

## Abstrakt

Modifikace proteinů lipidovou strukturou je poměrně běžná post-translační modifikace, která ovlivňuje vlastnosti proteinů a má přímý vliv na vazbu modifikovaných proteinů do buněčných membrán. Některé lipidované proteiny hrají roli v různých patologických procesech. Při proteomické analýze těchto proteinů je zkoumaný vzorek nejprve naštěpen pomocí proteázy. Vzniklý hydrolyzát obsahuje jak nemodifikované peptidy, tak i peptidy nesoucí lipidovou modifikaci. Při následné chromatografické separaci se lipopeptidy od těch nemodifikovaných výrazně liší svým chováním. Z tohoto důvodu je analýza lipopeptidů, potažmo lipoproteinů, z hlediska separace a detekce problematická.

Předmětem této diplomové práce byla optimalizace analýzy lipoproteinů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Postupy byly testovány na lipoproteinech Cya A (bifunkční adenylát-cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*) a MMTV (matrixový protein viru myšího tumoru prsních žláz).

Nejprve byly testovány různé postupy přípravy vzorků zahrnující proteolytické štěpení. Při enzymatickém štěpení trypsinem na filtru (eFASP) došlo k zachycení lipidové modifikace s vysokou mírou spolehlivosti. V dalším kroku bylo testováno nastavení gradientové eluce pro chromatografickou metodu. Jako vhodný byl zvolen gradient dlouhý 70 minut (0-5 min 5 % B, do 25. min 25 % B, do 50. min 100 % B, 50-55 min 100 % B, 56-70 min 5 % B), organickou složkou mobilní fáze byl 100% ACN s přídavkem 0,1% FA. Následně byla optimalizována metoda hmotnostní detekce. Pro nalezení optimálních podmínek MS detekce lipopeptidů byly fragmentovány standardní roztoky syntetizovaných lipopeptidů. Pro získání strukturně bohatých MS/MS spekter byla zvolena HCD fragmentace s kolizní energií 30 a 45 eV. Tato metoda poskytovala MS/MS spektra obsahující informace jak o struktuře peptidu, tak i indikační ionty N-terminální myristoylace. Dále byl ve spolupráci s Ing. Kamilou Clarovou navržen skript pro vyhodnocování spekter peptidů s cílením na N-terminální myristoylace.

Celý optimalizovaný postup byl aplikován na vzorek proteinu MAPPhis (matrixový protein Mason-Pfizer opičího viru s histidinovou značkou). Cílem tohoto experimentu bylo ověření funkčnosti systému a nalezení N-terminální myristoylace daného proteinu.