyseliny, lipidy a proteiny. Tyto reakce jsou katalyzovány specifickými SAM-dependentními methyltransferasami (MTs) [4, 5].

Homocystein může být dvěma způsoby remetylován zpět na methionin, a to buď mechanismem folát-dependentním, nebo folát-independentním. V prvním případě využívá enzym methioninsynthasa (MS), závislý na přítomnosti vitamínu B₁₂, methylovou skupinu z 5-methyltetrahydrofolátu (5-CH₃-THF). Remethylace homocysteinu nezávislá na folátu je katalyzována betain-homocystein S-methyltransferasou (BHMT), což je enzym využívající betain – donor methylové skupiny odvozený z oxidace cholinu [4].

Homocystein může být také transsulfurační dráhou katabolizován na cystein a dále metabolizován na další důležité biologické sloučeniny, jako je například glutathion [4]. Zatímco k SAM-dependentní transmethylaci dochází téměř ve všech tkáních, transsulfurační dráha a folát-independentní remethylace jsou reakce tkáňově specifické a vyskytují se hlavně v játrech a ledvinách [6, 7].



Obrázek 1: Schéma znázorňující metabolismus folátu, methylové skupiny a homocysteinu.

Použité zkratky: 1) **Metabolity:** DMG – dimethylglycin; SAM – S-adenosylmethionin;

SAH – S-adenosylhomocystein; THF – tetrahydrofolát;

5-CH₃-THF – 5-methyltetrahydrofolát; 5,10-CH₂-THF – 5,10-methylenetetrahydrofolát

2) **Enzymy:** BHMT – betain-homocystein S-methyltransferasa; MTs – methyltransferasy obecně; CBS – cystathion β-synthasa; MS – methioninsynthasa;

MTHFR – methylenetetrahydrofolátreduktasa. Převzato z [4].

1.1.2 Regulace metabolismu homocysteinu

Homocystein vznikající v buňkách může být buď exportován ven z buňky, nebo dále metabolizován [2]. Metabolismus homocysteinu (obrázek 1) je spojen s přeměnami struktur jako je folát a methylová skupina a jeho správný průběh je důležitý pro optimální zdraví. Tento metabolismus je ovlivňován řadou nutričních, hormonálních a genetických faktorů, což je spojováno s různými patologickými stavy, jako jsou například kardiovaskulární choroby, rakovina, neurodegenerativní choroby, osteoporóza nebo vrozené vady [2, 4]. Každá metabolická dráha musí být regulována a její průběh závisí právě na regulaci.

Existuje velké množství methyltransferas, které využívají jako substrát SAM, podílejí se na spotřebě methylové skupiny a v důsledku toho na vzniku homocysteinu [4]. V savcích organizmech bylo objeveno minimálně 50 SAM-dependentních methylačních reakcí,

předpokládá se však, že konečné číslo bude mnohem vyšší [5]. V tomto textu budou zmíněny 3 z těchto enzymů, které se na spotřebě methylové skupiny podílí pravděpodobně největší měrou. Jedná se o glycin N-methyltransferasu (GNMT), guanidinoacetát N-methyltransferasu (GAMT) a fosfatidylethanolamin N-methyltransferasu (PEMT) [4].

GNMT je nejhojnější jaterní methyltransferasa, jejíž exprese je tkáňově specifická, dochází k ní v játrech, ledvinách, slinivce a ve střevech. Tento enzym katalyzuje reakci, při které vzniká sarkosin z SAM a glycinu [8]. GNMT není na rozdíl od ostatních methyltransferas inhibována zvýšenými hladinami SAH, ale je inhibována 5-CH₃-THF. Jedná se o ryze regulační enzym, pomocí kterého je udržována rovnováha mezi koncentrací SAM a 5-CH₃-THF. Sarkosin formovaný během reakce nemá žádnou fyziologickou funkci. Za katalýzy sarkosinoxidasou se následně mění zpět na glycin [9].

PEMT je enzym katalyzující sérii reakcí, při nichž 3 methylové skupiny odvozené od SAM přecházejí na fosfatidylethanolamin, čímž vzniká fosfatidylcholin a tři molekuly homocysteinu [4]. Jde o enzym specificky se vyskytující v jaterní tkáni [10]. GAMT je methyltransferasa katalyzující reakci, při které vzniká kreatin z guanidinoacetátu a SAM [11].

Největšími konzumenty methylových skupin odvozených z SAM jsou pravděpodobně GAMT a PEMT. Navzdory dřívějším předpokladům, podle kterých GAMT využívá asi 70 % methylových skupin odvozených od SAM, novější výzkumy (Stead a kol. [5]) ukazují, že největším konzumentem těchto skupin, a proto methyltransferasou mající největší vliv na vznik homocysteinu, je pravděpodobně PEMT [4].

Velikost poměru SAM:SAH slouží jako ukazatel transmethylačního potenciálu. V případě, kdy tento poměr nabývá nižších hodnot, a to zejména při zvýšeném množství SAH, probíhají transmethylační reakce v menší míře, než když je tento poměr v normě. Velikost poměru je závislá na aktivitě SAM-dependentních methyltransferas, hlavně GNMT a PNMT [4].

1.1.3 Hyperhomocysteinemie

Nerovnováha mezi mírou produkce homocysteinu a jeho metabolizací může způsobit zvýšené uvolňování homocysteinu do mezibuněčného prostoru a následně do plazmy a moči [12]. Zvýšená koncentrace homocysteinu v plazmě je známá jako hyperhomocysteinemie, kterou můžeme podle závažnosti rozdělit do tří skupin. Pokud se hodnoty plazmatické koncentrace homocysteinu pohybují mezi 16 a 30 μM, je tento stav označován za hyperhomocysteinemii **mírnou**. O **střední** hyperhomocysteinemii mluvíme, pokud

plazmatická koncentrace dosahuje hodnot mezi 31 a 100 μM , při přesažení 100 μM už se jedná o **těžkou** hyperhomocysteinemii. Za normální množství homocysteinu v krevní plazmě přitom považujeme stav, kdy se koncentrace pohybuje mezi 5 a 16 μM [13].

Hyperhomocysteinemie je považována za rizikový faktor pro velké množství chorob [1, 2]. Její příčinou je většinou dieta nebo genetické faktory (polymorfismus, mutace v genech pro proteiny metabolismu homocysteinu a methylové skupiny), případně kombinace obou těchto faktorů [14].

1.1.3.1 Choroby spojené s hyperhomocysteinemií

Hyperhomocysteinemie je považována za nezávislý rizikový faktor pro kardiovaskulární choroby, jako je ateroskleróza a arteriální a venózní trombóza. Dále do této skupiny spadají cerebrovaskulární choroby, demence a osteoporóza [1, 2]. Mnoho studií ukázalo, že hyperhomocysteinemie způsobuje chronické záněty, narušení funkce endotelu, přestavbu extracelulárního matrix, aktivaci krevních destiček a zvýšení pro-koagulační aktivity koagulačních faktorů, což má za následek zvýšenou trombogenicitu [1].

Není známo, jakým mechanismem se podílí hyperhomocysteinemie na vzniku těchto chorob. Objasnění souvislosti poruch metabolismu, hyperhomocysteinemie a chorobných stavů je předmětem zkoumání.

1.2 Proteomika

Termín „proteom“ (z anglického proteome, protein complement of the genome) označuje soubor všech proteinů, které tvoří převažující součást buněčných struktur a vykonávají prakticky všechny buněčné funkce [15]. Poprvé tento termín použil australský doktorand Mark Wilkins v roce 1994 na konferenci v Sieně [16]. Vznikl nový obor zvaný proteomika, jehož náplní je globální identifikace proteinů v určité zdravé či nemocné buňce nebo tkáni a studium jejich funkce či interakce. Jedná se o obor komplikovaný, protože proteom se mění jak během buněčného růstu a diferenciaci, tak i vlivem funkčních produktů jiných buněčných typů či vnitřního prostředí organismu, které se samo mění v závislosti na stárnutí, při adaptaci na změny vnějšího prostředí nebo v průběhu nemoci. Množství jednotlivých proteinů v jedné eukaryotické buňce se odhaduje v rozmezí od 1 do 10^6 molekul, přičemž v séru to může být až 10^{10} [15].

Proteomika jako metoda se využívá k systematickému studiu biologických dějů. Jejím cílem je identifikovat a charakterizovat všechny proteiny v daném systému současně. K provádění proteomických experimentů jsou nezbytné velkokapacitní a citlivé metody dělení proteinů. Proteiny jsou identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Nároky jsou kladeny na použití informačních technologií a automatizaci [15].

1.2.1 Dvojrozměrná elektroforéza

K dělení proteinů se hojně používá dvojrozměrná elektroforéza (2-DE), která byla poprvé popsána v roce 1975, a to nezávisle třemi různými autory [17, 18, 19]. Tato metoda umožňuje rozdělit jednotlivé proteiny ze směsi získané z buněk, tkání či tělních tekutin na gelech podle dvou nezávislých biochemických charakteristik. Nejdříve jsou proteiny rozděleny podle náboje (izoelektrických bodů, pI) a poté v kolmém směru podle molekulové hmotnosti (Mr). Výsledkem je tzv. proteinová mapa, v níž každý protein zaujímá pozici definovanou svým pI a Mr. Proteiny je v gelu nutno vizualizovat barvením, existují různé způsoby, přičemž nejvyšší citlivosti dosahuje vizualizace proteinů pomocí dusičnanu stříbrného [15].

