

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Marta Kolrosová

PROTEOMICKÁ STUDIE SPOJOVACÍ VRSTVY
DENTIN-ENAMEL

Proteomic study of the dentin-enamel junction layer

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Michal Jágr, Ph.D.

Konzultant: Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Praha 2017

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 19. května 2017.

Abstrakt

Tato práce měla za cíl identifikovat proteiny tenké spojovací vrstvy dentin-enamel (DEJ) přítomné v lidských zubech moudrosti. Byly vyzkoušeny tři různé metody analýzy. V jednom případě byly zuby demineralizovány v roztoku EDTA pufru, přičemž došlo k uvolnění proteinové vrstvy DEJ. V dalších dvou případech byly připraveny tenké řezy zubní tkáně a příslušná DEJ vrstva byla vyříznuta pomocí laserové mikrodisekce. Několika metodami byla zkoumána extrakce proteinů ze zkoumaných vzorků DEJ (pro srovnání i ze vzorků dentinu, enamelu). Extrahované proteiny byly štěpeny trypsinem na peptidy. Následně byly peptidy purifikovány pomocí Stage tips a analyzovány metodou nLC MS/ MS. Optimální metodou bylo ve vzorku DEJ nalezeno přes 40 různých proteinů např. apolipoproteiny, vimentiny, vitronektiny, clusteriny, biglykany.

Klíčová slova: proteomika, dentin-enamelová vrstva, laserová mikrodisekce, hmotnostní spektrometrie

Abstract

This thesis deals with the analysis of the dentin-enamel junction layer in human third molar teeth. Three different methods of analysis were tested. In the first one teeth were demineralized in EDTA buffer to release the protein layer DEJ. In the other two cases thin slits of dental tissue were prepared and from them the DEJ layer was cut using laser microdissection. Several methods were tested for extraction of proteins from DEJ samples (for comparison also from dentin and enamel samples). Extracted proteins were cleaved into peptides with trypsin. Subsequently, peptides were purified by Stage tips and analyzed by nLC MS/ MS. Using the optimal method over 40 different proteins, for example: apolipoproteins, vimentin, vitronectin, clusterin, biglycan were found in the sample DEJ.

Keywords: proteomics, dentin-enamel junction, laser microdissection, mass spectrometry

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce *RNDr. Michalu Jágrovi, PhD.* za cenné rady, odborné vedení a ochotu mi kdykoliv pomoci, své konzultance *Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc.* za připomínky a rady při sepisování práce. Děkuji také *Ing. Peterovi Ergangovi, PhD.* za pomoc a rady při manipulaci na laserové mikrodisekci. Dále bych chtěla poděkovat ostatním členům laboratoře za veškerou pomoc a vstřícnost. Také děkuji panu *prof. Ivanovi Mikšíkovi, DrSc.*, za to, že mi umožnil pracovat v Proteomické laboratoři Fyziologického ústavu AV ČR.

Obsah

1. ÚVOD.....	9
2. CÍL PRÁCE	11
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1. Proteomika.....	12
3.1.1 Proteomika enamelu.....	12
3.1.1.1 Amelogenin	13
3.1.1.2 Enamelin.....	13
3.1.1.3 Tuftelin	13
3.1.1.4 Ameloblastin	14
3.1.2 Proteomika dentinu	14
3.1.2.1 Dentinový sialofosfoprotein (DSPP).....	15
3.1.2.2 Dentinový matrix protein I (DMP1).....	15
3.1.3 Proteomika dentin- enamelové vrstvy (DEJ).....	15
3.1.4 Proteomika zubního cementu.....	16
3.1.4.1 Acelulární fibrilární cement.....	16
3.1.4.2 Celulární cement s vnitřními vlákny.....	16
3.1.5 Proteomika zubní dřeně.....	16
3.1.6 Proteomika pelikulární vrstvy	17
3.2 Metody proteomiky	17
3.2.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza (2- DE).....	18
3.2.1.1 Příprava vzorku.....	18
3.2.1.2 Izoelektrická fokusace (IEF).....	19
3.2.1.3 SDS- PAGE elektroforéza	20
3.2.1.4 Vizualizace.....	20
3.2.1.5 Identifikace separovaných proteinů	21
3.2.2 Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2-D DIGE)	21
3.2.3 Laserová mikrodisekce (LMD)	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4.1 Použité přístroje a materiál.....	24
4.1.1 Přístroje	24
4.1.2 Chemikálie.....	24
4.1.3 Roztoky.....	24
4.1.4 Vzorky.....	25
4.2 Použité metody	25

4.2.1	Úprava vzorku	25
4.2.1.1	Stage Tips purifikace	25
4.2.2	Vzorky č.1 (D1, E1, DEJ1).....	26
4.2.3	Vzorky č.2 (D2,E2, DEJ2).....	27
4.2.4	Vzorky č.3 (D3, E3, DEJ3).....	29
5.	VÝSLEDKY	30
5.1	Identifikované proteiny ve vzorcích č.1 (D1, E1, DEJ1)	30
5.2	Identifikované proteiny ve vzorcích č.2 (D2, E2, DEJ2)	33
5.3	Identifikované proteiny ve vzorcích č.3 (D3, E3, DEJ3)	36
6.	DISKUSE	38
7.	ZÁVĚR	41
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	42

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2 – DE	dvourozměrná gelová elektroforéza
ASB- 14	3-[N,N-Dimethyl(3-myristoylaminopropyl)ammonium]propan-sulfonát
BSP	kostní sialoprotein
CA- IEF	trubičkový gel s amfolylem
CBB barvivo	Coomassie Brilliant Blue
CID	fragmentace indukovaná kolizí (Collision Induced Dissociation)
DEJ	dentin- enamelová vrstva
DMP1	dentinový matrix protein I
DSPP	dentinový sialofosfoprotein
DSPP	dentinový sialofosfoprotein
DTE	dithioerythriol
DTT	dithiothreitol
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
ESI	ionizace elektrosprejem
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-propan-1-sulfonát
IEF	isoelektrická fokusace
IPG strip	strip s imobilizovaným pH gradientem
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem
MALDI	laserová ionizace/desorpce za přítomnosti matrice
MASCOT	software pro identifikaci proteinů
MAXIS	tandemový hmotnostnímu spektrometr
MEPE	extracelulární matrix fosfoglykoprotein
Mr	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NHS	N-hydroxysukcinimid
nLC-MS/MS	nanokapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem
NP- 40	nonyl phenoxypolyethoxyethanol
OPN	osteopontin
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
pI	isoelektrický bod
PMF	„Peptide mass fingerprinting“ (peptidové hmotnostní mapování)

PSD	post-source decay
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TritonX- 100	polyethylenglykol alkylfenyl ether

1. ÚVOD

Proteomika je vědní disciplína, která se zabývá globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomu), a zároveň též zkoumá strukturu a interakce proteinů. Podává kvantitativní informaci o proteinech v daném okamžiku za přesně definovaných podmínek. Lze ji rozdělit do tří hlavních oblastí, první je mikrocharakterizace proteinů pro identifikaci proteinů a studium postranslačních modifikací, druhou je srovnávací proteomika zabývající se porovnáváním hladin proteinů. Třetí oblast studuje protein- proteinové interakce. K tomu se využívají různé metody, např. technika hmotnostní spektrometrie nebo gelová elektroforéza, SDS-PAGE a 2-DE [1- 3].

Oblast proteomiky zubů je dosud relativně málo prozkoumanou oblastí výzkumu, a to především kvůli obtížnému zpracování zubní tkáně, nízkému obsahu proteinů v mineralizovaných tkáních a jejich obtížné izolaci. Podrobnější studie proteomického a chemického složení zubů mohou přispět k pochopení různých příčin chorob chrupu např. tvorby zubních kazů, nebo paradentózy.

V korejské studii z roku 2009 byl zkoumán celkový proteom dentinu. Vzorky zubů moudrosti byly demineralizovány po dobu 15 dní v roztoku disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA·2Na) za přídavku inhibitorů proteáz, aby nedocházelo k degradaci proteinů. Vzorky zubů byly následně zchlazeny v kapalném dusíku a poté rozdrceny. Proteiny byly extrahovány do roztoku RIPA pufru a nakonec analyzovány v 10 % SDS- polyakrylamidovém gelu. Jednotlivé proužky proteinů v gelu byly vyříznuty a proteiny byly naštípány trypsinem na peptidy, které byly analyzovány. Metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Tato studie zjistila přítomnost 233 různých proteinů např. biglykan, prekurzor periostinu, vitronectinu, osteoglycinu, osteomodulinu [4].

Členové Proteomické laboratoře Fyziologického ústavu AVČR aplikovali separační postup vhodný pro izolaci proteinů ze vzorků dentinu, který využívá guanidin jako chaotropní a denaturační činidlo. Analýza dentinu zde byla poprvé provedena pomocí dvojdimenzionální elektroforézy (2-DE) a nLC-MS/ MS analýzou kryptických štěpů. Díky tomu bylo touto studií v dentinu identifikováno celkem 289 proteinů [5].

Ve studii Shevchenka a spol. z roku 2006 byla popsána metoda izolace proteinů extrakcí do roztoku hydrogenuhličitanu amonného. Proteiny byly naštípány trypsinem a

výsledné peptidy analyzovány vhodnou separační metodou ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MALDI-MS, LC-MS/MS). Postup popsáný v této studii umožnil značné zvýšení rychlosti a citlivosti analýzy pro identifikaci proteinů [6]. Princip zpracování vzorků č.2 v experimentální části vychází z tohoto protokolu.

V jiné nedávné brazilské studii z roku 2016 se vědci zabývali analýzou proteomu zubního cementu. Vzorky myších zubů byly inkubovány v močovině. Extrahované proteiny byly redukovány 0,5 mol/ l DDT a následně alkylovány v 0,5 mol/ l jodoacetamidu. Demineralizované vzorky byly uchovány v 10 % roztoku formaldehydu. Zuby byly nařezány na tenké plátky a dekalifikovaná oblast zubního cementu byla vyříznuta pomocí laserové mikrodisekce. Následnou analýzou výřezů zubního cementu metodou LC-MS/MS bylo odhaleno 519 proteinů např. serpinA1, prokolageny, tenasciny X (TNX) a asporiny [7]. Princip zpracování vzorků č.3 v experimentální části byl inspirován tímto článkem.

V americké studii z roku 2012 byla sledována ultrastruktura DEJ v lidských zubech moudrosti. Po oddělení korunky od kořenové části byly korunky demineralizovány 37 % kys. fosforečnou a poté ještě v roztoku 4 % EDTA pufru. Vizualizace vrstvy DEJ byla provedena metodou skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Analýzou byly objeveny struktury podobné síti trojrozměrných vláken 100-400 μm výrazně odlišitelných od struktury enamelu [8].

2. CÍL PRÁCE

Izolovat proteiny přítomné v zubech moudrosti z vrstvy na rozhraní dentinu a enamelu metodou demineralizace, extrakce proteinů do hydrogenuhličitanu amonného a denaturace proteinů inkubací v roztoku močoviny v kombinaci s laserovou mikrodisekcí. Extrahované proteiny naštípat na peptidy a následně je analyzovat metodou nLC MS/MS. Poté porovnat získané výsledky z jednotlivých metod mezi sebou.

