

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Marta Kadeřábková

Optimalizace analýzy lipopeptidů pomocí kapalinové  
chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Optimization of lipopeptide analysis by LC-MS

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Praha 2020

Tato diplomová práce vznikla na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR.

## 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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12. 8. 2020

.....  
Marta Kadeřábková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Mgr. Martinu Hubáčkovi, Ph.D. za vstřícnost, odborné vedení a pomoc při vypracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. za cenné rady a umožnění vypracovat svojí diplomovou práci ve skupině Hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR.

## 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 přídatkem 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.

Výsledky ukázaly, že navržený postup je schopný odhalit N-terminální myristoylaci proteinů.

### **Předmětová slova**

Lipoproteiny, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

### **Klíčová slova**

Lipopeptidy, Cya A, MMTV

## Abstract

Modification of proteins by lipid structure is relatively common post-translational modification that affects the properties of proteins directly and has a forthright effect on the binding of modified proteins to cell membranes. Some lipoproteins play key role in various pathological processes. Before the proteomic analysis of these proteins, the sample of interest is digested using a protease. The resulting hydrolysate contains both unmodified peptides and peptides bearing a lipid modification. During the subsequent chromatographic separation, the lipopeptides differ significantly from the unmodified peptides. For this reason, the analysis of lipopeptides, lipoproteins respectively, is problematic in terms of separation and detection.

The subject of the study of this diploma thesis was the optimization of the method of lipoprotein analysis using liquid chromatography and mass spectrometry. The procedures were tested on lipoprotein Cya A (bifunctional adenylate-cyclase toxin from *Bordetella pertussis*) and MMTV (matrix protein of mouse mammary tumour virus).

First, various sample preparation procedures involving proteolytic cleavage were tested. When enzymatic digestion using trypsin on filter (eFASP) was used, the lipid modification was detected with high degree of reliability. In the next step, the gradient elution setting for the chromatographic method was tested. A gradient of 70 minutes was chosen (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), 100% ACN with 0,1% FA was used as an organic mobile phase. Subsequently, the mass detection method was optimized. Standard solutions of synthesized lipopeptides were fragmented in order to find optimal conditions for fragmentation. HCD fragmentation with a collision energy of 30 and 45 eV was chosen to obtain structurally rich MS/MS spectra. Using this method recorded MS/MS spectra obtained information both on peptide structure and N-terminal myristoylation indicator ions. Furthermore, a script for peptide spectra evaluation targeting N-terminal myristoylation was proposed in collaboration with Kamila Clarova, M.Sc.

The complete optimized procedure was applied to sample containing protein MAPPhis (matrix protein of Mason-Pfizer monkey virus). The aim of this experiment was to verify the functionality of the system and to detect the N-terminal myristoylation

of this protein. The results showed that the proposed procedure is able to detect N- terminal myristoylation of proteins.

### **Objective words**

Lipoproteins, liquid chromatography, mass spectrometry

### **Key words**

Lipopeptides, Cya A, MMTV

## Obsah

1	Cíl práce .....	11
2	Teoretický úvod.....	12
2.1	Lipoproteiny.....	12
2.1.1	Adenylát cyklázový toxin <i>Bordetelly pertussis</i> .....	15
2.1.2	Matrixový protein viru myšního nádoru mléčné žlázy.....	16
2.2	Hmotnostní spektrometrie.....	17
2.2.1	Ionizace elektrosprejem .....	18
2.2.2	Orbitrap Fusion Lumos Tribid .....	20
2.2.3	Fragmentace.....	23
2.3	Vyhodnocení hydrofobicity aminokyselin.....	25
2.4	Vyhodnocování spekter .....	27
3	Experimentální část.....	29
3.1	Použité chemikálie a vybavení .....	29
3.2	Instrumentace .....	30
3.3	Příprava zásobních roztoků.....	30
3.4	Enzymatické štěpení lipoproteinu v roztoku pomocí trypsinu .....	31
3.5	Enzymatické štěpení lipoproteinu pomocí trypsinu na filtru (eFASP).....	31
3.6	Extrakce kapalina – kapalina .....	32
3.7	Extrakce na pevné fázi.....	33
3.8	Odsolení na PepClean kolonkách .....	33
4	Výsledky a diskuze.....	34
4.1	Příprava vzorku.....	34
4.2	Optimalizace gradientu .....	36
4.3	Chování peptidů na chromatografii a vztah ke Gravy indexu .....	41
4.4	Optimalizace MS detekce .....	44
4.4.1	Fragmentace standardních lipopeptidů.....	44
4.4.2	Aplikace na LC-MS/MS metody.....	51
4.5	Vyhodnocování spekter .....	53
4.6	Aplikace metody na vzorek proteinu MAPPhis .....	57
5	Závěr.....	60
6	Seznam zdrojů.....	62