Dvojrozměrná elektroforéza umožňuje separaci tisíců proteinů z komplexních směsí. Byla prokázána vysoká spolehlivost této metody [20]. Nevýhodou je velká pracnost, náročná standardizace a omezená možnost automatické analýzy gelů. V posledních letech jsou zaváděny tzv. negelové proteomické metody, využívající především obrovského rozvoje hmotnostně-spektrometrických metod. Ovšem v mnoha aspektech (např. možnost detekce izoform a post-translačních modifikací) je 2-DE zatím nepřekonaná a zůstává hlavní metodou proteomiky.

1.2.1.1 První rozměr (izoelektrická fokusace)

Každý protein má jak kladně, tak záporně nabitě skupiny, a proto má také tzv. izoelektrický bod (pI), což je hodnota pH, při které má nulový náboj a proto se nepohybuje v elektrickém poli. Pokud se směs proteinů v elektrickém poli vyskytuje v roztoku, jehož pH se zvyšuje od anody ke katodě, každý protein doputuje v pH gradientu na to místo, kde se pH shoduje s jeho pI. Při jakékoliv následné odchylce z tohoto bodu je protein výslednými elektroforetickými silami vrácen vždy zpět. Výsledkem jsou rovné pásy proteinů okolo

hodnot pH (odpovídajícím jejich pI), které mohou být tenké až 0,01 jednotky pH. Tento proces se nazývá izoelektrická fokusace (IEF) [12].

1.2.1.2 Druhý rozměr (SDS-PAGE)

Dodecylsulfát sodný (SDS) je detergent, který se k většině proteinů váže ve stejném poměru (1,4 g SDS na 1 g proteinu, což odpovídá asi jedné molekule SDS na dva aminokyselinové zbytky). SDS tak propůjčuje aminokyselinám záporný náboj, který maskuje jejich náboj skutečný, následkem čehož mají proteiny shodné poměry mezi nábojem a molekulovou hmotností. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přidavkem SDS proto umožňuje rozdělení proteinů na základě jejich molekulových hmotností [12].

V případě dvojrozměrné elektroforézy je nejprve provedena IEF s využitím komerčně dostupného „IPG stripu“ se zapolymerovaným pH gradientem. „IPG strip“ s proteiny rozdělenými podle pI je potom „nalepen“ na polyakrylamidový gel s přidavkem SDS a podroben SDS-PAGE. Výsledkem je dvojrozměrný obraz proteinů, rozdělených v jednom směru podle pI a ve směru druhém podle molekulové hmotnosti.

1.2.2 Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

Při identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) se měří poměr hmotnosti ku náboji (m/z) molekuly, kterou zkoumáme. Za tímto účelem musí být molekula nejdříve ionizována a přenesena do vysokého vakua přístroje. U větších molekul komplikuje identifikaci jejich rozklad. V 80. letech minulého století byly vyvinuty nové techniky, které tento problém řeší [15].

Jedná se o ionizaci elektrosprejem (ESI, electrospray ionization) [21] a laserovou desorpci za přítomnosti matrice (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization) [22]. Iontové zdroje MALDI bývají nejčastěji spojeny s analyzátozem hmotnosti TOF (time of flight), zatímco ESI je obvykle spojen s iontovou pastí (IT, ion trap) nebo kvadrupolovým (Q) radiofrekvenčním analyzátozem. Vedle MALDI-TOF jsou také dostupné hmotnostní spektrometry využívající ESI iontové zdroje a hybridní Q-TOF analyzátozy [15]. Přístroj TripleTOF™ 5600 System využitý pro účely této práce analyzuje peptidy, předem rozdělené kapalinovou chromatografií, pomocí Q-TOF analyzátozu.

1. 3 Buněčný sekretom, příprava vzorků a jejich proteomická analýza

Sekretom můžeme definovat jako komplexní soubor molekul sekretovaných živými buňkami. Proteiny sekretomu hrají klíčovou roli v buněčné signalizaci, komunikaci a migraci [23], a proto jejich identifikace může výrazně napomoci porozumění těmto mechanismům.

Protože se sekretované proteiny dostávají do krve, je studium sekretomu konkrétního typu buněk na úrovni organismu nemožné a je proto za tímto účelem nutné využít buněčných kultur. Přípravu vzorků jejich sekretomu však doprovází mnoho problémů, se kterými se musíme vypořádat. Jedná se o maskování sekretovaných proteinů nebo jejich kontaminaci proteiny cytoplazmatickými či jinými, za normálních okolností nesekretovanými, jakožto i maskování proteiny sérovými. Za tímto účelem je možné využít inkubace buněk v bezsérovém médiu [23]. Je však důležité mít na paměti, že nepřítomnost séra, jakožto zdroje látek pro metabolismus buňky, působí metabolický stres, díky kterému mohou buňky zpomalit své rozmnožování [24] a současně aktivovat apoptotické dráhy [25], nebo naopak vyvolat přenos signálu a genovou expresi umožňující přežití buňky až její nádorový růst [26]. V každém případě však mají podmínky, ve kterých je buněčná kultura pěstována, rozhodující vliv na složení buněčného sekretomu a před každou proteomickou analýzou by měly být provedeny předběžné studie zaměřené na vliv nedostatku séra na buňky [23].

Při přípravě vzorků sekretomu se většinou využívá postupů, při kterých jsou buňky kultivovány v médiu obsahujícím určitý podíl fetálního hovězího séra (FBS), a to až do doby, než se rozmnoží do požadovaného množství. Následně jsou několikrát promyty bezsérovým médiem, v tomto médiu inkubovány při zvýšené teplotě (37 °C) po dobu přibližně jednoho až několika dní, přičemž médium je během této doby v určitých časových intervalech měněno. Následně je přistoupeno k dalším postupům nezbytným pro přípravu vzorků sekretovaných proteinů [23]. Přesné podmínky a okolnosti práce závisí na typu buněk, se kterými pracujeme.

1. 4 Jaterní buňky (hepatocyty)

Játra jsou největší žláza v těle, která má mnoho složitých funkcí. Hlavní typ jaterních buněk, hepatocyty, hrají ústřední roli při metabolickém zpracování živin. Podílejí se na skladování a řízení metabolismu sacharidů, detoxikaci mnoha látek a toxinů, tvorbě plazmatických proteinů, metabolismu tuků a mnohém dalším [27, 28].

Lepší znalost funkce hepatocytů v organismu může významně napomoci nejen pochopit úlohu jater v organismu jako celku, ale i při identifikaci možných biomarkerů,

objaňování procesu odbourávání léčiv a získávání dalších cenných medicínských poznatků [28].

Při analýze sekretomu hepatocytárních buněk se využívá dvou typů buněčných kultur – primárních kultur hepatocytů nebo tzv. permanentních linií. V druhém případě jde o buňky odvozené obvykle z nádorů, u kterých se vyskytují spontánní mutace vedoucí k onkologickým změnám. Takové buňky mohou růst neomezeně dlouhou dobu [29].

V našem experimentu jsme využívali kulturu primárních hepatocytů (jaterní buňky odebrané pacientům většinou při méně závažných chirurgických zákrocích, např. odebrání nezhoubného nádoru), které slouží jako univerzální materiál pro *in vitro* výzkum. Je však nutné vypořádat se s jejich dediferenciací, ke které začíná docházet již během izolace hepatocytů a která při následné kultivaci buněk způsobuje ztrátu jejich funkčnosti [30], což je nutno brát v úvahu při interpretaci výsledků. Primární hepatocyty přežívají v tkáňové kultuře jen omezenou dobu, a proto nelze provádět experimenty vyžadující dlouhodobější inkubace. Primární hepatocyty jsou však modelovým systémem velmi blízkým reálným játrům a vzhledem k soudobému trendu omezování experimentů na zvířatech lze předpokládat, že jejich využití ve výzkumu funkcí jater bude nadále nabývat na významu.

2 CÍL PRÁCE

- Porovnání dvojrozměrných elektroforetických map sekretomu jaterních buněk, vystavených zvýšené koncentraci homocysteinu, a jaterních buněk v prostředí bez přidaného homocysteinu.
- Identifikace rozdílně sekretovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

3 MATERIÁL

CHEMICKÝ MATERIÁL

William's E medium with Glutamaxem - Biopredic, Francie

Homocystein – Fluka, USA

„IPG stripy“ – GE Healthcare, Švédsko

Elektrodové polštářky – Bio-Rad, USA

ReadyPrep Overlay agarose – Bio-Rad, USA

Precision Plus Protein Standards, Unstaied – Bio-Rad, USA

Trypsin pro MS – Promega, USA

Ostatní běžné chemikálie jako akrylamid, jodacetamid, SDS, močovina atd. byly dodány firmami Sigma (USA) a Fluka (Švýcarsko).

Při přípravě pufrů byla používána deionizovaná voda MilliQ.