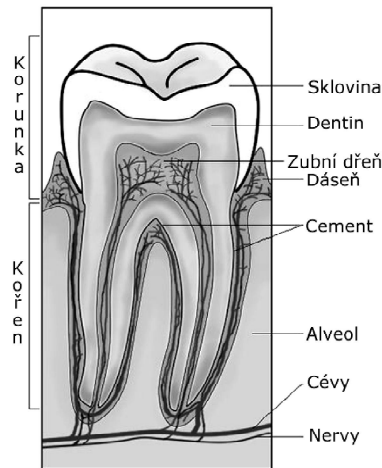
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Proteomika

Oblast proteomiky zubů je oproti některým ostatním částem lidského těla (např. krev, moč) dosud relativně méně prozkoumanou, a to především kvůli obtížnému zpracování zubní tkáně [1, 3].

Zuby jsou nejtvrdější tkání lidského těla, vyvíjejí se z ektodermu a ektomezenchymu. Jsou uzpůsobeny k uchopování a rozměňování potravy, což je ovlivňováno tvarem hran, hrbolků, podélnými a příčnými rýhami na žvýkacích ploškách zubů. Morfologicky jsou zuby členěny na zubní korunku, krček, kořen a dřeňovou dutinu zubu [9, 10].

Lidské zuby se skládají z tří základních částí: skloviny (enamelu), zuboviny (dentinu) s zubního cementu [9, 10].



Obr. 1: Stavba lidského zubu [11].

3.1.1 Proteomika enamelu

Enamel tvoří vnější část zubu, jeho funkcí je rozměňovat potravu. Tvoří se ještě před samotným prožíváním zubů specializovanými sekrečními buňkami ameloblasty. Zubní sklovina je nejprve produkována jako měkká na proteiny bohatá extracelulární matrix, která tvoří základ pro formu enamelu [10].

Během tvorby a dozrávání enamelu, dochází k téměř úplnému odstranění extracelulární matrix proteázami enzymatickou degradací. Výsledkem je ztvrdnutí a zpevnění skloviny za současného extenzivního ukládání minerálů na bázi vápníku. Struktura prořezané skloviny je tvořena mikro tyčinkami, kdy každá z tyčinek je tvořena

ze stupňovitě uspořádaných hydroxyapatitových nanosloupců, které jsou zanořeny do proteinové matrix. Z anorganických prvků je enamel tvořen především vápníkem (35 % hmoty), fosforem (15 %), kyslíkem (40 %). Dále obsahuje uhlík, vodík, sodík, chlór, dusík, hořčík a zinek [1, 10].

Enamel je unikátní jednotkou mezi všemi mineralizovanými tkáněmi z důvodu přítomnosti vysokého obsahu minerálů. Je nejtvrďší tkání lidského těla a je nekolagenní a nepodléhá resorpci a remodelaci [12].

Produkce proteáz během zrání enamelu je nezbytná pro správný vývoj zubu, tvrdnutí a zvyšování chemické a mechanické odolnosti skloviny [10]. Proteinová matrix enamelu je rozdělena do tří hlavních skupin. První skupinou je amelogenin. Druhou skupinou je enamelin, který zahrnuje tuftelin. Třetí skupinou jsou neamelogenní a neenamelinové skupiny, které jsou reprezentovány ameloblastinem (též amelin či sheathlin) [12].

3.1.1.1 Amelogenin

Amelogenin tvoří 90 % proteinů enamelové matrix a má majoritní funkci pro mineralizaci a morfologické přeměny skloviny. Základní struktura amelogeninu se skládá ze dvou dobře vymezených oblastí: první je amino-terminální doména-A (hydrofobní a obsahuje zbytky aminokyselin) a druhá oblast je karboxy-terminální doména-B (hydrofilní a obsahuje zbytky aminokyselin). Amelogenin má schopnost vázat se na krystaly hydroxyapatitu pomocí domény-B, která je hydrofilní povahy, čímž je regulována iniciace a růst hydroxyapatitových krystalů během mineralizace enamelu [12].

3.1.1.2 Enamelin

Společně s ameloblastinem je jedním ze dvou nejhojnějších neamelogenních proteinů z proteinů zubní skloviny. Enamelin se silně váže na hydroxyapatit, mechanismus vazby není zcela objasněn [10].

3.1.1.3 Tuftelin

Tuftelin je kyselě fosforylovaný glykoprotein skloviny, vzniká během amelogenese. Jeho funkce není zcela objasněna, předpokládá se na základě studií aniontového charakteru, lokalizace v DEJ (dentin-enamelové vrstva) a podílu při expresi v buňkách ameloblastů, že se jedná o nukleátor pro tvorbu hydroxyapatitových

krystalů a tudíž, že podporuje zahájení mineralizačních procesů během vývoje zubů [10].

3.1.1.4 Ameloblastin

Ameloblastin byl původně považován za specifický glykoprotein extracelulární matrix produkovaný ameloblasty. Později byla detekována jeho exprese i během vývoje mezenchymální zubní tvrdé tkáně a během časně kraniofaciální kostní formace. Jeho fyziologická funkce je zatím neznámá, ale jistou mírou se podílí na kontrole elongace krystalů skloviny a mineralizace skloviny během vývoje zubu [10].

3.1.2 Proteomika dentinu

Dentin je intermediální částí zubu, nachází se mezi sklovinou a dřemí. Je méně mineralizován než enamel. Dentinová tkáň tvoří převážnou část zubu, která plní ochrannou funkci pro dřemí a poskytuje podporu pro zubní sklovinu a cement [5, 10].

Dentin je nejprve tvořen odontoblasty, které formují hlavní strukturu zubů a dávají základ pro sklovinu a cement. Organická matrix dentinu obsahuje kolagenní, nekolagenní proteiny (proteoglykany, fosfoforiny, glykoproteiny), fosfolipidy a růstové faktory. Během vývoje zubu odontoblasty sekretují primární dentin. V průběhu dentinogeneze tyto buňky produkují proteiny, které mají důležitou úlohu v dentinu při organizaci extracelulární matrix a regulaci mineralizace [4, 10].

Organická matrix dentinu je tvořena z 90 % kolagenními proteiny, u člověka byla zjištěna přítomnost 27 typů kolagenu pocházejících z 42 různých genů pro kolagen. Majoritní část je zastoupena kolagenem typu I. Mezi ostatní typy kolagenu přítomné v dentinu patří i III, V, VI, XI, XII. Fibrily kolagenu vytváří 3D oporu pro ukládání krystalů apatitu [10].

Hlavními nekolagenními proteiny podílející se na mineralizaci dentinu jsou proteiny z rodiny fosfoproteinů SIBLING. Do této rodiny patří dentinový sialofosfoprotein (DSPP), kostní sialoprotein (BSP), dentinový matrix protein 1 (DMP1), osteopontin (OPN) a extracelulární matrix fosfoglykoprotein (MEPE) [13].

3.1.2.1 Dentinový sialofosfoprotein (DSPP)

Majoritním nekolagenním proteinem v dentinu je sialofosfoprotein (DSPP), důležitý pro mineralizaci dentinu, jehož primární funkcí je extracelulární mineralizace dentinu. Heterogenní mutace v lidském DSPP genu ovlivňují dentin a zapříčiňují dědičné choroby chrupu např. dentinogenesis imperfectum a dentinovou dysplazii typu II, III [10, 13].

3.1.2.2 Dentinový matrix protein I (DMP1)

Jedná se o vysoce fosforylovaný protein, který obsahuje velké množství fosforylovaného serinu. DMP1 se dokáže specificky vázat na N-telopeptidové sekvence kolagenu, což má vliv na kolagenní fibrogenézi [10].

3.1.3 Proteomika dentin- enamelové vrstvy (DEJ)

Mezivrstva dentin-enamel je přírodním rozhraním propojující dvě mechanicky odlišné tkáně v zubu. Tvrdou vrstvu enamelu a měkkou vrstvu dentinu. Pro své jedinečné biomechanické vlastnosti má DEJ zásadní vliv při poškození enamelu a funguje jako bariéra pro přenos trhlin do dentinu. Mezivrstva DEJ je struktura 100 – 150 µm široká. Struktura DEJ má v oblasti směrem k dentinu konvexní tvar a směrem k enamelu konkávní. Toto specifické rozvržení přispívá k integritě této mezivrstvy [14, 15].

Nejvnitřnější část enamelu na rozhraní s DEJ tvoří základ zubní bazální membrány. Bazální membrána obsahuje z velké části kolagen typu IV nebo kolagen typu VII a laminin. Mutace v kolagenu typu VII způsobuje křehkost enamelu [15, 16].

Proteiny ve vrstvě enamelu jsou nejvíce zastoupeny v těsné blízkosti DEJ, ve vzdálenosti nad 400 µm od DEJ už je patrná výrazná absence proteinů enamelu. Předpokládá se, že tato proteinová vrstva by mohla být důležitá pro biomechanické interakce mezi enamelem a dentin-enamelovou vrstvou v lidských dospělých zubech [8].

DEJ vrstva je tvořena složitými úrovněmi mikrostruktur, které nejsou zatím přesněji definovány. Předpokládá se, že tato vrstva obsahuje organické a minerální látky odlišné od přilehlých vrstev tkáně. Jedinečné složení této vrstvy zachovává fyzikální celistvost zubu [16].

3.1.4 **Proteomika zubního cementu**

Zubní cement je avaskulární mineralizovaná tkáň pokrývající povrch kořene. Jeho hlavní funkcí je ukotvení kolagenních fibril periodontálních vláken na povrch kořene zubu. Je tvořen specializovanými buňkami cementoblasty [10, 17].

Zubní cement tvoří z 61 % minerály, dále je v něm 27 % organické matrix a 12 % vody. Minerální složka se skládá z hydroxyapatitu, organická složka zahrnuje kolageny (kolagen typu I, III), glykoproteiny (osteonektin, arginin-glycin-aspartát kyseliny vázající integriny) a proteoglykany (biglykany, decorin) [10, 18].

Cement je klasifikován v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti cementocytů nebo na základě obsahu vnitřních nebo vnějších kolagenních vláken tvořených cementoblasty nebo fibroblasty. U lidí jsou odlišeny tři typy lišící se v těchto ohledech: acelulární afibrilární cement, celulární cement s vnitřními vlákny a acelulární fibrilární cement s vnějšími vlákny [17].

3.1.4.1 Acelulární fibrilární cement

Tento typ cementu pokrývá malou část skloviny a nachází se podél cemento-enamelové vrstvy, hlavní strukturální organickou složku tvoří glykosaminoglykany. Je přítomen v cervikálních a středních oblastech kořenové části [17, 18].

3.1.4.2 Celulární cement s vnitřními vlákny

Celulární cement s vnitřními vlákny obsahuje cementocyty začleněné do kolagenní matrix vnitřních kolagenových vláken. Ta jsou orientována převážně paralelně k povrchu kořene a kruhově okolo. Jako jediný druh cementu dokáže opravit resorpční defekty kořene. Nachází se v apikální části kořene [17].

3.1.5 **Proteomika zubní dřene**

Zubní dřeň je nekalcifikovaná tkáň nacházející se v zubní dřeňové dutině, obklopenou tvrdou zubní tkání. Pulpa se skládá z pojivové tkáně, neurálních fibril, mesenchymálních buněk, krevních a lymfatických cév [10].

Krevní cévy a nervové svazky vstupují do dřene skrze apikální foramen. Jejich úkolem je zajistit výživu zubu a citlivě reagovat na vnější podněty. Zubní dřeň má

schopnost regenerovat kalcifikované tkáně v reakci na různé vnější vlivy jako jsou zubní kazy, traumata, retransplantace zubů [10].

Imunitní systém pulpy je tvořen dendritickými buňkami, makrofágy, lymfocyty, endoteliálními, epiteliálními a mesenchymálními buňkami. Všechny tyto komponenty jsou obsaženy v dentino-dřeňovém komplexu. Vitalita tohoto komplexu je nezbytná pro udržení funkční, životaschopné okluze zubu. Buňky na okraji dřeně syntetizují a sekretují dentin a jsou důležité pro udržení tkáňové homeostázy. Tyto buňky též přispívají k imunitnímu systému zubu a zprostředkovávají reparativní procesy vedoucí k regeneraci tkání [10, 19].