## Seznam zkratk a symbolů

ABC – hydrogenuhličitan amonný

AC – adenylát cykláza

ACN – acetonitril

ATP – adenosintrifosfát

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CE – kolizní energie

CID – kolizně indukovaná disociace

Cya A – adenylát-cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*

Da – dalton

DCA – deoxycholová kyselina

DD mód – datově závislý mód

DTT – dithiotreitol

eFASP – enzymatické štěpení lipoproteinu pomocí trypsinu na filtru

ESI – ionizace elektrosprejem

ETD – disociace přenosem elektronu

EThcD – disociace přenosem elektronu při vyšší energii

eV – elektronvolt

FA – kyselina mravenčí

GPI – glykosilfosfatidylinositol

HCD – kolizní disociace při vyšší energii

IAA – jodoacetamid

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

K – korelační koeficient

LLE – extrakce kapalina-kapalina

MAPPhis – matrixový protein Mason-Pfizer opičího viru s histidinovou kotvou

MMTV – matrixový protein viru myšího tumoru prsních žláz

MS – hmotnostní spektrometrie

MS<sup>2</sup> – hmotnostní spektrum 2. řádu

*m/z* – poměr hmotnosti ku náboji

pA – promývací pufr A

pB – promývací pufr B

RP – reverzní fáze

RT – retenční čas

SPE – extrakce na pevné fázi

TCEP – tris(2-karboxyethyl)fosfin

TFA – kyselina trifluoroctová

TFE – trifluorethanol

TIC – celkový iontový proud

XIC – extrahovaný iontový proud

## 1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo nalezení optimálních podmínek pro analýzu lipopeptidů vzniklých enzymatickým štěpením lipoproteinů pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Dalším cílem bylo navržení prohledávacího algoritmu pro identifikaci N-terminální myristoylace.

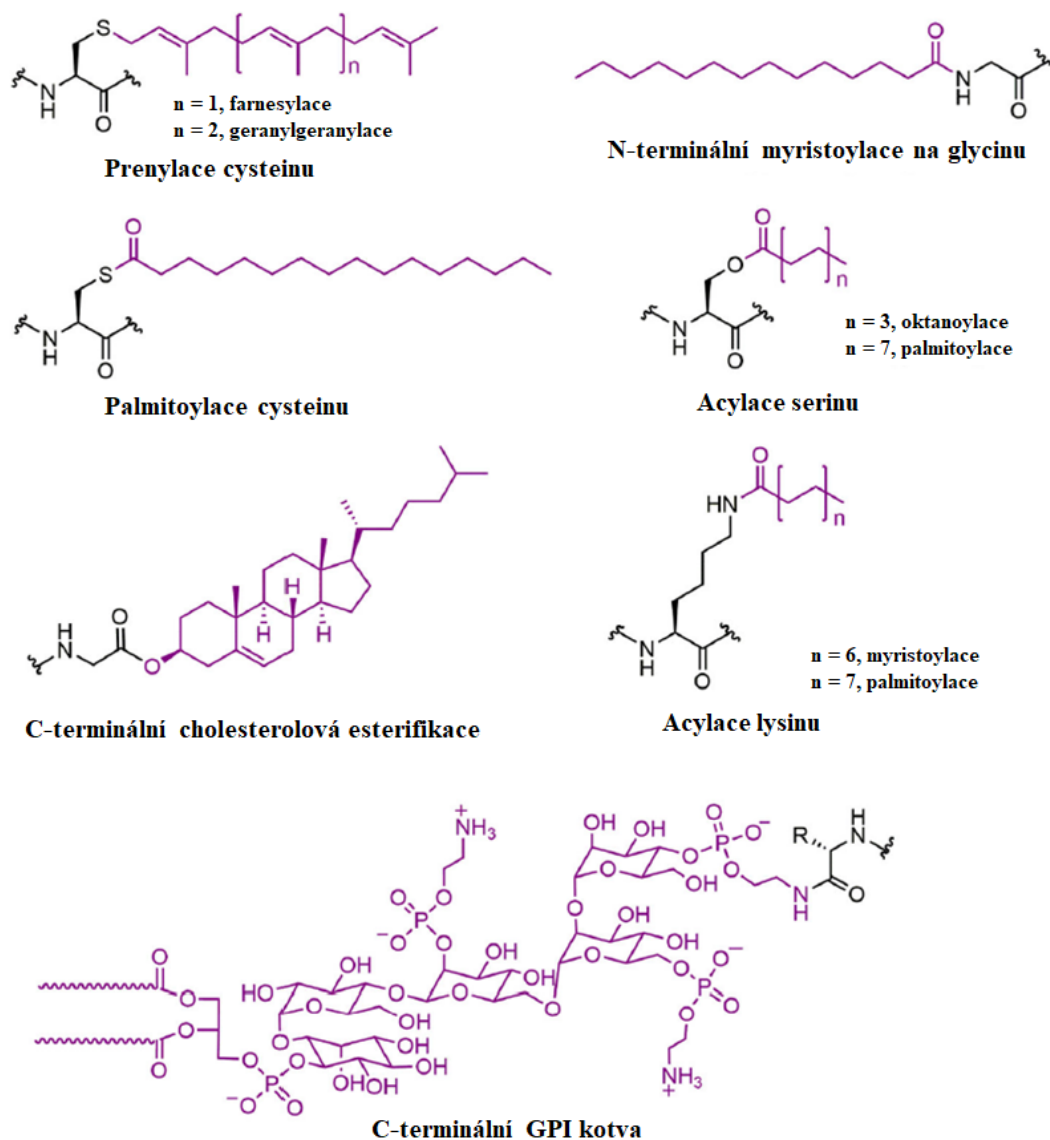
Pro experimenty byly používány lipoproteiny Cya A a MMTV a dále syntetické peptidy modifikované kyselinou myristovou a palmitovou. V závěru práce je celý postup aplikován na matrixový protein Mason-Pfizer opičího viru (MAPPHis), který nese na N-konci modifikaci kyselinou myristovou.