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Primární kultura hepatocytů – Biopredic, Francie

POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Inkubátor – CO₂ Incubator MCO 18AIC, Sanyo, Japonsko

Centrifugy – Hettich Universal 320, Schoeller, Německo

Trigon-Plus, Jouan , USA

Přístroj na IEF – PROTEAN IEF Cell, Bio-Rad, USA

Nádoba na nalévání gelů – MP3 MULTI-GEL CASTING CHAMBER, Bio-Rad, USA

Nádoba používaná při SDS-PAGE – PROTEAN II xi Cell, Bio-Rad, USA

Zdroj používaný při SDS-PAGE – POWER PAC 1000, Bio-Rad, USA

Spektrofotometr – 6105 U.V/VIS. Spectrophotometer, Jenway, UK

Skener – GS-800 Calibrated Densimeter, Bio-Rad, USA

Software pro analýzu gelů – PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software, Bio-Rad, USA

Termoshaker – Thermomixer Comfort, Eppendorf, Germany

Přístroj na zahušťování roztoků – SpeedVac Concentrator , Thermo Fisher Scientific, USA

Hmotnostní analyzátor – TripleTOF™ 5600 System , AB SCIEX, USA

System na rozdělení peptidů – Ultimate 3000, Thermo, Německo

Záchytná kolona – Acclaim PepMap100 C18 3 µm particles, 75 µm x 2 cm, Thermo,
Německo

Separáčnická kolona – Acclaim PepMap RSCL C18 2 µm particles, 75 µm x 15 cm, Thermo,
Německo

Software na zpracování dat získaných MS - ProteinPilot™ Software 4.0, Thermo, Německo

4 METODY

4.1 Zpracování buněk, příprava vzorků

Jaterní buňky (hepatocyty), objednané od firmy Biopredic, Francie, byly izolovány dne 3.6. 2011 a 7.6. 2011 byly převzaty naší laboratoří a přendány do inkubátoru (5% CO₂, 37 °C).

Buňky byly pěstovány na dvou destičkách (1, 2) o šesti jamkách (*obrázek 2*), na které byly nasazeny v hustotě $1,8 \cdot 10^6$ buněk na jamku. Dne 7. 6. 2011 bylo vyměněno médium, buňkám ve dvou jamkách na destičce č. 1 bylo dodáno po 2 ml čistého živného média William's E medium s glutamaxem (Biopredic, Francie) obohaceným o 100 IU/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 4 µg/ml hovězí insulin a 50 µM hemisukcinát hydrokortisonu (kontrola K1), buňkám ve zbylých dvou jamkách na stejné destičce bylo dodáno stejné množství shodného živného média s přidáním 2mM homocysteinem. S destičkou č. 2 bylo naloženo stejným způsobem (K2, H2).

K1	H1		K2	H2	
K1	H1		K2	H2	

Obrázek 2: Schématické znázornění destiček 1 a 2 s jaterními buňkami s 2 ml živného média bez (K) nebo s (H) přidáním homocysteinem (2mM).

Po 24 hodinách a následně 48 hodinách bylo médium buňkám odebráno, vždy pro dvě analogické jamky (K1 + K1, K2 + K2 atd.) spojeno ve Falkonově zkumavce a nahrazeno 2 ml příslušného média nového.

Odebrané médium bylo krátce centrifugováno (5 min, 140 x g, Hettich Universal 320, Schoeller, Německo) pro odstranění případně uvolněných buněk. 100 µl z každého vzorku bylo odebráno pro následné stanovení bílkovin. Proteiny byly vysráženy z média acetonitrilem (ACN) - 1 díl ACN na 1 díl média (doba srážení 1 hodina při laboratorní teplotě 22 °C). Vzniklé roztoky byly centrifugovány (20 min, 4000 x g, Trigon-Plus, Jouan, USA). Vysrážené proteiny byly rozpuštěny ve 200 µl (promytí pomocí 2x 100 µl) rehydratačního lyzačního pufru pro izoelektrickou fokusaci (RLB) složeného ze 7M močoviny, 2M thiomčoviny, 4% (w/v) CHAPS, 50 mM DTT a 0,8% (v/v) amfolytů o pH 3-10.

Spojením vzorků získaných po 24 hodinách s analogickými vzorky získanými po 48 hodinách vznikly vzorky konečné (K; proteiny sekretované lidskými hepatocyty a H; proteiny sekretované lidskými hepatocyty vystavenými 2mM koncentraci homocysteinu), které byly dále analyzovány pomocí 2-DE.

4.2 Stanovení množství proteinů

Množství proteinů obsažených ve vzorcích bylo stanoveno metodou podle Bradfordové [31] (očekávaná koncentrace 1-12 μg proteinů/100 μl roztoku). Ke 100 μl každého vzorku bílkovin byl přidán 1 ml Bradfordova činidla (pro každý vzorek provedeno 2x). Následně byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm (6105 U.V/VIS. Spectrophotometer, Jenway, UK). Obě hodnoty absorbance byly pro jednotlivé vzorky zprůměrovány a koncentrace proteinů byla odečtena z kalibrační křivky sestavené pro hovězí sérový albumin. Na základě získané koncentrace bílkovin v jednotlivých vzorcích byla určena množství vzorků potřebná pro 2-DE analýzu.

4.3 Dvojrozměrná elektroforéza

Sekretované proteiny z jaterních buněk byly analyzovány pomocí 2-DE.

4.3.1 První rozměr elektroforézy

4.3.1.1 Aktivní rehydratace

Vzorky byly nejprve inkubovány v RLB. Za analytickým účelem (příprava gelů pro analýzu rozdílů mezi K a H) bylo 50 μg proteinů smícháno s 330 μl RLB. Za účelem preparativním (gely určené pro vyřezání proteinů pro identifikaci změněných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie) bylo 300 μg proteinů přesráženo z původního roztoku pomocí ACN (kapitola 4.1.) a takto zkoncentrovaný vzorek byl rozpuštěn v 330 μl RLB.

Každý vzorek byl nanesen do jednoho žlábků pro izoelektrickou fokusaci tak, že byl rozprostřen v celém prostoru mezi dvěma elektrodami. Následně byl na každý vzorek položen 18cm nelineární „IPG strip“ o pH rozmezí 3-10 (GE Healthcare, Švédsko), vždy gelem dolů. Vzorky se nechaly stát 20 minut při laboratorní teplotě a po uplynutí této doby byly „IPG stripy“ převrstveny 2 ml minerálního oleje.

Aktivní rehydratace probíhala 12 hodin (přes noc) při teplotě 20°C a napětí 50 V. „IPG stripy“ byly podloženy elektrodovými polštářky (Bio-Rad, USA) a následně byla spuštěna fokusace.

4.3.1.2 Izoelektrická fokusace

Fokusace probíhala v pěti krocích, jejichž průběh je popsán v *tabulce 1*. K ukončení izoelektrické fokusace došlo při dosažení 40000 Vh.

Tabulka 1: Průběh napětí při izoelektrické fokusaci

Krok	počáteční napětí [V]	konečné napětí [V]	čas [hod]	teplota [°C]
1	250	250	1	20
2	250	500	1	20
3	500	1000	2	20
4	1000	10000	3	20
	napětí [V]	volthodin [Vh]	čas [hod]	teplota [°C]
5	10000	40000		20

4.3.1.3 Ekvilibrace

„IPG stripy“ po fokusaci byly po dobu 30 minut ekvilibrovány v roztoku obsahujícím 6M močovinu, 20% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS; 0,05M Tris HCl o pH 8.8 a 2% (v/v) DTT, čímž došlo k redukci volných thiolových skupin. Dalších 30 minut byly „IPG stripy“ ekvilibrovány ve stejném roztoku, v němž byl DTT vyměněn za 2,5% (w/v) jodacetamid, přičemž asi po 25 minutách byl do každého žlábků s „IPG stripem“ přidán 1 µl 1% roztoku bromfenolové modři.

4.3.2 Druhý rozměr elektroforézy (SDS-PAGE)

Používány byly 12% polyakrylamidové gely o rozměrech 18 x 18 cm. Nalévány byly po osmi v MP3 MULTI-GEL CASTING CHAMBER (Bio-Rad, USA). Protože elektroforézu bylo možno během jednoho dne nechat proběhnout pouze na čtyřech gelech, zbylé gely byly do dalšího dne ponechány v MilliQ vodě a uloženy v chladu (4 °C).

Roztok na přípravu osmi gelů byl připravován podle *tabulky 2* (str. 19).

Tabulka 2: Schéma pro přípravu polyakrylamidového gelu ve množství dostačujícím na přípravu osmi 12% elektroforetických gelů o rozměrech 18 x 18 cm.

1.	MilliQ	118 ml	
2.	Akrylamid	144 ml	30% akrylamidový mix (29,2 % akrylamid; 0,8 % bisakrylamid)
3.	Tris/HCl	91 ml	1,5M pufr pH = 8,8
4.	SDS	3,6 ml	10% roztok
5.	APS	3,6 ml	10% roztok
6.	TEMED	144 μ l	

Doba nutná pro tuhnutí gelu byla asi 1 hodina, před tuhnutím byly gely převrstveny 50% roztokem methanolu. Po ztuhnutí byl na každý z gelů nalit řadící gel připravený podle tabulky 3.

Tabulka 3: Schéma pro přípravu řadícího gelu v množství dostačujícím na čtyři polyakrylamidové gely připravené podle tabulky 2.