3.1.6 Proteomika pelikulární vrstvy

Pelikulární zubní vrstva je proteinový film na povrchu enamelu, který je tvořen na základě selektivní adsorpční vazby glykoproteinů ze slin. Tento film tvoří rozhraní mezi sklovinou a ústním biofilmem a koriguje zachytávání bakterií na biofilmu v ústní dutině [20, 21].

Hlavní složkou pelikulární vrstvy jsou makromolekuly lysozymu, alfa amylasy, peroxidasy, imunoglobulinu A a G, mucinu, albuminu a proteinů bohatých na prolin [21].

3.2 Metody proteomiky

Rozvoji proteomických metod se v posledních letech dostává čím dál tím více pozornosti, která umožňuje provádět analýzu proteomu a to i studii postranlačních modifikací proteinů či jejich interakcí [22].

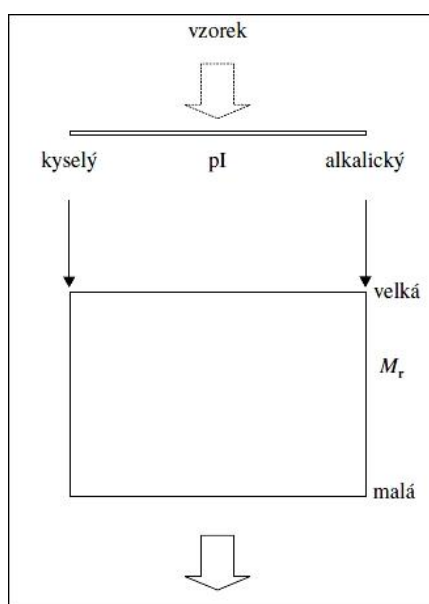
Nejčastěji využívanou metodou pro identifikaci proteinů je hmotnostní spektrometrie (MS). Hmotnostní spektrometry měří poměr molekulových hmotností látek k náboji (m/z). Přístroje zaznamenávají jednak molekulové hmotnosti proteinů, tak i molekulové hmotnosti peptidů vzniklých štěpením sekvenčně specifickými proteázami a molekulové hmotnosti fragmentů peptidů. Pro proteomické aplikace se hmotnostní spektrometry používají ve spojení s ionizačními technikami ESI (Electrospray Ionization) a MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization) [22].

3.2.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza (2- DE)

Zásadní metodou pro proteomiku je 2-DE, metoda, jež má své počátky v roce 1975. Tato metoda je schopná účinně separovat komplexní směsi proteinů. Příprava vzorku zahrnuje několik kroků, během kterých dochází k solubilizaci (převedení vzorku do rozpustného stavu), disagregaci (omezení vzájemných interakcí), redukci a denaturaci proteinových vzorků. Poté následují dva navzájem kolmé separační procesy. Prvním rozměrem je isoelektrická fokusace (IEF) a druhým rozměrem polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecyl-sulfátu sodného (SDS- PAGE). Posledním krokem je vizualizace dvourozměrné separace komplexní směsi proteinů [23].

Ačkoliv je tato metoda poměrně přesná má i své nedostatky, např. nízkou účinnost solubilizace membránových proteinů a omezení v dělení hydrofobních proteinů či proteinů o extrémní velikosti nebo náboji [24].

Výhodou 2- DE je výborná separační vlastnost vhodná pro analýzu komplexních směsí proteinů s kvalitativním vyhodnocením [24].



Obr. 2: Schematické znázornění principu 2-DE [23].

3.2.1.1 Příprava vzorku

Disagregace se provádí sonikací, osmotickou či enzymatickou lyzí, mechanickou homogenizací nebo metodou „french press“ [25].

Proteiny jsou poté extrahovány ze vzorku vzorkovým (lyzačním) pufrem, který obsahuje chaotropní činidla, detergenty, redukční činidla a amfolyty [25].

K solubilizaci dochází v pufru vlivem chaotropních činidel, která brání asociaci proteinů vodíkovými můstky, přispívají k denaturaci, zvyšují solubilizaci proteinů a zlepšují jejich rozlišení. Příkladem takovýchto činidel jsou močovina a thiomčovina [23, 25].

Zwitreiontové nebo neiontové detergenty zamezují hydrofobním interakcím a snižují povrchové napětí, čímž přispívají k solubilizaci hydrofobních proteinů a proteinů po denaturaci a odkrytí hydrofobního jádra. Využívané surfaktanty neiontového charakteru jsou Triton X-100, NP-40 a zwitteriontové např. CHAPS, ASB-14 [25].

Redukční činidla dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE) nebo 2 merkptoethanol brání tvorbě disulfidických můstků mezi -SH skupinami cysteinů a udržují proteiny v redukovaném stavu, pomáhají ke kompletnímu rozvinutí proteinů a zlepšují rozdělení na gelu [25].

Přítomnost amfolytů v pufru je nezbytná pro pufrování pH, rozpustnost a konduktivitu proteinů v oblasti jejich pI, také omezují elektrostatické interakce mezi proteiny. Tvoří pH gradient, zvyšují solubilitu, minimalizují agregace proteinů a zlepšují jejich viditelnost na gelu. Používají se komerční přípravky Ampholyte, Pharmalyte, apod. [23, 25].

Dalšími efekty, které mohou mít vliv na falešné výsledky, je přítomnost proteáz. K jejich eliminaci je třeba inaktivace přidáním inhibitorů proteáz ke vzorku, snížení pH nebo povaření vzorku v SDS pufru [23].

Aby byly výsledky co nejpřesnější a bylo zabráněno co nejmenším ztrátám, doporučuje se provádět přípravu vzorku co nejrychleji a minimalizovat počet potřebných kroků. U vzorků obsahující močovinu nesmí dojít k zahřívání nad 37° C, jelikož by vznikl nežádoucí izokyanát a došlo by k nechtěné karbamylaci proteinů. Připravené vzorky je vhodné krátkodobě uchovávat při 4° C, dlouhodobě při -78° C [26].

3.2.1.2 Izoelektrická fokusace (IEF)

Jedná se o první rozměr 2-DE-separaci, během které se proteiny rozdělí v elektrickém poli na základě svých izoelektrických bodů v prostředí s gradientem pH.

Stabilního gradientu se docílí použitím amfolytů. Během elektroforézy se všechny ionty pohybují dle svého náboje, kyselé funkční skupiny mají v zásaditém prostředí záporný náboj a migrují ke katodě, bazické funkční skupiny mají v kyselém prostředí kladný náboj a putují k anodě. Migrace jednotlivých proteinů je ustálena v oblasti, kdy je pH rovno pI [27].

IEF lze aplikovat v trubičkových gelech s amfolyty (CA-IEF), nebo na komerčních proužcích gelu (IPG-IEF). Komerční proužky gelu s ukotveným pH gradientem jsou dnes využívanější, pro snadnější manipulaci a lepší reprodukovatelnost. Další výhodou je možnost aplikace mnohonásobně větších objemů vzorků a většího množství proteinu [22, 23].

Vzorkový pufr se v dalším kroku používá pro rehydrataci IPG stripu, jelikož stripy jsou dodávány v dehydratovaném stavu opatřené ochrannou fólií, a zároveň se tak aplikuje vzorek pro IEF. Po skončení IEF je třeba vzorky připravit na druhý rozměr ekvilibrací, která se provádí za pomoci ekvilibračního pufru obsahujícího SDS, DTT a alkylační činidlo jodacetamid [25].

3.2.1.3 SDS- PAGE elektroforéza

Druhým rozměrem 2-DE je rozdělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti (Mr). Po ekvilibraci jsou proteiny buď ve formě trubičkového gelu nebo IPG stripů nanášeny na vrch deskového gelu, a následně zality do agarosy. Deskový gel obsahuje SDS, díky němuž budou mít proteiny uniformní specifický náboj (náboj vztažený na jednotku molekul. hmotnosti), a jsou poté separovány na základě svých Mr [23].

3.2.1.4 Vizualizace

Po skončení SDS-PAGE je potřeba zabránit difúzi proteinů v gelu fixací a následně je obarvit. Jedním ze způsobů je vizualizace pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue (CBB), případně v koloidní variantě. Proteiny obarvené v gelu je možno vyříznout, podrobit štěpení trypsinem a identifikovat ve spojení s MS. Citlivější (cca 10-100×) a též kompatibilní s MS technikou je barvení stříbrem, kdy se ionty stříbra váží jen na některé aminokyselinové zbytky (Asp, Glu, His, Cys, Met, Lys). V tomto případě se nejedná se o kvalitativní metodu [23].

Novějším způsobem barvení je metoda pomocí SYPRO Ruby Orange, využívající fluorescence. Metoda je kvantitativní, citlivá, dynamická a kompatibilní

s MS. Může se aplikovat dvěma způsoby, a to buď ještě před prvním rozměrem IEF nebo gel lze obarvit po skončení 2-DE [23].

3.2.1.5 Identifikace separovaných proteinů

Pro identifikaci proteinů separovaných pomocí 2-DE gelu se používá MS v kombinaci s vhodným softwarem. Na základě vypočítané hodnoty izoelektrického bodu, relativní molekulové hmotnosti a znalosti hmotnostního spektra identifikuje softwarový program jednotlivé proteiny či peptidy. Pomocí metod MS lze analyzovat primární struktury pro jednotlivé bílkoviny a peptidy. Nejčastěji se využívají typy MS: MALDI-TOF, ESI-MS, LC-MS/MS [23].

Charakterizaci proteinů lze provádět dvěma způsoby, a to PMF (peptide mass fingerprinting) a PFS (peptide fragment sequencing) [23].

Metoda PMF je založena na enzymovém štěpení proteinu v gelu sekvenčně specifickou proteázou. Nejčastěji používané proteázy jsou trypsin, chymotrypsin. Trypsin štěpí peptidovou vazbu na C-konci argininu a lysinu, pokud není v těsné blízkosti s prolinem. Směs proteolytických štěpů je následně analyzována pomocí MALDI-TOF MS nebo ESI-MS. Hodnoty m/z odečtené z hmotnostního spektra lze porovnat s databází molekulových hmotností např. MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) [23, 28].

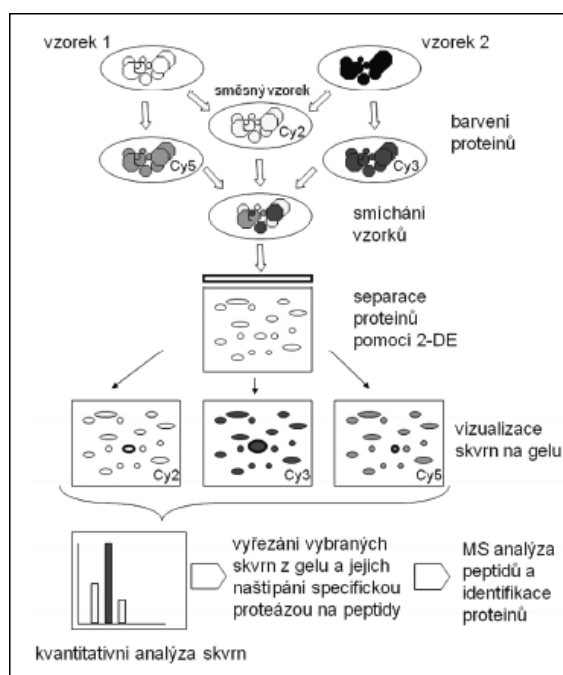
Pokud nelze identifikovat proteiny ze směsi proteolytických štěpů, lze využít metody fragmentace peptidů. K fragmentaci v tomto případě dochází přímo ve hmotnostním spektrometru. Informaci o sekvenci aminokyselin lze získat analýzou v režimu CID (collision-induced dissociation) ve spojení s ESI-MS nebo režimu PSD (post-source decay) ve spojení s MALDI-TOF. Krátké sekvence peptidů, vzdálenost konců sekvence k N- a C-konci peptidu a informace o relativní hmotnosti jsou dostatečné pro identifikaci proteinu [23, 28].