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Lipoproteiny

Lipidace neboli kovalentní navázání lipidové složky na protein je velmi významnou biochemickou reakcí řadící se mezi post-translační modifikace. Mezi prvními ji popsali Folch a Lees v roce 1951, kteří studovali molekuly proteinů s kovalentně navázanými lipidy v mozkové tkáni.<sup>1</sup> Od té doby jsou lipidace a lipidované proteiny předmětem mnoha studií. Byly objeveny ve všech formách života, nejsložitější podoby modifikace byly popsány u eukaryot, kde regulují především transport vezikul a buněčnou signalizaci.<sup>2</sup> Jako jediná post-translační modifikace přímo reguluje asociaci modifikovaného proteinu s buněčnými membránami. Dále ovlivňuje protein-proteinové interakce, přenos proteinů, změny ve struktuře a regulaci stability proteinů.<sup>2-5</sup> Bylo také objeveno, že lipoproteiny a enzymy regulující jejich syntézu mohou způsobovat nebo ovlivňovat různá onemocnění.<sup>5-8</sup> Některé bakteriální lipoproteiny jsou přímo toxiny<sup>8</sup>, zatímco enzymy mají neurodegenerativní účinky, působí jako onkogeny nebo mají tumor supresivní funkci.<sup>9</sup>

Modifikace na jednotlivých proteinech se od sebe liší druhem navázané lipidové složky a také pozicí na polypeptidovém řetězci, kam se lipid váže. Proteiny mohou být modifikovány na obou koncích polypeptidového řetězce nebo na některé aminokyselině uvnitř řetězce. Lipidové složky, které se běžně vážou na proteiny, jsou mastné kyseliny, isoprenoidy, fosfolipidy, steroly a glykosilfosfatidylinositoly.<sup>10</sup> Na N-konci se nejčastěji vyskytuje modifikace glycinu nasycenou mastnou kyselinou se čtrnácti nebo šestnácti uhlíky označovaná jako N-myristoylace, resp. N-palmitoylace. Na C-konec polypeptidového řetězce se váže glykosilfosfatidylinositol (GPI) kotva. Další možností je esterifikace C-konce cholesterolem. Lipomodifikace aminokyselin uvnitř proteinového řetězce se liší typem vazby podle aminokyselin, které modifikují. Na serin nebo threonin se acyly mastných kyselin vážou přes atom kyslíku esterovou vazbou, tyto modifikace se nazývají jako o-acylace. S-acylace označuje napojení mastné kyseliny na atom síry v cysteinu pomocí thioesterové vazby. Mastná kyselina je také často navázán amidovou vazbou na postranní řetězec lysinu. Struktury vybraných modifikací jsou znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1: Struktury vybraných lipomodifikací, převzato z <sup>6</sup> a upraveno