1.	MilliQ	22 ml	
2.	Akrylamid	5,2ml	30% akrylamidový mix (29,2 % akrylamid; 0,8 % bisakrylamid)
3.	Tris/HCl	4 ml	0,5M pufr pH = 6,8
4.	SDS	320 μ l	10% roztok
5.	APS	320 μ l	10% roztok
6.	TEMED	32 μ l	

Zároveň byly připraveny gely o rozměrech 8 x 8,5 cm pro porovnání množství proteinů ve vzorcích sekretomu buněk po 24 a 48 hodinách. Použity byly 7cm lineární „IPG stripy“ o pH rozmezí 3-10. Na každý gel bylo nanášeno 10 μ g vzorku.

4.3.2.1 Průběh SDS-PAGE

Každý z „IPG stripů“ byl „nalepen“ na jeden gel a převrstven ReadyPrep Overlay agarosou (Bio-Rad, USA). Do žlábků na standardní proteiny v každém gelu byl nanesen 1 μ l roztoku Precision Plus Protein Standards, Unstained (Bio-Rad, USA). Gely byly kvůli ztuhnutí agarosy ponechány asi 5 minut v chladu (4 °C).

SDS-PAGE probíhala v 0,025M Tris/0,192M glycinovém elektrodozem pufru s 0,1% (w/v) SDS po dobu 1 hodiny při 16 mA/gel a následně při 24 mA/gel až do doby, než linie bromfenolové modři dosáhla spodku gelu (cca 5-6 hodin).

4.4 Detekce proteinů v gelu

Analytické gely byly vizualizovány pomocí dusičnanu stříbrného [32], preparativní gely byly vizualizovány pomocí Coomassie G-250 [33].

4.5 Vyhodnocování gelů

Gely byly naskenovány pomocí GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, USA) při rozlišení 400 dpi a vyhodnocovány programem PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software (Bio-Rad, USA). Soubor pro analýzu byl složen ze čtyř gelů skupiny K (kontrola) a čtyř gelů skupiny H (inkubace s 2 mM homocysteinem). Ve vytvořeném analytickém souboru („match-set“) byly programem detekovány skvrny („spoty“) a vzájemně přiřazeny ve skupinách gelů. Kvantifikace skvrn byla normalizována na celkovou intenzitu v příslušném gelu. Detekce skvrn a jejich označování bylo prováděno automaticky programem a následně kontrolováno ručně.

Proteiny odpovídající skvrnám s průměrnou intenzitou větší než 500 ppm a minimálně trojnásobným rozdílem mezi intenzitami skvrn v porovnávaných skupinách gelů (K x H) s 95% pravděpodobností, vypočítanou Studentovým t-testem, byly označeny jako rozdílně sekretované proteiny. Tyto proteinové skvrny byly následně vyříznuty z preparativních gelů a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

4.6 Identifikace vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich příprava

Vzorky proteinů, které byly na základě předchozí analýzy určeny k identifikaci, byly vyřezány z preparativních gelů. Vyřezávání bylo prováděno ručně. Vyřezané kousky gelů se vzorky proteinů byly před dalším zpracováním uchovávány v mikrozkuvkách typu Eppendorf v MilliQ vodě.

4.6.1 Odbarvování a štěpení vzorků pro MS

MilliQ voda byla ze všech mikrozkušavek se vzorky odsáta a do každé mikrozkušavky bylo následně pipetováno 200 μ l odbarvovacího roztoku (20% (w/v) bikarbonát amonný v 50% ACN), se kterým byly vzorky po dobu 30 minut (30 °C, 600 rpm) protřepávány (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Německo), Postup byl opakován do úplného odbarvení gelů. Následně byly gely vysušeny pomocí 200 μ l 100% ACN.

K vysušeným vzorkům bylo pipetováno 20 μ l roztoku trypsinu, který byl složen z 40% (w/v) trypsinu v kyselině octové a 0,2% (w/v) bikarbonátu amonného v MilliQ vodě v poměru 1:19. Vzorky byly s trypsinem po dobu 18 hod protřepávány na termoshakeru (37 °C, 600 rpm).

4.6.2 Extrakce vzorků z gelu

Roztok trypsinu byl z mikrozkušavek s gelem se vzorky kvantitativně odsát a přemístěn do čistých mikrozkušavek typu Eppendorf. Do původních mikrozkušavek s gelem bylo přidáno vždy po 50 μ l roztoku 1 (*tabulka 4*), vzorky byly potom 10 minut sonikovány v lázni s ledem. Po sonikaci byl roztok 1 kvantitativně odsát a spojen vždy s roztokem trypsinu v analogické mikrozkušavce. Shodný postup byl opakován jak s roztokem 2, tak s roztokem 3 (*tabulka 4*). Spojené extrakty byly zahuštěny (SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher Scientific, USA). Peptidy vzniklé trypsinovým štěpením z proteinů určených k identifikaci byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Tabulka 4: Složení roztoků 1, 2 a 3 pro extrakci vzorků proteinů z gelu za účelem identifikace hmotnostní spektrometrií.

	2% TFA	60% ACN
Roztok 1	30 μ l	20 μ l
Roztok 2	20 μ l	30 μ l
Roztok 3	-	50 μ l

4.6.3 Identifikace proteinů pomocí MS

Směs peptidů získaná po štěpení trypsinem byla analyzována na přístroji TripleTOF™ 5600 System (AB SCIEX, USA). Peptidy byly rozděleny v systému Ultimate 3000 (Thermo, Německo). Byla použita záchytná kolona Acclaim PepMap100 C18 3 μ m

particles, 75 μm x 2 cm (Thermo, Německo) a separační kolona Acclaim PepMap RSCL C18 2 μm particles, 75 μm x 15 cm (Thermo, Německo).

Peptidy byly separovány pomocí lineárního gradientu od 5 do 95% ACN v 0,1% kyseliny mravenčí po dobu 42 minut při průtokové rychlosti 300 nl/min. Přístroj TripleTOF pracoval metodou informačně závislého sbírání dat. Spektra byla sbírána po 250 ms při rozlišení $>30\,000$ a následně 25 nejintenzivnějších peptidů z každého cyklu bylo fragmentováno (kumulace po 100 ms s citlivostí $>15\,000$ s využitím kolizní energie 35 ± 10 V. Data byla zpracována pomocí ProteinPilot™ Software 4.0 (Thermo, Německo).

Proteiny byly identifikovány pouze na základě několikačetných peptidových sekvencí, přičemž každý peptid byl identifikován s pravděpodobností minimálně 95 %. Pro vyhledávání proteinů byla použita databáze „UniProtKB/Swiss-Prot“ dostupná v říjnu 2011 [34].

5 VÝSLEDKY

5.1 Množství proteinů sekretovaných primárními jaterními hepatocyty

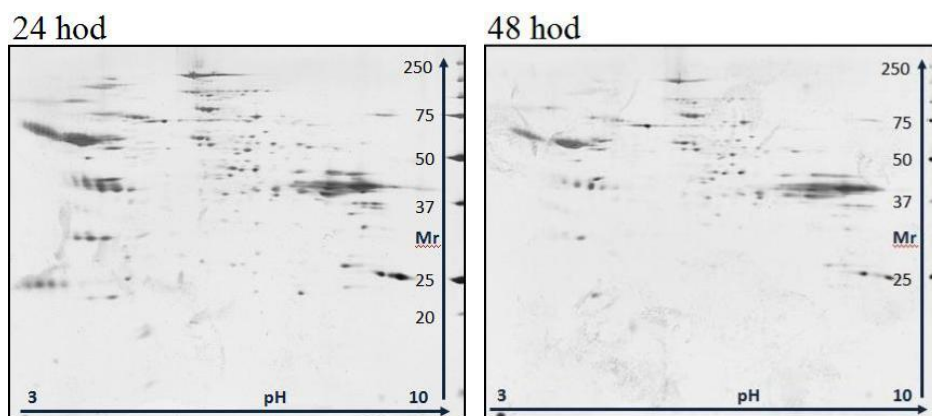
Množství proteinů ve vzorcích sekretomu bylo stanovováno z důvodu určení nanášky pro 2-DE analýzu a kvůli sledování výtěžku srážení proteinů z média. Proteiny byly určovány nejprve v médiu odebraném buňkám a následně v médiu po přesrážení pomocí ACN. Toto bylo provedeno jak pro vzorky odebrané po 24 hodinách, tak pro vzorky odebrané po 48 hodinách. Množství proteinů v jednotlivých vzorcích (K1, K2, H1, H2) jsou uvedena v tabulce 5.

Tabulka 5: Množství proteinů ve vzorcích sekretovaných proteinů primárními jaterními hepatocyty před a po srážení pomocí ACN.

	m(celk.) [μg]	m(sraž.) [μg]
24 hod		
K1	226	156
K2	259	211
H1	296	210
H2	284	209
48 hod		
K1	225	144
K2	275	196
H1	209	136
H2	225	144

Ve všech případech bylo získáno cca 250 μg proteinů na jamku (po přesrážení cca 150-200 μg).

Byly připraveny malé gely ze vzorků odebraných po 24 hodinách a 48 hodinách. Nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi proteiny sekretovanými první a druhý den (obrázek 3). Proto byly vzorky odebrané po 24 hodinách a 48 hodinách spojeny.



Obrázek 3: 2-DE mapy sekretomu hepatocytárních buněk po 24 (vlevo) a 48 (vpravo) hodinách. Hodnoty molekulových hmotností jsou uváděny v kD.

5.2 Analytické gely

Pro každou ze skupin K1, K2, H1 a H2 byly připraveny dva 2-DE gely – celkem tedy bylo porovnáváno 8 gelů, z nichž 4 byly kontrolní a další 4 pro buňky vystavené 2mM homocysteinu. Příprava některých gelů musela být kvůli jejich nedostatečné kvalitě opakována.