3.2.2 Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2-D DIGE)

Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza je považována za dokonalejší modifikaci 2-DE umožňující kvantitativní porovnání různých vzorků. V této metodě jsou vzorky ještě před elektroforézou kovalentně označeny pomocí fluorescenčních barviv CyDyes, která se liší svými excitačními a emisními spektry. Nejprve jsou vzorky obarveny barvivy Cy3 a Cy5 a vnitřní standard (vzniklý po smíchání stejných podílů

vzorků) je obarven pomocí barviva Cy2. Všechny tři barviva mají prakticky stejný náboj i molekulovou hmotnost, proto identické proteiny ve vzorcích budou v gelu putovat stejným směrem a do stejné vzdálenosti. Po obarvení a smíchání se vzorky separují pomocí 2-DE (viz. Obr.3). Fluorescenční detekcí jsou zobrazeny jednotlivé spoty a kvantitativně zpracovány porovnáním s vhodným softwarem [29].

Hlavní předností 2-D DIGE je možnost separace až tří vzorků na jednom gelu souběžně. Metoda má široký dynamický rozsah, vysokou citlivost a je dobře kvantifikovatelná. Hlavní nevýhodou je její finanční náročnost [29].



Obr. 3: Schematické znázornění principu 2-D DIGE [28].

Cyaninová fluorescenční barviva CyDyes jsou nízkomolekulární látky, které mají ve své struktuře funkční skupinu, fluorofor, na bázi aromatických heterocyklických struktur. Tato struktura obsahuje vždy minimálně jeden či více atomů dusíku, případně síru nebo kyslík. Struktury jsou propojeny methioninovými můstky a vytváří konjugovaný systém dvojných vazeb [29].

Barviva Cy2, Cy3 a Cy5 jsou synteticky vyráběna. Každá molekula barviva obsahuje fluorofor, linker (spojovací část) a reaktivní část. Fluorofor je tvořen dvěma indolovými jádry spojenými třemi molekulami uhlíku u Cys3, Cys2 nebo pěti u Cys5. Jsou připravována ve formě reaktivního esteru s NHS (N-hydroxysukcinimid) orientovány

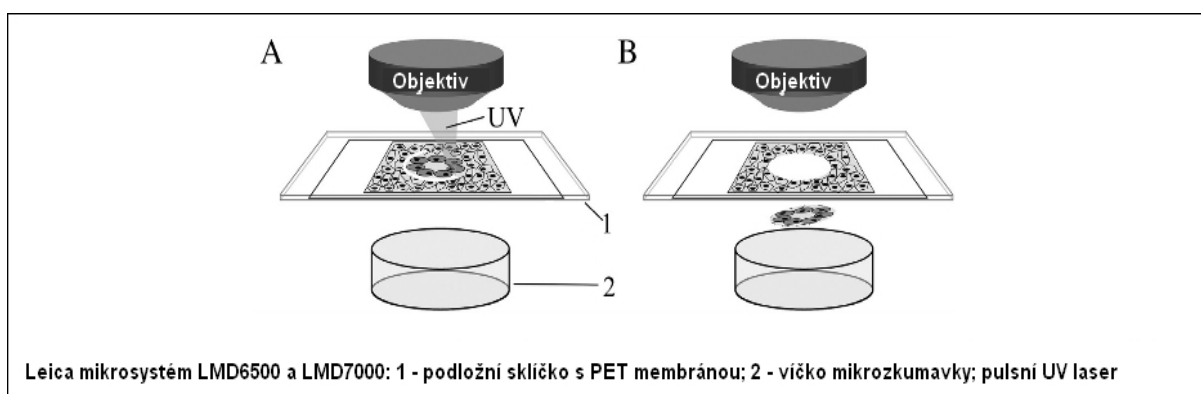
tak, aby se kovalentně navázaly na amidovou skupinu s ϵ -aminoskupinou lysinu. Po navázání na lysin se celkový náboj proteinu nemění [29].

Všechny tři barviva se liší ve svých absorpčních a emisních vlnových délkách, tudíž lze snímat na základě signálů samostatně jednotlivé vzorky. Barvivo Cy2 poskytuje intenzivní zelený signál, Cy3 emituje v červené oblasti viditelného spektra a Cy5 v modré [29].

3.2.3 Laserová mikrodisekce (LMD)

Laserová mikrodisekce je bezkontaktní metoda, která umožňuje izolaci homogenní populace buněk tkáně z řezů na základě mikroskopické analýzy. Metoda je široce používána pro analýzu genomu, profilování genové exprese, transkriptonové i proteomické analýzy [30].

V Proteomické laboratoři Fyziologického ústavu AV ČR je používán systém Leica Microsystem. Tento systém pracuje na principu vyřezávání označených kousků tkání nebo buněk laserovým paprskem a mechanického přichycení výřezu do mikrozkušavky vlastní gravitací. Nosičem je kovový rám s polyethylenovou membránou, která je zcela inertní. Pomocí pulzního laserového paprsku je nejprve zaměřena a poté vyříznuta vybraná oblast na imobilizovaném vzorku. Ořezaná oblast vlivem vlastní gravitace spadne do víčka mikrozkušavky (viz. Obr.4). Pro lepší adhezi vzorku je možno víčko naplnit lyzačním pufrem [30].



Obr. 4: Schéma Leica Mikrosystém, převzato a upraveno z [30].

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)
- 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), ovládací software HyStar 3.2 (Bruker Daltonics) a micrOTOF 3.0 (Bruker Daltonics). Naměřená data byla sbírána a zpracována softwarem ProteinScape 3.0 (Bruker Daltonics), propojena se serverem MASCOT (Matrix Science, Velká Británie)
předklonka: NS- MP- 10 Biosphere C18 5 μ m 120Å, 360|100 μ m, L=20 mm
kolona: N8-AC-11-C18 Biosphere C18 5 μ m 120Å, 360|75 μ m, L=15 cm
nosný plyn: dusík
- Laserový mikrodisekční systém (LMD6000 Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Německo), snímky pořízeny kamerou LeicaDFC300 FX, laserový paprsek Philips halogen 12 V, 100W
- ruční kotoučová bruska (Dremel 3000 JC mikronáradí, 130W, USA)

4.1.2 Chemikálie

- EDTA (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové), azid sodný
- Tableta inhibitorů proteáz (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Complete, Roche, Švýcarsko)

4.1.3 Roztoky

- EDTA- pufr (0,5 M EDTA·2Na, pH 8; 0,036 % NaN₃, inhibitory proteáz)
- 50 % Methanol (500 μ l MeOH, 500 μ l H₂O)
- 2 % ACN + 0,1 % HCOOH (20 μ l ACN, 1 μ l HCOOH, 979 μ l H₂O)
- 80 % ACN + 0,5 % HCOOH (800 μ l ACN, 5 μ l HCOOH, 195 μ l H₂O)
- 2 % HCOOH (20 μ l HCOOH, 980 μ l H₂O)

- 50 mmol/l NH_4HCO_3
- Trypsin (0,2 mg/ml a 1 $\mu\text{g/ml}$)
- 8 mol/l močovina
- 0,5 mol/l DTT
- 0,5 mol/l jodoacetamid
- 0,1 mol/l CaCl_2
- 1 % kys. mravenčí

4.1.4 Vzorky

K experimentu byly použity zuby moudrosti bez kazu, které byly pacientům odebrány z preventivních důvodů na VFN - Výzkumném ústavu stomatologickém na Karlově náměstí v Praze a zpracovány k proteomické analýze na pracovišti FgÚ AV ČR. Z etických důvodů pacienti podepsali souhlas s použitím k výzkumným účelům.

4.2 Použité metody

4.2.1 Úprava vzorku

Vzorky zubů moudrosti byly nejprve očištěny od zbytků měkkých tkání a krve pod proudem vody pomocí skalpelu. Taktéž byla z kořenové části oškrábána vrstva zubního cementu.

K oddělení korunky od kořenové části byla nejdříve diamantovým pilníkem vybroušena linie na rozmezí přechodu korunky a kořenové části zubu. Zub byl poté pomocí kladívka a dláta rozpůlen na dvě části. Na korunku obsahující enamel a dentin a na kořen obsahující dentin a dřeň.

Pro oddělení dřene od kořenové části byl použit čelistní svěrák. Mezi čelisti svěráku byl umístěn kořen zubu obalený alobalem a pomalým utahováním čelistí byl kořen drcen do doby, dokud se neozval zřetelný zvuk prasknutí.

4.2.1.1 Stage Tips purifikace

Metoda Stage Tips přípravy vzorku v proteomice je založena na principu použití pipetovacích špiček, které obsahují v zúženém konci teflonový disk s imobilizovaným chromatografickým sorbentem. Nejčastěji jsou používány reverzní fáze C18, C8 nebo

aktivovaný uhlík zachycené na teflonové matrici. Mikrokolony se vyznačují flexibilitou, rychlým a snadným použitím, reprodukovatelností purifikačního procesu [31].

Připravíme si 2 ml mikrozkušavky, na jeden vzorek jsou zapotřebí dvě. Do více mikrozkušavek je nejprve potřeba udělat otvor, aby se do něj vešla 200 μ l špička. Pomocí jehly je umístěn miniaturní terčík z hmoty C18 do konce špičky. Špičku s terčíkem umístíme do připravené mikrozkušavky s otvorem. Do špičky pipetujeme 20 μ l čistého methanolu a centrifugujeme na 6000 otáček po dobu 15 s. Po skončení centrifugace zkontrolujeme, zda je methanol nad terčíkem, pokud ano, špička je připravená.

Opět centrifugujeme na 6000 otáček 30 s., po skončení by mělo být stočeno již vše. Přidáme 20 μ l roztoku 50 % methanolu a centrifugujeme na 6000 otáček, 60 s. Poté přidáme 20 μ l roztoku 2 % ACN+ 0,1 % HCOOH a centrifugujeme na 6tis. otáček po dobu 60 s.

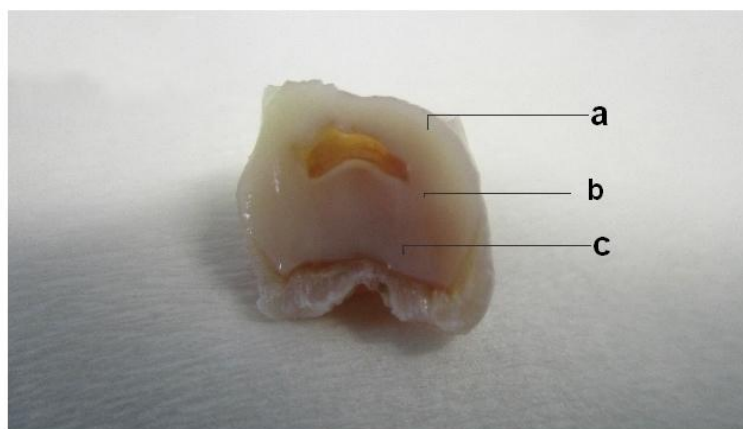
Následně přidáme 20 μ l vzorku a dvakrát centrifugujeme na 6tis. otáček po dobu 60 s. Poté přidáme 20 μ l roztoku 2 % ACN + 0,1 % HCOOH a centrifugujeme při 6tis.otáčkách po dobu 60 s.