V rámci jednoho proteinu se může vyskytovat kombinace až dvou různých lipomodifikací (např. N-myristoylace + palmitoylace, palmitoylace + esterifikace cholesterolem).<sup>10</sup>

S-palmitoylace spolu s N-myristoylací patří mezi nejvíce zastoupené lipomodifikace proteinů, které určují interakce proteinů s membránami a jejich signalizační a patogenní vlastnosti.<sup>10</sup> Proteiny podléhající N-myristoylaci obsahují sekvenci Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr na N-konci. U eukaryot se předpokládá, že až 1 %

všech proteinů má na N-konci navázanou kyselinou myristovou.<sup>10</sup> Existují algoritmy, které analyzují zda je pravděpodobné, že konkrétní N-terminální sekvence bude modifikována.<sup>11-13</sup> K napojení kyseliny myristové na glycin dochází ještě během translace proteinu po odštěpení počátečního methioninu, jedná se tedy o ko-translační modifikaci.<sup>10,14</sup> N-myristoylace má zásadní význam pro přenos signálu, apoptózu a některé patologické procesy způsobené virem, prvoky nebo houbami.<sup>5-7</sup> Jedním takovým proteinem je i matrixový protein viru myšího tumoru prsních žláz (MMTV). Cílení na tuto modifikaci je slibné pro vývoj léčiv proti těmto nemocem.<sup>15</sup>

S-pamitoylace, neboli reverzibilní navázání zbytku kyseliny palmitové na cystein pomocí thioesterové vazby, je post-translační modifikací, která se objevuje u periferních membránových a transmembránových proteinů.<sup>10,16</sup> Úlohou palmitovaných proteinů je vazba na membrány, lokalizace lipidových raftů nebo výměna a stabilita proteinů.<sup>10</sup> Kyselina palmitová se může také vázat amidovou vazbou přes dusík na postranním řetězci lysinu. Tato modifikace se vyskytuje převážně u prokaryotických buněk. Jedním z takových proteinů je bifunkční adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*. Tento protein byl jedním z proteinů studovaných v této diplomové práci.

Dalším významnou lipidovou modifikací je prenylace, označovaná také jako polyisoprenylace, kdy je na postranní řetězec cysteinu blízko C-konce polypeptidového řetězce navázáno několik jednotek isoprenu. Jedná se o často vyskytující se modifikaci, až 2 % všech savčích buněčných proteinů je prenylovaných.<sup>6,17</sup> Existují dva typy prenylace. Prvním typem je farnesylace, kdy jsou na řetězec navázány tři jednotky isoprenu. V druhém případě se vážou čtyři jednotky isoprenu a modifikace se nazývá geranylgeranylace. Tento typ prenylace proteinů převažuje.<sup>6,15</sup> Isoprenyl se na cystein váže přes atom síry thioetherovou vazbou, která je pevná a předpokládá se, že je ireverzibilní. Také nebyl identifikován žádný enzym, který by štěpil vazbu na intaktním proteinu.<sup>6,18,19</sup>

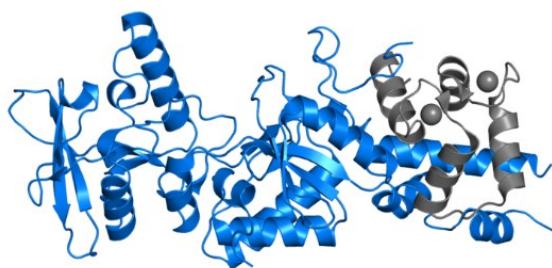
Mnoho proteinů lokalizovaných na buněčném povrchu je modifikovaných GPI kotvou. Takto modifikované proteiny mohou fungovat jako receptory, transcytotické molekuly, adhezní molekuly nebo inhibitory proteáz.<sup>20</sup> GPI kotva sestává z fosfatidylinositolu, glykanů a terminálního fosfoethanolaminu, který je amidovou vazbou připojen k C-konci proteinu. Celý komplex je nejprve složen v endoplazmatickém retikulu a poté je kovalentně navázán na karboxylový konec proteinu.<sup>10,20</sup>

### 2.1.1 Adenylát cyklázový toxin *Bordetelly pertussis*

Bakterie *Bordetella pertussis*, původce černého kašle, produkuje bifunkční hemolysin/adenylát-cyklázu (ATP pyrofosfát lyáza [E.C.4.6.1.1]), označovaný také jako CyaA. Tento adenylát cyklázový (AC) toxin je zásadním faktorem virulence bakterie. Je to rozpustný, tepelně stabilní a vysoce aktivní enzym, asociovaný s bakteriálním obalem. Představuje důležitou strategii pro adaptaci bakterie, čímž umožní přežití a replikaci jinak zranitelného organismu.<sup>21</sup>