Gely byly vyhodnocovány pomocí programu PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software (Bio-Rad, USA), přičemž na každém gelu bylo průměrně detekováno 318 ± 3 spotů.

Korelační koeficienty (míra podobnosti dvou gelů) mezi každými dvěma gely jsou uvedeny v *tabulce 6*.

Tabulka 6: Korelační koeficienty mezi každými dvěma analyzovanými 2-DE gely. Šedě jsou vyznačeny koeficienty pro případ, kdy oba dva gely spadají vždy buď do skupiny K, nebo H.

	H1-1	H1-2	H2-1	H2-3	K1-2	K1-3	K2-1	K2-2
H1-1	1	0,919	0,865	0,893	0,810	0,749	0,708	0,713
H1-2	0,919	1	0,838	0,858	0,767	0,743	0,656	0,706
H2-1	0,865	0,838	1	0,929	0,838	0,848	0,840	0,861
H2-2	0,893	0,858	0,929	1	0,858	0,832	0,832	0,833
K1-1	0,810	0,767	0,838	0,858	1	0,839	0,856	0,837
K1-2	0,749	0,743	0,848	0,832	0,839	1	0,855	0,894
K2-1	0,708	0,656	0,840	0,832	0,856	0,855	1	0,928
K2-2	0,713	0,706	0,861	0,833	0,837	0,894	0,928	1

Z tabulky je zřejmé, že korelační koeficienty, které patří gelům spadajícím vždy do stejné ze skupin K nebo H, jsou obecně vyšší než koeficienty vyskytující se v případech, kdy jeden z gelů spadá do skupiny K a druhý do skupiny H (průměrné hodnoty korelačních koeficientů pro jednotlivé případy jsou uvedeny v *tabulce 7*).

Tabulka 7: Průměrné hodnoty korelačních koeficientů 2-DE gelů pro případy, kdy 1. oba porovnávané gely patřily do skupiny H; 2. oba porovnávané gely patřily do skupiny K a 3. jeden z gelů patřil do skupiny H a druhý do skupiny K.

1.	Oba gely spadají do skupiny H	0,913 ± 0,06
2.	Oba gely spadají do skupiny K	0,901 ± 0,06
3.	Jeden gel spadá do skupiny H, druhý gel spadá do skupiny K	0,787 ± 0,06

Vysoké hodnoty korelačních koeficientů v rámci stejných skupin dokazují, že naše gely byly připraveny kvalitně a jsou navzájem porovnatelné. Naopak nižší koeficienty

v případě, kdy byly porovnávány gely, ze kterých jeden patřil do kontrolní skupiny a druhý do skupiny, kdy byly buňky sekretující proteiny vystaveny zvýšené koncentraci homocysteinu (2mM), poukazují na to, že při zvýšené koncentraci homocysteinu došlo v proteinovém složení sekretu buněk k výrazným změnám.

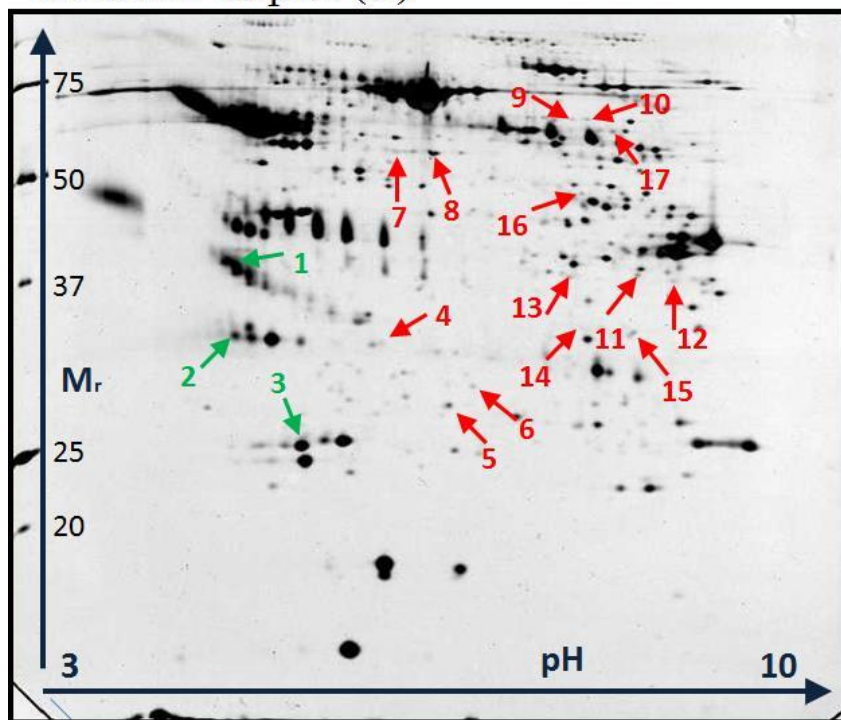
Proteinové mapy na preparativních gelech určených pro identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií odpovídaly mapám na analytických gelech.

5.3 Rozdílně sekretované proteiny

Skvrny na všech osmi 2-DE gelech byly podrobeny analýze programem PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software (Bio-Rad, USA), přičemž každá skvrna s průměrnou intenzitou větší než 500 ppm a minimálně trojnásobným rozdílem mezi skupinou K a H (určeno s 95% pravděpodobností), vypočítanou Studentovým t-testem, byla označena jako změněná. Kritéria splnilo 17 skvrn, které jsou vyznačeny na *obrázku 4* (str. 26)

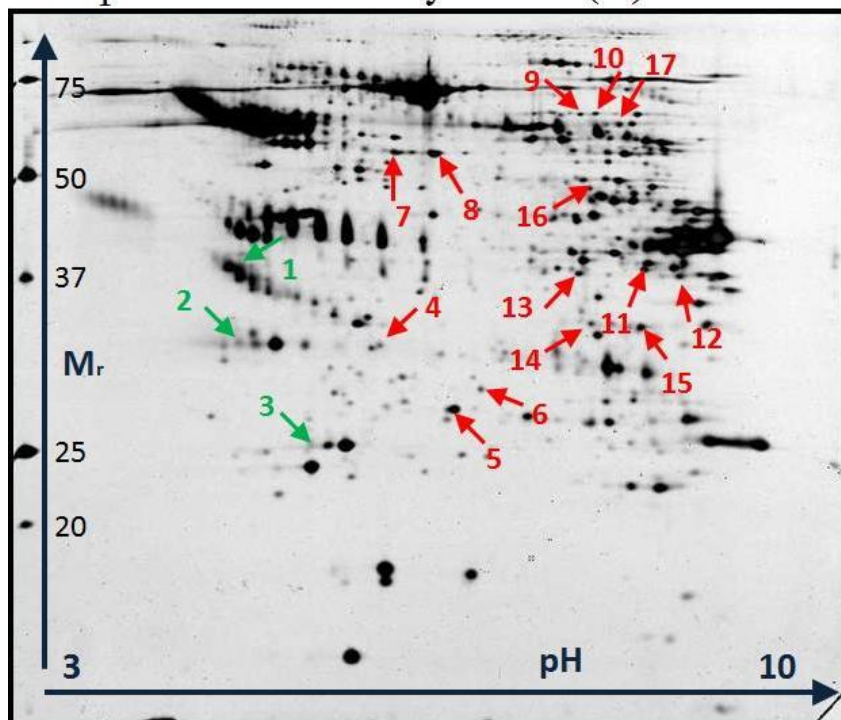
Proteiny v bazické oblasti gelu byly obecně nahromaděny více u sebe, proto bylo jejich označování a následná analýza komplikovanější, než jak tomu bylo u proteinů vyskytujících se při nižším pH. Již na první pohled byly na gelech viditelné některé ze změn mezi skupinami K a H.

Kontrolní skupina (K)



Obrázek 4: 2-DE mapy proteinů sekretovaných primárními lidskými hepatocyty. Červeně jsou označeny skvrny proteinů, které byly ve skupině H exprimovány zvýšeně, zeleně jsou označeny skvrny proteinů, které byly ve skupině H exprimovány sniženě. Hodnoty molekulových hmotností standardních proteinů jsou uváděny v kD.

Skupina s 2mM homocysteinem (H)



5.4 Identifikace proteinů

Proteiny byly identifikovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), při které je využíváno dvojí hmotnostní analýzy a proto tato metoda poskytuje velmi spolehlivé výsledky. Měření bylo provedeno na specializovaném pracovišti ÚOCHB AV ČR Dr. Zuzanou Demianovou, Ph.D.

Identifikované proteiny byly vyhledávány v proteinové databázi „UniProtKB/Swiss-Prot“, dostupné v říjnu 2011 [34]. Každý peptid byl identifikován s pravděpodobností minimálně 95 %. Výsledky identifikace změřených proteinů jsou uvedeny v *tabulce 8* (str. 28). Čísla proteinů odpovídají číslům skvrn použitým na *obrázku 4* (str. 26). Tabulka obsahuje také údaj o tom, jaká část ze sekvence celkově korespondovala s identifikovanými peptidovými štěpy (pokrytí).