V tuto chvíli přendáme špičku do čisté mikrozkušavky. Do špičky přidáme 20 μ l roztoku 80 % ACN + 0,5 % HCOOH, centrifugujeme na 6tis. otáček po dobu 60s. Špičku vyndáme a vyhodíme. Vzorek zmrazíme na -20 °C a dáme vysušit do lyofilizátoru. Po lyofilizaci ke vzorku přidáme 80 μ l roztoku 2 % HCOOH. Vzorek třikrát centrifugujeme na 10tis. otáček po dobu 3 min. Poté odebereme 50 μ l vzorku do plastového insertu v skleněných vialkách a opět centrifugujeme. Vzorek je připraven k měření na Maxis.

4.2.2 Vzorky č.1 (D1, E1, DEJ1)

Očištěné vzorky korunky obsahující enamel, dentinu a mezivrstvu DEJ byly vloženy do roztoku 0,5 mol/l EDTA s přidavkem 1 tablety inhibitorů proteáz (Roche) na 50 ml roztoku. Demineralizace probíhala za chlazení při -4 °C za stálého míchání po dobu 3 týdnů. Během této doby postupně měkla celá korunka, odpadala po kouscích vrchní vrstva enamelu (viz Obr. 5), zatímco dentinová část korunky sice také měkla, ale zůstávala v celku. Zuby zbělely a bylo zřetelněji vidět rozhraní vrstvy dentin-enamel.

Během demineralizace byl roztok 0,5 mol/l EDTA dvakrát vždy po týdnu vyměněn za čerstvý.



Obr. 5: Vzorek č.1 s postupující demineralizací skloviny; a- enamel; b- DEJ vrstva; c- dentin

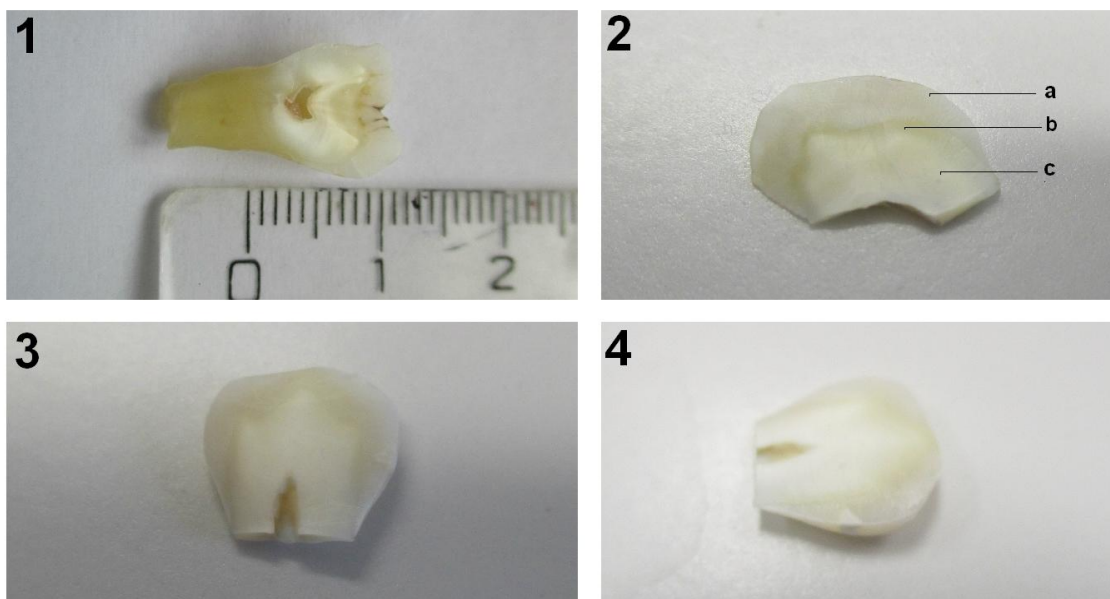
Část vzorků po dokončení z demineralizace byla vysušena v lyofilizátoru a následně k nim bylo přidáno 0,5 ml roztoku trypsinu v poměru 1:50, trypsin: protein (na 10 mg vzorku bylo potřeba 0,02 mg trypsinu o koncentraci 0,2 mg/ml). Vzorky byly ponechány inkubovat přes noc při 37 °C. Poté byl roztok přendán do vialek, lyofilizován a zvážen po vysušení. Dále zpracován na Stage tips a poté na MAXIS.

4.2.3 Vzorky č.2 (D2,E2, DEJ2)

Pro vzorky č.2 byly vzaty a očištěny nové zuby lidí ve věku 18- 21 let. Pomocí ruční kotoučové brusky byly vyřezány plošky enamelu, dentinu a vrstvy DEJ o tloušťce cca 0,1- 0,2 mm (viz Obr. 6).

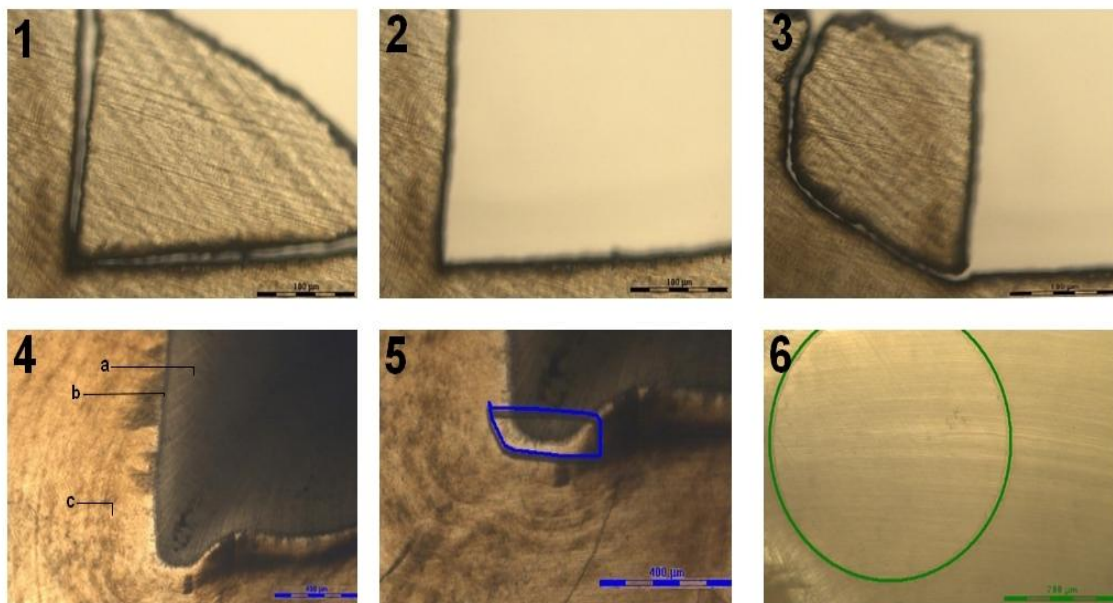
Vyřezané vzorky byly přilepeny ze spodu na hliníkovou podložku s polyethylenovou membránou a umístěny co nejbližší čepičce mikrozkušavky. Do čepičky bylo nanášeno 50 µl vody pro zvýšení adheze při „katapultaci“ vyřezaného vzorku.

Pomocí laserového mikrodisekčního systému Leica LMD6000 byly ze vzorků vyřezány oblasti enamelu, dentinu a DEJ (viz. Obr. 7). Během řezání bylo zapotřebí co nejlépe zfokusovat laser na plochu výběru, oříznout polyethylenovou membránu a znovu zaostřit na spodní vrstvu.



Obr. 6: Výbrusy vzorků č.2: 2a- enamel; 2b- DEJ vrstva; 2c- dentin

Vyříznuté vybrané oblasti měly pro enamel plochu $71\,000\ \mu\text{m}^2$ a $26\,700\ \mu\text{m}^2$, pro dentin $129\,000\ \mu\text{m}^2$ a $22\,000\ \mu\text{m}^2$, a pro DEJ $95\,000\ \mu\text{m}^2$ a $97\,000\ \mu\text{m}^2$.



Obr. 7: Výřezy vzorků č.2: snímky 1-3 enamel (měřítko $100\ \mu\text{m}$); 4a - dentin, 4b - DEJ, 4c - enamel (měřítko $400\ \mu\text{m}$); sn.5 - vyznačený ořez pro laserovou mikrodisekci DEJ vrstvy (měřítko $400\ \mu\text{m}$); sn.6- dentin (měřítko $200\ \mu\text{m}$)

Každý vzorek byl uchováván ve vlastní mikrozkuhavce. Výřezy byly extrahovány do hydrogenuhličitanu amonného dle postupu v článku [6].

K jednotlivým vzorkům bylo přidáno 100 μ l 50 mmol/l NH_4HCO_3 . Vzorky plošek byly inkubovány po dobu 5 min při teplotě 105 °C. Poté byly přidány 2 μ l trypsinu (koncentrace trypsinu 1 μ g/ml) a v roztoku necháno přes noc.

Druhý den bylo přidáno 100 μ l 50 mmol/l NH_4HCO_3 roztok byl inkubován po dobu 5 minut při 105 °C. Po inkubaci byly ke vzorkům přidány 2 μ l trypsinu o koncentraci 1 μ g/ml a následně byly vzorky vysušeny v lyofilizátoru. A připraveny na purifikaci na Stage tips a dále na Maxis.

4.2.4 Vzorky č.3 (D3, E3, DEJ3)

Vzorky zubů č.3 byly zpracovány podle studie Salmon et al. [7].

Výřezy po laserové mikrodisekci D3, E3, DEJ3 o ploše cca 113 000 μm^2 . Výřezy plošek byly poté inkubovány s 30 μ l 8 mol/l močoviny po dobu 10 min při 25 °C. Za tuto dobu došlo k denaturaci a uvolnění proteinů.

Extrahované proteiny byly redukovány přidavkem 3 μ l 0,5 mol/l DTT a inkubovány při teplotě 56 °C, po dobu 25 min. Alkylace proteinů byla provedena 6 μ l 0,5 mol/l jodoacetamidem při teplotě 25 °C, po dobu 30 min. Vzorky byly znovu inkubovány s přidavkem 3 μ l 0,5 mol/l DTT při 25 °C, 15 min.

Vzorky byly naředěny 108 μ l 50 mmol/l NH_4HCO_3 , aby výsledná koncentrace močoviny činila 1,6 mol/l. Ke směsi byly poté přidány 3 μ l 0,1 mol/l CaCl_2 a 2 μ l trypsinu (o koncentraci 1 mg/ml). Ponecháno inkubovat přes noc v bloku při 37 °C. Přidáním 100 μ l 1 % kys. mravenčí došlo k okyselení pH na 2. Vzorky byly zmrazeny a lyofilizovány a připraveny na Stage tips a dále na MAXIS.

5. VÝSLEDKY

V níže uvedených tabulkách jsou uvedeny lidské proteiny, které byly identifikovány ve vzorcích zubů. Identifikované proteiny jsou seřazeny podle jejich MASCOT skóre. V tabulkách jsou uvedeny pouze validní proteiny, jejichž MASCOT skóre je vyšší nebo rovno hodnotě 80.