Výsledkový protokol z databázového prohledávání obsahoval obvykle více proteinů identifikovaných s různou pravděpodobností a bylo nutno pečlivě prohledávat seznam proteinů a posuzovat uvedené parametry identifikace. Vždy byly přítomny fragmenty trypsinu vzniklé autolýzou, dále protein použitý pro kalibraci přístroje (β -galaktosidasa z *E. coli*) a cytokeratiny z kůže, které jsou stabilně přítomny v MS analýzách kvůli nezbytné manipulaci se vzorky. Některé peptidy z velkých skvrn mohly přecházet do následující analýzy z důvodu nedostatečného odmytí z kolony, ty pak ovšem měly nižší pokrytí sekvence. Protein úspěšně identifikovaný z gelu měl obvykle vysoké pokrytí sekvence a velké množství sekvenovaných peptidů. Databázový vyhledávač nebyl omezen výběrem druhu (*Homo sapiens*), a proto byly vždy brány v úvahu lidské orthology daného proteinu.

Až na dva případy (klusterin a komplement C3) jsou hodnoty Mr a pI určené z gelů porovnatelné s hodnotami teoretickými. V případě klusterinu se liší jak hodnoty pI (změřená hodnota 5,00; teoretická hodnota 5,89), tak hodnoty Mr (změřená hodnota 38,0; teoretická hodnota 50,00). Jedná se o glykoprotein [35], který kvůli nebilkovinnému (sacharidovému) příspěvku ve své struktuře neputuje v průběhu 2-DE podle svého pI a Mr. I v případě komplementu C3 se liší jak hodnoty Mr (změřená hodnota 35,0; teoretická hodnota 185,00), tak i hodnoty pI (změřená hodnota 5,00; teoretická hodnota 6,00). Identifikované peptidové fragmenty se nacházejí po celé délce sekvence komplementu C3, a proto můžeme zcela vyloučit, že se jednalo o jeho fragment. Nejsme schopni s konečnou jistotou říci, z jakého důvodu se změřené a teoretické hodnoty Mr a pI lišily, kvůli jejich velkému rozdílu však není identifikace komplementu C3 považována za důvěryhodnou.

Ve dvou případech (aldehyddehydrogenasa a fosfoglukomutasa) se stejný protein vyskytuje ve dvou skvrnách. Jedná se o častý jev, kdy se protein na gelech vyskytuje ve dvou (či více) izoformách.

Tabulka 8: Identifikované proteiny rozdílně sekretované z lidských hepatocytů vlivem 2mM homocysteinu oproti hepatocytům v prostředí bez přidaného homocysteinu. Č. – číslo odpovídající číslům použitým k označení jednotlivých skvrn na obrázku 4 (str. 26),

ID – identifikační číslo proteinu v databázi „UniProtKB/Swiss-Prot“ [34]

Mr (zm.) – molekulová hmotnost odhadnutá z gelu; **Mr (teor.)** – teoretická molekulová hmotnost vypočtená na základě sekvence proteinu; **pI (zm.)** – izoelektrický bod odhadnutý z gelu; **pI (teor.)** – teoretický izoelektrický bod charakteristický pro daný protein;

Pokrytí – část sekvence daného proteinu, která byla rozpoznána hmotnostním spektrometrem;

H – průměrná denzita skvrny určená z jednotlivých denzit 4 gelů skupiny H;

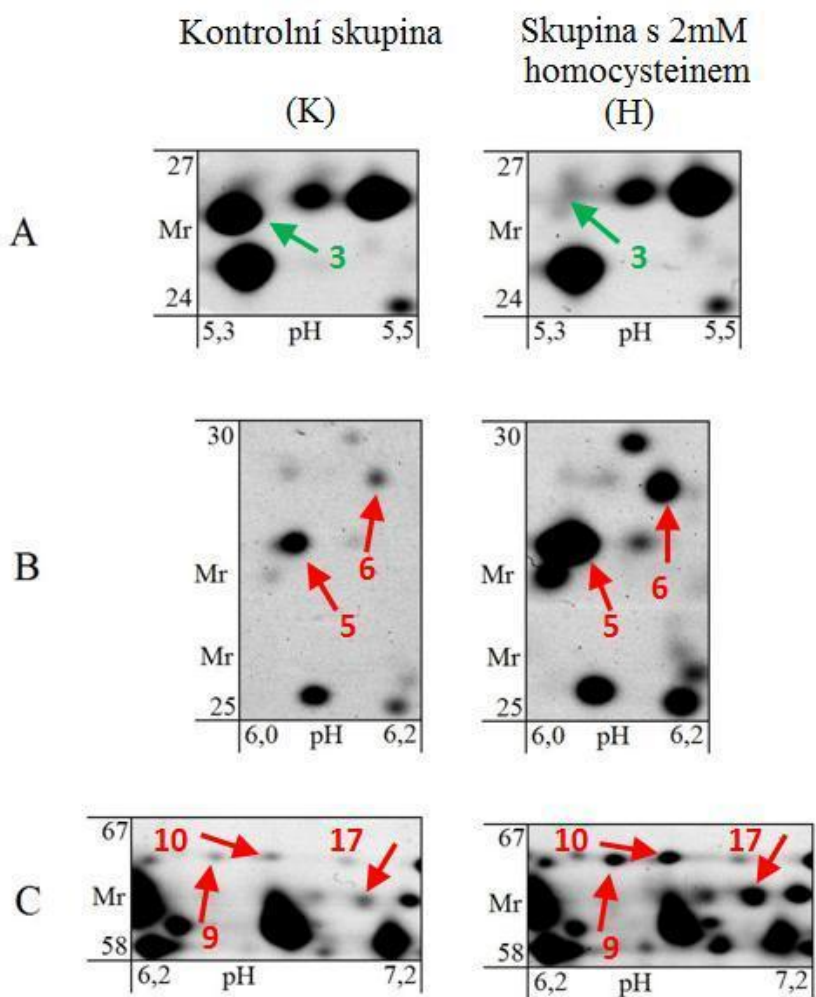
K – průměrná denzita skvrny určená z jednotlivých denzit 4 gelů skupiny K; **H/K** - poměr H a K udávající míru změny; **U** („up-regulated“) – denzita skvrny byla větší u skupiny H;

D („down-regulated“) – denzita skvrny byla větší u skupiny K.

č.	Jméno proteinu	ID	Mr (zm.)	Mr (teor.)	pI (zm.)	pI (teor.)	Pokrytí [%]	H	K	H/K	U / D
1	Klusterin	P10909	38,0	50,00	5,00	5,89	32	1598,4	5336,4	0,30	D
2	Komplement C3*	P01024	35,0	185,00	5,00	6,00	46	607,4	1759,7	0,35	D
3	Apolipoprotein A-I	P02647	26,0	28,07	5,30	5,27	47	322,5	7476,6	0,04	D
4	3-hydroxyizobutyryátdehydrogenasa	P31937	35,0	31,53	5,54	5,70	61	573,8	166,7	3,44	U
5	Enoyl-CoA hydratasa	P30084	28,0	28,34	6,00	5,88	52	4326,1	601,6	7,19	U
6	3,2-trans-enoyl-CoA izomerasa	P42126	29,0	28,73	6,10	6,00	38	693,4	198,7	3,49	U
7	Aldehyddehydrogenasa (mitochondriální)	P05091	52,0	54,44	5,80	5,69	79	1694,0	397,0	4,27	U
8	Aldehyddehydrogenasa (mitochondriální)	P05091	52,0	54,44	6,00	5,69	64	1989,1	342,8	5,80	U
9	Fosfoglukomutasa-1	P36871	65,0	61,32	6,30	6,32	69	512,3	160,8	3,19	U
10	Fosfoglukomutasa-1	P36871	65,0	61,32	6,60	6,32	68	683,9	217,5	3,14	U
11	Aldo-keto reduktasa, rodina 1, člen C2	P52895	38,0	36,73	7,50	7,13	72	1624,2	491,5	3,30	U
12	Aldo-keto reduktasa, rodina 1, člen C3	P42330	38,0	36,85	8,20	8,06	66	1867,6	468,9	3,98	U
13	Aldo-keto reduktasa, rodina 1, člen C4	P17516	38,0	37,07	6,45	6,46	76	1568,0	318,7	4,92	U
14	S-formylglutathionhydrolasa	P10768	35,0	31,46	6,50	6,54	70	656,0	147,3	4,45	U
15	Inzulin-like růstový faktor vázající protein 2	P18065	35,0	31,45	7,20	6,89	47	939,0	266,0	3,53	U
16	Glycinamidinotransferasa (cytoplazmatická)	P50440	47,0	44,88	6,70	6,61	61	656,7	215,5	3,05	U
17	Katalasa	P04040	60,0	59,62	6,90	6,95	70	916,3	292,3	3,13	U

* Identifikace proteinu není považována za důvěryhodnou.

Z 15 proteinů (odpovídajících 17 skvrnám) se ve 4 případech jedná o proteiny sekretované, ve 4 případech o proteiny mitochondriální, v 6 případech o proteiny cytoplazmatické a 1 z proteinů je obsažen v peroxisomech. Z hlediska funkce jde o proteiny obecně rozdílného charakteru. Na *obrázku 5* jsou znázorněny změny některých nalezených proteinů na výřezech z gelů.



Obrázek 5: Změny některých nalezených proteinů na výřezech z gelů. Použitá čísla odpovídají číslům skvrn na obrázku 4 (str. 26). Červeně jsou označeny skvrny proteinů, které byly ve skupině H exprimovány zvýšeně, zeleně jsou označeny skvrny proteinů, které byly ve skupině H exprimovány snižene. **A:** Apolipoprotein A-I (1); **B:** Enoyl-CoA hydratasa (5) a 3,2-trans-enoil-CoA izomerasa (6); **C:** Fosfoglukomutasa-1 (9, 10) a katalasa (17). Hodnoty molekulových hmotností jsou uváděny v kD.

Dva proteiny (glycinamidinotransferasa a S-formylglutathionhydrolasa) souvisí přímo s metabolismem methylové skupiny. Glycinamidinotransferasa katalyzuje vznik

guanidinoacetátu, což je substrát pro reakci GAMT [11, 36]. S-formylglutathionhydrolasa se podílí na detoxikaci formaldehydu, který vzniká při oxidaci sarkosinu a DMG zpět na glycin [37].

Dva z proteinů (fosfoglukomutasa a aldehyddehydrogenasa) souvisejí s metabolismem sacharidů. Fosfoglukomutasa katalyzuje přeměnu glukosa-1-fosfátu na glukosa-6-fosfát, čímž ho aktivuje pro vstup do glykolýzy [12]. Aldehyddehydrogenasa katalyzuje přeměnu aldehydové skupiny na karboxylát. Souvisí také s metabolismem alkoholů a degradací ethanolu [38].

Dva z proteinů (enoyl-CoA hydratasa a 3,2-trans-enoyl-CoA izomerasa) jsou enzymy β -oxidace. Enoyl-CoA hydratasa se účastní přímo odbourávání uhlíkatého skeletu acyl-CoA, zatímco 3,2-trans-enoyl-CoA izomerasa katalyzuje změnu polohy dvojné vazby acyl-CoA z polohy 3 do polohy 2, díky čemuž může následně acyl-CoA do β -oxidace vstoupit [12].

Čtyři z proteinů jsou enzymy detoxikační (aldo-keto reduktasy a katalasa). Aldo-keto reduktasy rodiny 1 skupiny C se podílí na metabolizaci látek jako jsou reaktivní aldehydy, prostaglandiny, steroidní hormony, chemické karcinogeny a léčiva [39]. Katalasa, enzym obsažený v peroxisomech, se účastní rozkladu peroxidu vodíku, který je vedlejším produktem mnoha metabolických dějů a musí být rychle odbouráván pro své oxidační vlastnosti [12].

3-hydroxyizobutyrylaldehydrogenasa se účastní metabolismu aminokyselin – jedná se o enzym esenciální pro metabolismus valinu [40].

Zbylé proteiny jsou proteiny sekretované. Inzulin-like růstový faktor vázající protein 2 se podílí na zastavení buněčného růstu [41]. Apolipoprotein A-I se účastní transportu cholesterolu [42]. Změny v homeostázi cholesterolu zcela jistě souvisí s chorobami kardiovaskulárního systému. Klusterin je glykoprotein účastnící se širokého spektra biologických procesů. Mimo jiné má funkci jako extracelulární chaperon, který zabraňuje stresem způsobenému hromadění denaturovaných plazmatických proteinů [35].

6 DISKUSE

V rámci práce byly porovnávány 2-DE mapy sekretomu hepatocytárních buněk a sekretomu stejných buněk vystavených 2mM koncentraci homocysteinu. Charakterizace proteinů buněčného sekretomu a jejich porozumění může výrazně napomoci při objasňování klíčových buněčných dějů při hyperhomocysteinemii.

Analýza sekretomu se potýká s řadou problémů, a to hlavně během přípravy vzorku [23]. Jedním z limitujících faktorů je nízká koncentrace sekretovaných proteinů v médiu a problematika jejich zahuštění pro další analýzu. U vzorku sekretomu hepatocytárních buněk tento problém však nebyl tak závažný (*tabulka 5*, str. 23), protože syntéza a sekrece proteinů je hlavní funkcí jaterních buněk [27].

V našem případě bylo množství proteinů ve vzorku po vysrážení ACN o něco menší než množství proteinů přítomné v tom samém vzorku před srážením, tzn. v médiu odebraném buňkám (*tabulka 5*, str. 23). Tento fakt byl pravděpodobně způsoben nedokonalým vymytím vzorku po srážení ze zkumavek – vzorky byly velmi viskózní a ulpívaly na stěnách zkumavek. Proteiny o menší Mr navíc nejsou ACN sráženy [43], mohly proto zůstat v roztoku. Tyto proteiny však nebyly předmětem naší analýzy a 2-DE nebyla uzpůsobena pro jejich detekci. Množství proteinů po srážení ACN bylo v jednotlivých vzorcích porovnatelné – vždy okolo 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pro 2-DE analýzu bylo vždy použito 50 μl vzorku/gel při přípravě analytických gelů a 300 μg vzorku/gel při přípravě gelů preparativních.

Jak bylo předesláno, nevýhodou 2-DE je její pracnost a s tím spojená obtížná standardizace. K přípravě kvalitních velkých 2-DE gelů je potřeba určité zručnosti a pečlivosti. Jedná se o poměrně pracný a časově náročný postup a i přes dodržení veškerých pravidel a postupu přípravy dochází k řadě problémů, které se vyskytují jak při přípravě gelu (vznik vzduchových bublin, rychlé tunutí gelu), tak při průběhu každého z rozměrů (neproběhne izoelektrická fokusace, vznik sraženin) nebo při barvení proteinů. 2-DE mapy s nižší kvalitou mohou značně zkomplikovat až znemožnit analýzu celého souboru gelů. I při naší práci bylo nutné přípravu několika gelů a průběh 2-DE opakovat. Korelační koeficienty (*tabulka 6*, str. 24) mezi gely však v závěru nabývají takových hodnot, které ukazují vysokou kvalitu těchto gelů. Proto lze naši manuální práci označit za velmi úspěšnou.

Jako vyhodnocovací kritérium pro určení změněných proteinů je v proteomické analýze obvykle brána dvojnásobná změna intenzity skvrny mezi jednotlivými zkoumanými skupinami určená s 95% pravděpodobností. Vzhledem k velkým rozdílům mezi sekretomy kontrolních buněk a buněk vystavených 2mM homocysteinu bylo použito přísnější kritérium

(trojnásobná změna) k vyhledávání změn. Za použití tohoto kritéria byly analyzovány pouze skutečně markantní změny v obou 2-DE mapách.

Koncentrace homocysteinu (2mM) použitá v našem experimentu byla mnohonásobně vyšší než plazmatická koncentrace této látky vyskytující se při hyperhomocysteinemii (16-100 μM mírná a střední hyperhomocysteinemie, těžká hyperhomocysteinemie $> 100 \mu\text{M}$) v živých organizmech) [13]. Tato vyšší koncentrace byla zvolena za účelem simulovat chronickou hyperhomocysteinemii, což samo o sobě v buněčné kultuře nelze, protože možnost kultivace buněk je časově limitována.

Hyperhomocysteinemie je spojená se sníženou aktivitou enzymů zahrnutých v metabolismu homocysteinu, jako je CBS, MTHFR a MS [44]. Má vliv na biosyntézu cholesterolu a triacylglycerolů a jejich další osud v organismu [45], navíc snižuje biologickou dostupnost oxidu dusnatého [46], což má za následek zužování cév a zvyšování krevního tlaku. Homocystein se mimo jiné také podílí na vzniku silných oxidačních činidel, jako je peroxid vodíku [47], která způsobují buňkám oxidační stres.

Simulace a studium změn sekretomu hepatocytů v podmínkách hyperhomocysteinemie zatím nebyly provedeny. Byly však provedeny studie sekretomů buněk z hepatokarcinomu [48, 49] a analýza proteinového obsahu exosomů z primárních kultur [28]. Ve všech zmíněných pracích byly identifikovány kromě sekretovaných proteinů i proteiny vnitrobuněčné. Vzhledem k tomu, že v průběhu kultivace a při sklizení média dochází k rozpadu nebo rozbití buněk, může být přítomnost těchto proteinů v analýzách sekretomu artefaktem. Vnitrobuněčné proteiny jsou ovšem také aktivně uvolňovány z hepatocytů a mohou plnit specifické funkce v krvením oběhu [28]. Byla prokázána existence exosomů (30-150 nm velkých váčků formovaných v endoplazmatickém retikulu, zprostředkovávajících buněčnou sekreci intracelulárních proteinů) v hepatocytárních buňkách. Exosomy se podílejí na přenosu buněčného materiálu a signalizaci mezi buňkami a s největší pravděpodobností také na odstranění vedlejších produktů metabolismu [28].

V hepatocytech je syntetizováno a uvolňováno množství proteinů, které v krvi plní celou řadu především transportních funkcí (sérový albumin, haptoglobin, lipoproteiny atd.). Tyto proteiny byly identifikovány v nejvýraznějších skvrnách patrných na našich 2-DE mapách (*obrázek 4*, str. 26; informace od Mgr. Ireny Selicharové, Dr.). Z námi nalezených patnácti rozdílně exprimovaných proteinů byly pouze čtyři sekretované – z nich tři „down-regulated“ a jeden „up-regulated“. Snížená sekrece apolipoproteinu A-I, který transportuje cholesterol, může přímo souviset s rozvojem kardiovaskulárních chorob při

hyperhomocysteinemii [42]. Stejně jako snížení sekrece klusterinu může vést k zánětlivým procesům [35].