5.1 Identifikované proteiny ve vzorcích č.1 (D1, E1, DEJ1)

Tabulka č. 1: D1-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.1 z vrstvy dentinu 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	9261.1	63.7
IPI00304962	COL1A2 Collagen alpha-2(I) chain	129.2	9.7	7181.1	68.2
IPI00418471	VIM Vimentin	53.6	4.9	453.6	23.4
IPI00643384	BGN cDNA FLJ36740 fis, clone UTERU2013322, highly similar to Biglycan	34.9	9.8	420.1	27.4
IPI00006114	SERPINF1 Pigment epithelium-derived factor	46.3	6.0	397.8	23.7
IPI01018020	HBB Beta-globin gene from a thalassemia patient	18.9	6.3	242.9	28.0
IPI00216773	ALB Uncharacterized protein	45.1	5.7	242.8	10.6
IPI01020710	COL11A2 Uncharacterized protein	166.2	6.7	229.4	3.7
IPI00022431	AHSG cDNA FLJ55606, highly similar to Alpha-2-HS-glycoprotein	46.6	5.8	213.7	14.5
IPI00298971	VTN Vitronectin	54.3	5.5	213.0	11.9
IPI00032404	MMP20 Matrix metalloproteinase-20	54.4	9.4	173.1	13.9
IPI00218585	POSTN Isoform 2 of Periostin	87.0	8.7	166.1	7.3
IPI00853068	HBA2;HBA1 Hemoglobin alpha-2	11.9	9.6	150.6	50.0
IPI00019576	F10 Coagulation factor X	54.7	5.6	126.9	8.0
IPI00021033	COL3A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(III) chain	138.5	6.2	121.6	1.6
IPI00941660	CLEC11A Uncharacterized protein	26.9	4.6	113.3	5.7
IPI00607652	OLFML3 Isoform 2 of Olfactomedin-like protein 3	43.6	6.8	105.3	5.2
IPI00844287	NES Similar to Nestin	65.8	5.1	93.0	5.1
IPI00975573	- Similar to Tubulin beta-2A chain	24.4	5.8	84.1	12.6

Tabulka č. 2: D1-2. Identifikované proteiny ze vzorku č.1 z vrstvy dentinu 2

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	7309.1	58.5
IPI00304962	COL1A2 Collagen alpha-2(I) chain	129.2	9.7	5053.7	54.5
IPI00220327	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1	66.0	8.8	542.8	19.4
IPI00643384	BGN cDNA FLJ36740 fis, clone UTERU2013322, highly similar to Biglycan	34.9	9.8	445.0	34.9
IPI00641231	POSTN Uncharacterized protein	90.1	8.9	402.2	14.5
IPI00302944	COL12A1 Isoform 4 of Collagen alpha-1(XII) chain	324.4	5.2	376.6	2.9

IPI00021033	COL3A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(III) chain	138.5	6.2	291.1	4.8
IPI00942257	KRT6A Uncharacterized protein	55.8	5.9	290.9	11.7
IPI00006114	SERPINF1 Pigment epithelium-derived factor	46.3	6.0	261.0	20.6
IPI00220701	COL6A3 Isoform 2 of Collagen alpha-3(VI) chain	321.2	7.1	236.0	2.7
IPI00027827	SOD3 Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	25.8	6.2	218.7	20.0
IPI00975690	VIM Vimentin variant 3	49.6	5.0	216.5	13.5
IPI00019576	F10 Coagulation factor X	54.7	5.6	212.4	9.2
IPI00298971	VTN Vitronectin	54.3	5.5	199.7	10.5
IPI00019359	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9	62.0	5.0	197.2	6.9
IPI00021304	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65.8	8.9	176.1	1.9
IPI00019568	F2 Prothrombin (Fragment)	70.0	5.6	134.1	5.3
IPI00291136	COL6A1 Collagen alpha-1(VI) chain	108.5	5.1	133.7	4.3
IPI00953689	AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein	39.3	5.4	128.7	8.2
IPI00296099	THBS1 Thrombospondin-1	129.3	4.6	128.0	3.0
IPI00515092	OGN Uncharacterized protein	30.4	9.2	112.1	16.4
IPI01021407	TUBA1B Uncharacterized protein	27.5	4.9	92.1	9.3

Tabulka č. 3: E1-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.1 z vrstvy enamelu 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	1419.0	23.0
IPI00304962	COL1A2 Collagen alpha-2(II) chain	129.2	9.7	990.9	17.1
IPI00220327	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1	66.0	8.8	530.9	18.6
IPI00019359	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9	62.0	5.0	487.6	18.5
IPI00009865	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10	58.8	5.0	337.8	9.4
IPI00796636	HBB Uncharacterized protein	9.7	6.3	270.0	54.4
IPI00021304	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65.8	8.9	259.9	8.1
IPI00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	9.4	224.8	53.5
IPI00966829	ALB 69 kDa protein	69.2	6.0	214.2	11.1
IPI01010099	POSTN Uncharacterized protein	30.5	5.0	119.1	8.3
IPI00911034	- cDNA FLJ59360, moderately similar to Biglycan	33.5	6.5	91.8	6.7

Tabulka č. 4: E1-2. Identifikované proteiny ze vzorku č.1 z vrstvy enamelu 2

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	10669.8	65.7
IPI01014827	COL1A2 Uncharacterized protein	129.4	9.7	8129.0	63.0
IPI00643384	BGN cDNA FLJ36740 fis, clone UTERU2013322, highly similar to Biglycan	34.9	9.8	714.3	39.1
IPI00966829	ALB 69 kDa protein	69.2	6.0	545.0	19.0
IPI00975690	VIM Vimentin variant 3	49.6	5.0	539.1	29.7
IPI00006114	SERPINF1 Pigment epithelium-derived factor	46.3	6.0	513.6	32.5

IPI00654755	HBB Hemoglobin subunit beta	16.0	6.9	407.2	47.6
IPI00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	9.4	346.5	54.2
IPI00953689	AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein	39.3	5.4	324.1	25.9
IPI00298971	VTN Vitronectin	54.3	5.5	308.8	12.8
IPI00218585	POSTN Isoform 2 of Periostin	87.0	8.7	274.1	11.9
IPI00014592	CHAD Chondroadherin	40.5	10.3	273.4	25.6
IPI00021033	COL3A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(III) chain	138.5	6.2	261.3	3.3
IPI00032404	MMP20 Matrix metalloproteinase-20	54.4	9.4	257.8	21.5
IPI00019576	F10 Coagulation factor X	54.7	5.6	243.3	11.1
IPI01021371	- 157 kDa protein	156.8	9.4	191.2	4.6
IPI00019568	F2 Prothrombin (Fragment)	70.0	5.6	172.9	6.3
IPI00020990	OMD Osteomodulin	49.5	5.2	146.9	11.9
IPI00739099	COL5A2 Collagen alpha-2(V) chain	144.8	6.0	144.3	2.5
IPI00965868	TGFBI Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa variant (Fragment)	74.6	8.6	142.8	11.3
IPI00027827	SOD3 Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	25.8	6.2	136.9	14.6
IPI00218343	TUBA1C Tubulin alpha-1C chain	49.9	4.8	135.9	7.3
IPI00844287	NES Similar to Nestin	65.8	5.1	130.7	5.1
IPI00033466	CLEC11A C-type lectin domain family 11 member A	35.7	4.9	111.1	10.5
IPI00025465	OGN cDNA FLJ59205, highly similar to Mimecan	40.5	9.0	103.7	9.8
IPI00021841	APOA1 Apolipoprotein A-I	30.8	5.5	101.7	13.5
IPI00789376	KNG1 KNG1 protein	33.0	6.3	92.3	9.6
IPI00978715	CLU Clusterin	37.2	5.8	83.7	9.2

Tabulka č. 5: DEJ1-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.1 z dentin- enamelové vrstvy 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	12035.5	68.2
IPI01014827	COL1A2 Uncharacterized protein	129.4	9.7	7819.2	66.6
IPI00975690	VIM Vimentin variant 3	49.6	5.0	634.5	27.4
IPI00010790	BGN Biglycan	41.6	7.9	616.9	29.9
IPI00654755	HBB Hemoglobin subunit beta	16.0	6.9	576.5	47.6
IPI00966829	ALB 69 kDa protein	69.2	6.0	563.0	18.9
IPI00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	9.4	463.5	55.6
IPI00006114	SERPINF1 Pigment epithelium-derived factor	46.3	6.0	410.8	20.3
IPI00298971	VTN Vitronectin	54.3	5.5	308.0	11.5
IPI00019576	F10 Coagulation factor X	54.7	5.6	286.7	13.5
IPI00019568	F2 Prothrombin (Fragment)	70.0	5.6	210.9	8.2
IPI00021033	COL3A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(III) chain	138.5	6.2	188.1	3.3
IPI00032404	MMP20 Matrix metalloproteinase-20	54.4	9.4	169.5	8.7
IPI01021371	- 157 kDa protein	156.8	9.4	142.0	2.5

IPI00953689	AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein	39.3	5.4	126.4	10.1
IPI00020990	OMD Osteomodulin	49.5	5.2	110.6	5.9
IPI00789376	KNG1 KNG1 protein	33.0	6.3	104.0	9.3

DEJ1-1 Tabulka č. 6: DEJ1-2. Identifikované proteiny ze vzorku č.1 z dentin- enamelové vrstvy 2

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	11167.4	61.6
IPI01014827	COL1A2 Uncharacterized protein	129.4	9.7	8318.4	65.3
IPI00643384	BGN cDNA FLJ36740 fis, clone UTERU2013322, highly similar to Biglycan	34.9	9.8	383.9	28.7
IPI00006114	SERPINF1 Pigment epithelium-derived factor	46.3	6.0	252.5	10.3
IPI00966829	ALB 69 kDa protein	69.2	6.0	246.6	10.1
IPI00975690	VIM Vimentin variant 3	49.6	5.0	182.6	8.6
IPI01021371	- 157 kDa protein	156.8	9.4	135.9	2.5
IPI00298971	VTN Vitronectin	54.3	5.5	129.3	9.0
IPI00296099	THBS1 Thrombospondin-1	129.3	4.6	100.2	3.0

5.2 Identifikované proteiny ve vzorcích č.2 (D2, E2, DEJ2)

Tabulka č.7: D2-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.2 z vrstvy dentinu 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	8585.8	58.8
IPI00304962	COL1A2 Collagen alpha-2(I) chain	129.2	9.7	5193.2	57.0
IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	69.3	5.9	1442.2	43.8
IPI00975690	VIM Vimentin variant 3	49.6	5.0	1290.1	42.0
IPI00220327	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1	66.0	8.8	631.5	23.9
IPI01011344	ACTG1 Uncharacterized protein	37.4	5.3	517.7	41.1
IPI00021841	APOA1 Apolipoprotein A-I	30.8	5.5	494.5	36.0
IPI00654755	HBB Hemoglobin subunit beta	16.0	6.9	472.7	59.2
IPI00553177	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	46.7	5.3	438.3	22.5
IPI00922693	ACTB cDNA FLJ53662, highly similar to Actin, alpha skeletal muscle	38.6	5.1	415.7	4.7
IPI00022463	TF Serotransferrin	77.0	7.0	348.0	9.6
IPI00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	9.4	334.6	61.3
IPI00218918	ANXA1 Annexin A1	38.7	6.7	274.6	15.3
IPI00329801	ANXA5 Annexin A5	35.9	4.8	265.5	19.7
IPI00643384	BGN cDNA FLJ36740 fis, clone UTERU2013322, highly similar to Biglycan	34.9	9.8	265.2	17.9
IPI00844287	NES Similar to Nestin	65.8	5.1	260.0	12.3
IPI00645363	IGHV4-31;IGHG1 Putative uncharacterized protein DKFZp686P15220	51.7	9.0	259.5	9.7

IPI00789134	GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	27.9	6.5	249.9	27.7
IPI00978715	CLU Clusterin	37.2	5.8	246.6	22.6
IPI00298971	VTN Vitronectin	54.3	5.5	221.2	9.0
IPI00218343	TUBA1C Tubulin alpha-1C chain	49.9	4.8	204.1	12.9
IPI00647896	TUBB Uncharacterized protein	41.7	4.7	197.5	12.6
IPI00019359	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9	62.0	5.0	196.1	9.8
IPI01010946	PHEX cDNA FLJ51465, highly similar to Phosphate-regulating neutral endopeptidase	53.0	9.9	186.4	8.8
IPI00455315	ANXA2 Isoform 1 of Annexin A2	38.6	8.5	184.7	21.5
IPI00021304	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65.8	8.9	167.3	3.7
IPI00020986	LUM Lumican	38.4	6.2	156.3	13.3
IPI00784985	IGK@ IGK@ protein	25.5	6.2	150.5	8.5
IPI00006114	SERPINF1 Pigment epithelium-derived factor	46.3	6.0	145.4	13.6
IPI00024357	AOC2 Isoform 1 of Retina-specific copper amine oxidase	83.6	6.6	143.5	5.7
IPI00009865	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10	58.8	5.0	130.4	5.0
IPI00844306	COL5A2 COL5A2 protein	109.6	6.1	128.0	3.9
IPI00953689	AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein	39.3	5.4	124.7	8.2
IPI00974544	YWHAE Isoform SV of 14-3-3 protein epsilon	26.5	4.6	124.1	12.4
IPI00910262	POSTN Isoform 4 of Periostin	83.8	9.2	120.2	7.9
IPI00552873	HIST1H2AG;HIST1H2AK;HIST1H2AL;HIST1H2AM;HIST1H2AJ;HIST1H2AI Histone H2A type 1-J	13.9	11.3	118.7	21.9
IPI00784950	IGHA2 Putative uncharacterized protein DKFZp686L19235	51.6	5.4	115.7	4.0
IPI00022488	HPX Hemopexin	51.6	6.6	113.4	5.0
IPI00968182	GC Uncharacterized protein	38.8	5.2	113.3	7.5
IPI00021263	YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	27.7	4.6	111.4	7.8
IPI00909530	H3F3A;H3F3B;H3F3AP6;H3F3AP4 cDNA FLJ52843, highly similar to Histone H3.3	12.9	12.4	93.9	14.2
IPI00221365	DMP1 Isoform 2 of Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	54.1	3.9	93.8	3.0
IPI00453473	HIST2H4B;HIST1H4C;HIST1H4J;HIST1H4D;HIST1H4A;HIST2H4A;HIST1H4I;HIST1H4K;HIST1H4E;HIST1H4L;HIST1H4F;HIST1H4H;HIST4H4;HIST1H4B Histone H4	11.4	11.8	85.1	19.4
IPI00022371	HRG Histidine-rich glycoprotein	59.5	7.2	82.1	5.7

Tabulka č.8: E2-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.2 z vrstvy enamelu 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	2174.1	33.5
IPI00220327	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1	66.0	8.8	1642.0	34.9
IPI00304962	COL1A2 Collagen alpha-2(I) chain	129.2	9.7	1488.7	32.9
IPI00019359	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9	62.0	5.0	1397.8	32.9
IPI00009865	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10	58.8	5.0	930.5	25.7
IPI00021304	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65.8	8.9	887.6	23.7
IPI00217963	KRT16 Keratin, type I cytoskeletal 16	51.2	4.8	527.5	9.1
IPI00009867	KRT5 Keratin, type II cytoskeletal 5	62.3	8.6	482.3	9.5
IPI00384697	ALB Isoform 2 of Serum albumin	47.3	5.9	295.9	16.8

Tabulka č. 9: DEJ2-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.2 z dentin- enamelové vrstvy 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	10857.8	65.5
IPI01014827	COL1A2 Uncharacterized protein	129.4	9.7	7114.2	65.1
IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	69.3	5.9	1242.6	43.0
IPI00220327	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1	66.0	8.8	637.8	22.4
IPI00418471	VIM Vimentin	53.6	4.9	403.8	21.7
IPI00009865	KRT10 Keratin, type I cytoskeletal 10	58.8	5.0	368.0	16.8
IPI00021841	APOA1 Apolipoprotein A-I	30.8	5.5	305.0	31.8
IPI00553177	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	46.7	5.3	277.8	18.7
IPI00022463	TF Serotransferrin	77.0	7.0	274.1	8.2
IPI00654755	HBB Hemoglobin subunit beta	16.0	6.9	270.1	52.4
IPI00019359	KRT9 Keratin, type I cytoskeletal 9	62.0	5.0	265.1	11.4
IPI00010790	BGN Biglycan	41.6	7.9	238.7	15.5
IPI00953689	AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein	39.3	5.4	236.4	10.1
IPI00021304	KRT2 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65.8	8.9	174.0	3.7
IPI00976752	CLU Isoform 4 of Clusterin	48.8	6.3	151.0	14.9
IPI00298971	VTN Vitronectin	54.3	5.5	140.9	6.5
IPI00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	9.4	136.5	48.6
IPI00448925	IGHV4-31;IGHG1 44 kDa protein	43.9	6.6	120.6	8.3
IPI00022371	HRG Histidine-rich glycoprotein	59.5	7.2	94.9	5.7
IPI00844090	COL5A1 Collagen alpha-1(V) chain	183.4	4.8	90.2	1.3

5.3 Identifikované proteiny ve vzorcích č.3 (D3, E3, DEJ3)

Tabulka č.10: D3-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.3 z vrstvy dentinu 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	8378.4	61.3
IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	69.3	5.9	6664.2	93.1
IPI01014827	COL1A2 Uncharacterized protein	129.4	9.7	6147.6	61.8
IPI00975690	VIM Vimentin variant 3	49.6	5.0	1176.3	50.3
IPI00022463	TF Serotransferrin	77.0	7.0	1067.4	40.8
IPI00448925	IGHV4-31;IGHG1 44 kDa protein	43.9	6.6	848.6	48.9
IPI00953689	AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein	39.3	5.4	756.4	49.0
IPI00654755	HBB Hemoglobin subunit beta	16.0	6.9	739.4	74.1
IPI00553177	SERPINA1 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	46.7	5.3	691.4	24.9
IPI00006114	SERPINF1 Pigment epithelium-derived factor	46.3	6.0	622.8	31.8
IPI00910262	POSTN Isoform 4 of Periostin	83.8	9.2	584.5	20.1
IPI00976752	CLU Isoform 4 of Clusterin	48.8	6.3	536.3	29.3
IPI00168728	IGHM FLJ00385 protein (Fragment)	56.1	9.0	530.7	2.4
IPI00021033	COL3A1 Isoform 1 of Collagen alpha-1(III) chain	138.5	6.2	449.3	7.8
IPI00784985	IGK@ IGK@ protein	25.5	6.2	431.8	24.7
IPI00298971	VTN Vitronectin	54.3	5.5	426.0	18.0
IPI00399007	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)	46.0	8.6	402.7	4.6
IPI00893705	COL11A2 Collagen, type XI, alpha 2	159.2	7.9	284.7	4.9
IPI00930226	ACTG1 cDNA FLJ57283, highly similar to Actin, cytoplasmic 2	39.8	5.1	272.6	28.9
IPI00911034	cDNA FLJ59360, moderately similar to Biglycan	33.5	6.5	246.1	26.3
IPI00021841	APOA1 Apolipoprotein A-I	30.8	5.5	236.8	27.3
IPI00220327	KRT1 Keratin, type II cytoskeletal 1	66.0	8.8	219.1	11.3
IPI00410714	HBA2;HBA1 Hemoglobin subunit alpha	15.2	9.4	210.0	35.9
IPI00019568	F2 Prothrombin (Fragment)	70.0	5.6	188.5	9.0
IPI00555812	GC vitamin D-binding protein isoform 1 precursor	52.9	5.2	162.1	7.8
IPI00022429	ORM1 Alpha-1-acid glycoprotein 1	23.5	4.8	162.0	14.4
IPI00431645	HPR 31 kDa protein	31.4	9.3	153.3	10.7
IPI00789134	GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	27.9	6.5	124.7	19.2
IPI00853061	COL6A3 collagen alpha-3(VI) chain isoform 2 precursor	113.2	5.4	108.6	4.0
IPI00872967	DSPP Dentin sialophosphoprotein	131.1	3.4	88.1	2.0
IPI00020986	LUM Lumican	38.4	6.2	87.6	10.1
IPI00021854	APOA2 Apolipoprotein A-II	11.2	7.1	81.4	25.0
IPI01018060	IgLC3 Ig lambda-3 chain C regions	11.2	7.7	80.2	14.2

Tabulka č.11: E3-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.3 z vrstvy enamelu 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	2934.1	46.5
IPI01014827	COL1A2 Uncharacterized protein	129.4	9.7	2296.1	37.5
IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	69.3	5.9	1793.5	47.0
IPI00953689	AHSG Alpha-2-HS-glycoprotein	39.3	5.4	157.3	25.6
IPI00945626	TF cDNA FLJ54029, highly similar to Serotransferrin	63.4	7.2	109.0	7.0
IPI01010099	POSTN Uncharacterized protein	30.5	5.0	102.8	8.3
IPI00982925	Truncated beta-globin	7.0	9.5	90.8	34.9

Tabulka č. 12: DEJ3-1. Identifikované proteiny ze vzorku č.3 z dentin- enamelové vrstvy 1

Mezinárodní Protein Index	Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]	pI	MASCOT skóre	SC [%]
IPI00297646	COL1A1 Collagen alpha-1(I) chain	138.9	5.5	4771.2	53.5
IPI01014827	COL1A2 Uncharacterized protein	129.4	9.7	3176.7	53.4
IPI00384697	ALB Isoform 2 of Serum albumin	47.3	5.9	216.5	10.6

6. DISKUSE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zkusit identifikovat proteiny v tenké spojovací vrstvě dentin-enamel (DEJ) přítomné v lidských zubech moudrosti pomocí aplikace metody laserové mikrodisekce na vzorky, následované izolací proteinů a jejich analýzou hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením.

Příprava vzorků č. 1 (zubního dentinu, enamelu a dentin-enamelové vrstvy) spočívala v demineralizaci očištěných zubních korunek v roztoku EDTA pufru. Do pufru byla přidána tableta koktejlu inhibitorů proteáz, aby byla eliminována degradace proteinů ve vzorcích enzymy proteáz. Demineralizace byl velice pomalý a zdoluhavý proces, průběžně byl každý týden vyměňován roztok pufru za čerstvý. Po dvou týdnech demineralizace změkla vrchní vrstva korunky. O další týden později již bylo zřetelněji patrné rozhraní vrstvy dentin- enamel a vrchní vrstva enamelu se po kouscích rozpadala.

Vzorky zubů č. 2 byly nařezány na tenké plátky o tloušťce cca 0,1 – 0,2 mm pomocí vysokootáčkové rozbrušovačky. Poté pomocí laserové mikrodisekce byly z těchto plátků zubů vyřezány plochy dentinu, enamelu a DEJ. Nejlépe šly vyřezat plochy v oblasti enamelu, kde byla vrstva vzorku po vybroušení plošky zubu nejtenčí. Čím blíže byla zvolená oblast řezání středu vzorku, tím bylo vyřezávání obtížnější a zdoluhavější, jelikož tloušťka vzorku byla na laserový paprsek příliš silná, než na jakou je metoda laserové mikrodisekce běžně používána. Během řezání bylo proto potřeba zapotřebí průběžně fokusovat laserový paprsek na oblasti výřezu dentinu a DEJ. Tento postup přípravy vzorku byl inspirován optimalizovaným protokolem studie Shevchenka a kol. z roku 2006 [6].