Vzhledem k výskytu poměrně velkého množství změn u vnitrobuněčných (cytoplazmatických, mitochondriálních) proteinů, kdy množství proteinu bylo ve všech případech zvýšeno ve skupině buněk vystavených 2mM koncentraci homocysteinu oproti skupině kontrolní, si nemůžeme být jisti, jestli buňky nebyly kvůli vysoké koncentraci homocysteinu vystaveny takovému stresu, že docházelo k jejich zániku a vylití buněčného obsahu do okolí. V určitém rozsahu mohl mít i tento faktor na konečné výsledky nějaký vliv, je však zvláštní, že velké množství těchto vnitrobuněčných proteinů nějakým způsobem souvisí s metabolismem lipidů nebo methylové skupiny a tedy s hyperhomocysteinemií. Vzhledem k dřívějšímu prokázání existence exosomů u hepatocytárních buněk a vnitrobuněčných proteinů v jejich sekretu [28] mohou být tyto proteiny aktivně sekretovány z buněk a lze soudit, že vliv zániku buněk nebyl takový, aby zcela zpochybnil výsledky našeho experimentu.

Vliv nižší koncentrace homocysteinu, než je koncentrace 2 mM (tedy koncentrace bližší hyperhomocysteinemii v živých organizmech [13]), na složení proteomu a sekretu hepatocytárních buněk je předmětem dalšího výzkumu laboratoře ÚOCHB AV ČR.

7 ZÁVĚR

Během práce bylo provedeno porovnání dvojrozměrných proteinových map sekretomu primárních hepatocytů, vystavených 2mM koncentraci homocysteinu, se sekretodem primárních hepatocytů v prostředí bez přidaného homocysteinu.

- 1) Byly připraveny
 - a) vzorky sekretomu hepatocytárních buněk vystavených 2mM koncentraci homocysteinu
 - b) vzorky sekretomu hepatocytárních buněk vystavených prostředí bez přidaného homocysteinu.

- 2) Vzorky byly podrobeny analýze dvojrozměrnou elektroforézou.

- 3) Proteiny ze skvrn splňující kritéria pro dostatečnou změnu v sekreci proteinu byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie – celkem se jednalo o 15 proteinů, odpovídajících 17 skvrnám na dvojrozměrných proteinových mapách. 3 z těchto proteinů byly v sekretomu buněk vystavených 2mM homocysteinu oproti kontrolní skupině exprimovány sniženě, 12 zvýšeně. Ve 4 případech šlo o proteiny sekretované, v 11 případech šlo o proteiny vnitrobuněčné.

SEZNAM LITERATURY

1. Dionisio, N., Jardín, I., Salido, G.M., Rosado, J.A: *Curr. Med. Chem.* **17**, 3109-3119 (2010).
2. Blom, H.J., Smulders, Y.: *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 75-81 (2011)
3. Butz, L.W., du Vigneaud, V: *Laboratory of Physiological Chemistry, University of Illinois, Urbana* (1932)
4. Williams, K.T., Schalinske, K.L.: *J. Nutr.* **137**, 311-314 (2007).
5. Stead, L.M., Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., Vance, D.E., Jacobs, R.L.: *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 5-10 (2006)
6. Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Irreverre, F., Laster, L.: *J. Biol. Chem.* **240**, 4382-4392 (1965).
7. Delgado-Reyes, C.V., Wallig, M.A., Garrow, T.A.: *Arch. Biochem. Biophys.* **393**, 184-186 (2001).
8. Yeo, E.J., Wagner, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 210-214 (1994)
9. Grillo, M.A., Colombatto, S.: *Amino Acids* **34**, 187-193 (2008)
10. Jacobs, R.L., Stead, L.M., Delvin, C., Tabas, I., Brosnan, M.E., Brosnan, J.T., Vance, D.E.: *J. Biol. Chem* **280**, 28299-28305 (2005)
11. Stöckler, S., Isbrandt, D., Hanefeld, F., Schmidt, B., von Figura, K.: *Am, J. Hum. Genet.* **58**, 914-922 (1996)
12. Voet, D., Voet J.G.: v knize Biochemistry, 4th Edition, John Wiley and Sons, Inc., U.S.A. (2011)
13. Ji, C., Kaplowitz, N.: *World J. Gastroenterol.* **10**, 1699-1708 (2004)
14. Matthews, R.G., Elmore, C.L.: *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 1700-1703 (2007)
15. Kovářová, H.: *Chem. Listy* **99**, 886-889 (2005)
16. Wilkins, M.R, Sanchez J.-C., Gooley A.A., Appel R.D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D.F., Williams K.L.: *Biotechnol. Genet. Eng.* **13**, 19-50 (1996)
17. O' Farrel, P.H.: *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021 (1974)
18. Scheele, G.A.: *J. Biol. Chem.* **250**, 5375-5385 (1975)
19. Klose, J.: *Humangenetik* **26**, 231-243 (1975)
20. Challapalli, K.K., Zabel, C., Schuchhardt, J., Kaindl, A.M., Klose, J., Herzel, H.: *Electrophoresis* **25**, 3040-3047 (2004)
21. Fenn, J.B., Mann, M., Meng C.K., Wong, S.F., Whitehouse C.M.: *Science* **246**, 64-71 (1989)
22. Karas, M., Hillenkamp, F.: *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301 (1988)

23. Makridakis, M., Vlahou, A.: *J. Proteomics* **73**, 2291-305 (2010)
24. Shin, J.S., Hong, S.W., Lee, S.L.O., Kim, T.H., Park, I.C., An, S.-K., Lee, W.K., Lim, J.S., Kim, K.I., Yang, Y., Lee, S.S., Jin, D.H., Lee, M.S.: *Int. J. Oncol.* **32**, 435-439 (2008)
25. Hasan, N.M., Adams, G.E., Joiner, M.C.: *Int. J. Cancer* **80**, 400-405 (1999)
26. Levin, V.A., Panchabhai, S.C., Shen, L., Kornblau, S.M., Qiu, Y., Baggerly, K.A.: *J. Proteome Res.* **9**, 179-191 (2009)
27. Ganong, W.F.: *Přehled lékařské fyziologie*, 1. české vydání, Avicenum, zdravotnické nakladatelství, ČR (1976)
28. Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Elortza, F., Lu, S.C., Mato, J.M., Falcon-Perez, J.M.: *J. Proteome Res.* **7**, 5157-5166 (2008)
29. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P.: *Molecular Cell Biology*, 6th Edition, W.H. Freeman and Company, U.S.A. (2008)
30. Vinken, M., Vanhaecke, T., Rogiers, V.: *Toxicol. In Vitro* **26**, 541-544 (2012)
31. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)
32. Rabilloud, T.: *Electrophoresis* **13**, 429-439 (1992)
33. Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G.: *Electrophoresis* **25**, 1327-33 (2004)
34. <http://www.uniprot.org> (říjen 2011)
35. Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B.: *Trends Biochem. Sci.* **25**, 95-98 (2000)
36. Gross, M.D., Eggen M.A., Simon, A.M., van Pilsum, J.F.: *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 747-755 (1986)
37. Uotila, L., Koivusalo, M.: *J. Biol. Chem.* **249**, 7664-7672 (1974)
38. Hempel, J., Höög, J.O., Jörnvall, H.: *FEBS Lett.* **222**, 95-98 (1987)
39. Barski, O.A., Tipparaju, S.M., Bhatnagar, A.: *Drug Metab. Rev.* **40**, 553-624 (2008)
40. Rougraff, P.M., Paxton, R., Kuntz, M.J., Crabb, D.W., Harris, R.A.: *J. Biol. Chem.* **263**, 327-331 (1988)
41. Firth, S.M., Baxter, R.C.: *Endocr. Rev.* **23**, 824-854 (2002)
42. Vollbach, H., Heun, R., Morris, C.M., Edwardson, J.A., McKeith, I.G., Jessen, F., Schulz, A., Maier, W., Kolsch, H.: *Ann. Neurol.* **58**, 436-441 (2005)

43. Kay, R., Barton, C., Ratcliffe, L., Matharoo-Ball, B., Brown, P., Roberts, J., Teale, P., Creaser, C.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 3255-3260 (2008)
44. Matthews, R.G., Elmore, C.L.: *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 1700-1703 (2007)
45. Werstuck, G.H., Lentz, S.R., Dayal, S., Hossain, G.S., Sood, S.K., Shi, Y.Y., Zhou, J., Maeda, N., Krisans, S.K., Malinow, M.R., Austin, R.C.: *J. Clin. Invest.* **107**, 1263-1273 (2001)
46. Tawakol, A., Omlad, T., Gerhard, M., Wu, J.T., Creager, M.A.: *Circulation* **95**, 1119-1121 (1997)
47. Starkebaum, G., Harlan, J.M.: *J. Clin. Invest.* **77**, 1370-1376 (1986)
48. Yamashita, R., Fujiwara, Y., Ikari, K., Hamada, K., Otomo, A., Yasuda, K., Noda, M., Kaburagi, Y.: *Moll. Cell. Biochem.* **298**, 83-92 (2007)
49. Slany, A., Haudek, V.J., Zwickl, H., Gundacker, N.C., Grusch, M., Weiss, T.S., Seir, K., Rodgarkia-Dara, C., Hellebrand, C., Gerner, C.: *J. Proteome Res.* 6-21 (2010)