V nalezených vzorcích byly často identifikovány keratiny, které jsou přítomny běžně ve všude přítomném laboratorním prachu a většinou pocházejí z lidské kůže [32]. Nejhojnějším keratinem zastoupeným v polétavém prachu je lidský cytoskeletární keratin (KRT10). K eliminaci kontaminace vzorků keratiny je potřeba pracovat v prostředí se sníženým množstvím prachu v laboratoři např. zpracovávat vzorky v laminárním boxu. Majoritní část identifikovaných proteinů ve vzorcích zubů byla zastoupena lidskými kolageny COL1A1, COL1A2. Též byly identifikovány proteoglykany (BGN, HRG, AHSG). Ve vzorcích DEJ byl též často identifikován apolipoprotein (APOA1) a vimentin (VIM).

Ve vzorcích č. 1 bylo metodou demineralizace identifikováno 18 různých proteinů ve vrstvě DEJ (viz. Tab.č. 5, 6). Identifikovány byly proteiny SERPINF1, které patří mezi proteázové inhibitory ze skupiny serpinů. SERPINF1 byl popsán jako přírodní inhibitor angiogeneze. Indukuje apoptózu a nekrózu prostřednictvím aktivace peroxizómů se podílí na modulaci zánětlivých reakcí [33]. Dále byl nalezen vimentin, strukturální složka cytoskeletu důležitá pro růst buněk. Z glykoproteinů extracelulární matrix byly identifikovány vitronectin, důležitý pro buněčnou adhezi a osteomodulin, který je exprimován osteoblasty a je důležitý pro vývoj a mineralizaci zubu [33]. Také byl nalezen necharakterizovaný protein (IPI01021371).

Ve vzorcích č.2 byla použita metoda extrakce proteinů do hydrogenuhličitanu amonného. Touto metodou bylo identifikováno přes 40 různých proteinů a ve vrstvě DEJ detekován vedle vimentinu, vitronektinu, SERPINF1 a apolipoprotein APOA1 (viz. Tab.č. 9). Funkcí apolipoproteinu A-1 je aktivace lecitin-cholesterol acyltransferázy (LCAT), která je zodpovědná za esterifikaci cholesterolu v plazmě. Porovnáním předchozí studie Jágra a spol. analýzy dentinu z roku 2012, vědců z Fyziologického ústavu AV ČR byl touto metodou v dentinu navíc identifikován periostin (POSTN) a nestin (NES).

Vzorky č.3 byly zpracovány metodou denaturace proteinů inkubací v roztoku močoviny. Tato metoda identifikovala ve vrstvě DEJ pouze tři proteiny (COL1A1, COL1A2, ALB), jejichž MASCOT skóre bylo vyšší než 80 (viz. Tab.č. 12).

Postup přípravy byl inspirován studií Salmon a kol. z roku 2016, ve srovnání s touto studií byla metoda laserové mikrodisekce použita na analýzu proteomu lidského dentinu, enamelu a vrstvy DEJ a nikoliv na vrstvu myšího zubního cementu. Ovšem poprvé v této studii Salmon a kol. byla použita metoda LMD na analýzu proteomu vrstvy zubu.

V této práci byla jako první aplikována metoda laserové mikrodisekce na vrstvu DEJ, dentinu a enamelu, tudíž nejsou dostupné další výsledky k porovnání se získanými výsledky z experimentu.

Metoda laserové mikrodisekce není prozatím tolik rozšířená v oblasti dentální proteomiky z důvodu problematické přípravy neporušených, dekalcifikovaných vzorků silně mineralizovaných tkání dentinu, enamelu [34].

Nejúspěšnější metodou bylo laserové vyřezávání DEJ vrstvy následované štěpením proteinů v pufru hydrogenuhličitanu amonného, tato metoda umožnila stanovit nejvíce různých proteinů, jak v DEJ vrstvě, tak i pro dentin a enamel. Všechna měření byla prováděna na koloně dlouhé 15 cm. Je možné, že pokud by byla použita delší kolona mohlo by být identifikováno ještě více proteinů.

7. ZÁVĚR

V této práci byla provedena analýza proteomu DEJ, dentinu a enamelu lidských zubů moudrosti. Celkem byly vyzkoušeny tři různé metody. Demineralizace, laserová mikrodisekce a extrakce proteinů do hydrogenuhličitanu amonného. Nejlépe se osvědčila metoda č. 2, vyřezávání vzorku pomocí laseru, touto metodou bylo identifikováno nejvíce proteinů v DEJ vrstvě.

Metodou demineralizace byly detekovány pro vrstvu DEJ zástupci stejných proteinů jako z postupu č.2, navíc byl identifikován SERPINF1, ovšem tato metoda byla oproti práci s laserem velice zdlouhavá.

Analýzou byly nejčastěji detekovány lidské kolageny a keratinové proteiny ve všech vzorcích. Ve vzorcích DEJ byly navíc identifikovány proteiny APOA1, vimentin, vitronectin, osteomodulin a SERPINF1.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Collinsová M., Jiráček J. Současný vývoj v proteomice. *Chemické Listy* **2004**, *98*, 1112–1118.
- [2] Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **2000**, *405*, 837–846.
- [3] Šeda O., Liška F., Šedová L. Úvod do proteomiky. Aktuální genetika, 2006. Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky. <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/proteomika.htm> , Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN [cit. 4/ 2016].
- [4] Park ES., Cho HS., Kwon TG., Jang SN., Lee SH., An CH., Shin HI., Kim JY., Cho JY. *Proteomics analysis of human dentin reveals distinct protein expression profiles. Journal of Proteome Research* **2009**, *8* (3), 1338–1346.
- [5] Jágr M., Eckhardt A., Pataridis S., Mikšík I. A Comprehensive Proteomic Analysis of Human Dentin. *European Journal of Oral Sciences* **2012**, *120*, 259–268.
- [6] Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen JV., Mann M.: In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nature Protocols* **2006**; *1*(6), 2856-2860.
- [7] Salmon CR., Giorgetti AP., Leme AF., Domingues RR, Sallum EA., Alves MC., Kolli TN., Foster BL., Nociti FH. jr.: Global proteome profiling of dental cementum under experimentally-induced apposition. *Journal of proteomics* **2016**, *141*, 12-23.
- [8] Dusevich V., Xu Ch., Wang Y., Walker MP., Gorski JP. Identification of a protein-containing enamel matrix layer which bridges with the dentine–enamel junction of adult human teeth. *Archives of Oral Biology* **2012**, *12* (57), 1585–1594.
- [9] Mazánek J. *Zubní lékařství: propedeutika*, 1st ed.; Grada Publishing, a.s.: Praha, 2014.
- [10] Jágr M., Eckhardt A., Pataridis S., Broukal Z., Dušková J., Mikšík I. Proteomics of Human Teeth and Saliva. *Physiological Research (Prague)* **2014**, *63* (1), 141–154.
- [11] Správná dentální hygiena. Dostupné z URL: <<http://www.spravna-dentalni-hygiena.mypage.cz/menu/vyvoj-a-stavba-zubu>> [cit. 4/ 2016].

- [12] Bansal AK., Shetty DC., Bindal R., Pathak A. A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. *Journal of Oral Maxillofacial Pathology* **2012**, 16 (3), 395–399.
- [13] Suzuki S., Sreenath T., Haruyama N., et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **2009**, 24 (4), 221–229.
- [14] Sui T., Lunt JG., Baimpas N., Sandholzer MA., Li T., Zeng K., Landini G., Korsunsky AM. Understanding nature's residual strain engineering at the human dentine– enamel junction interface. *Acta Biomaterialia* **2016**, 32, 256–263.
- [15] Bazos P., Magne P. Bio-emulation: biomimetically emulating nature utilizing a histo-anatomic approach; structural analysis. *European Journal of Esthetic Dentistry* **2011**, 6 (1), 8–19.
- [16] McGuire D., Walker MP., Mousa A., Wang Y., Gorski JP. Type VII collagen is enriched in the enamel organic matrix associated with the dentin– enamel junction of mature human teeth. *Bone* **2014**, 63, 29–35.
- [17] Furtado Gonçalves P., Sallum EA., Sallum WA., Casati MZ., Toledo S., Nociti FH.jun. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Brazilian Journal of Oral Sciences* **2005**, 12 (4), 651–658.
- [18] Strub JR., Kern M., Türp JC., Witkowski S., Heydecke G., Wolfart S. *Protetika I. 4., přepracované a rozšířené vydání*, 1st ed.; Grada Publishing, a.s.: Praha, 2016.
- [19] Sloan AJ. Biology of the Dentin-Pulp Complex. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*; Tissue Engineering and Reparative Dentistry, School of Dentistry, College of Biomedical and Life Sciences, Cardiff University, Heath Park: Cardiff, United Kingdom, **2015**; 371–378.
- [20] Lee HY., Zimmerman JN., Custodio W., Xiao Y., Basiri T., Hatibovic-Kofman S., Siqueira WL. Proteomic Evaluation of Acquired Enamel Pellicle during In Vivo Formatio. *Departments of Biochemistry and School of Dentistry, Schulich School of Medicine and Dentistry, The University of Western Ontario, London, ON, Canada* **2013**, 8 (7).

- [21] Formation and Role of Dental Pellicle This is a featured page, 2010. The Cariology Project. <http://cariology.wikifoundry.com/page/Formation+and+Role+of+Dental+Pellicle> [cit. 4/ 2016].
- [22] Vajrychová M., Tambor V., Lenčo J. Možnosti proteomických metod v klinické diagnostice. *Klinická biochemie a metabolismus* **2012**, 20 (41), 158–164.
- [23] Bouchal P., Kučera I. Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chemické Listy* **2003**, 97, 29–36.
- [24] Skalníková H., Kovářová H., Moos J., Filová V., Halada P.: Systém pracující na principu dvojrozměrné kapalinové chromatografie proteinů jako alternativa k dvojrozměrné gelové elektroforéze. *Chemické Listy* **2005**, 99, 952–956.
- [25] Váňa P., Šmarda J.: Optimalizace přípravy vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu. *Chemické Listy* **2004**, 98, 1130-1134.
- [26] Rabilloud T. *Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods.*; Springer: Berlin, 2000.
- [27] Anzenbacher P., Kovář J. *Metody chemického výzkumu pro biochemiky (dočasná vysokoškolská učebnice)*, 1st ed.; Tiskařské závody, n. p.: Praha, 1986.
- [28] Lenčo J., Stulík J.: Identifikace proteinů kombinací peptidového mapování a fragmentace sulfonovaných peptidů. *Chemické Listy* **2004**, 98, 264–267.
- [29] Vítámvás P., Kosová K., Škodáček Z., Prášil I.: Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-D DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické Listy* **2010**, 104, 671–676.
- [30] Podgorny OV., Lazarev VN. Laser microdissection: A promising tool for exploring microorganisms and their interactions with hosts. *Journal of Microbiological Methods* **2016**, 1 (6).
- [31] Rappsilber, J., Mann M., Ishihama, Y.: Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* **2007**, 2 (8), 1896–1906.

[32] Petrák J., Ivánek R., Toman O., Cmejla R., Cmejlová J., Vyoral D., Živný J., Vulpe Ch. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* **2008**, 8, 1744–1749.

[33] Sino Biological Inc. Biological Solution Specialist. <http://www.sinobiological.com> [cit. 5/ 2016].

[34] Thennavan A., Sharma M., Chandrashekar C., Hunter K., Radhakrishnan R. Exploring the potential of laser capture microdissection technology in integrated oral biosciences. *Oral Diseases* **2016**, článek v tisku [cit. 5/ 2017].