Jedná se o kalmodulinem aktivovaný enzym, který proniká do eukaryotických buněk a katalyzuje reakci přeměny endogenního ATP na cyklický AMP (cAMP).<sup>21,22</sup> Zvýšené koncentrace intracelulárního cAMP inhibují fyziologické procesy fagocytárních leukocytů a předpokládá se, že zhoršení funkce imunitních efektorových buněk je hlavním příspěvkem AC toxinu k patogenezi *Bordetelly pertussis*.<sup>21,23</sup> V důsledku proniknutí toxinu do membrán cílových buněk má také hemolytické činky.<sup>24,25</sup> Adenylát-cyklázový toxin je překládán jako 177,5 kDa protein genu *cyaA* a jeho toxicita a hemolytická aktivita jsou závislé na produktu doplňkového genu *cyaC*, který je zapojen do post-translační modifikace AC toxinu.<sup>26</sup>

Celý protein se skládá z 1706 aminokyselin a jak je vidět na Obr. 2, řetězec lze rozdělit na 2 funkční domény. Přibližně 400 aminokyselin od N-konce tvoří adenylát-cyklázovou doménu, na kterou je napojena hemolysinová doména, která je svou strukturou příbuzná velké skupině bakteriálních toxinů, tzv. RTX-toxinů.<sup>27</sup> Před C-koncem sekvence jsou opakující se motivy vázající vápník.<sup>27,28</sup> Postranní řetězce lysinů K860 a K983 jsou post-translačně modifikovány kyselinou palmitovou, případně palmitoolejovou.<sup>22,29</sup> Kovalentní navázání zbytku mastné kyseliny je katalyzováno proteinem CyaC.<sup>26</sup>



Obr. 2: Struktura proteinu Cya A, převzato z <sup>30</sup>.

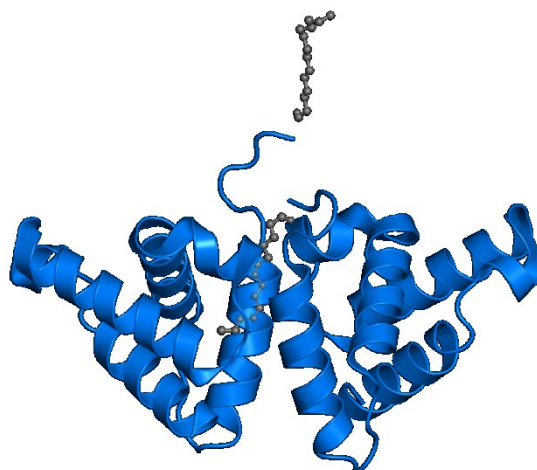
Ke studiu AC toxinu *Bordetelly pertussis* byly použity různé postupy. V roce 1989 studovali Hewlett a kolektiv protein CyaA pomocí imunoprecipitačních metod. Používali metodu enzymově-vázané imunosorbentové analýzy se specifickými monoklonálními protilátkami.<sup>31</sup> Dále byl protein studován pomocí gelové elektroforézy a Western blottingu.<sup>31</sup> V dnešní době se ke zkoumání AC toxinu i jiných proteinů nejčastěji využívá spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií (MS). V rámci této diplomové práce byl lipoprotein CyaA studován pomocí systému HPLC-MS.

### 2.1.2 Matrixový protein viru myšího nádoru mléčné žlázy

Virus myšího nádoru mléčné žlázy byl poprvé popsán ve 30. letech minulého století jako induktor rakoviny přenášený mlékem.<sup>32</sup> Jedná se o retrovirus, který způsobuje karcinom prsu a lymfomy T-buněk.<sup>33</sup> Před pučením v hostitelské buňce vytváří virus strukturu nezralých částic, která je tvořena několika tisíci molekulami strukturního polyproteinu Gag. Tento polyprotein obsahuje N-terminální doménu tvořenou matrixovým proteinem (MMTV), který je zodpovědný za vazbu na plazmatickou membránu. Po pučení dochází ke štěpení Gag a přeskupení jednotlivých zralých proteinů, matrixové proteiny zůstávají inkorporované v obalové membráně a vytváří vnější obal virové částice.<sup>34</sup> Asociace MMTV s plasmatickou membránou je způsobena N-terminální myristoylací.<sup>35,36</sup> Mastná kyselina na polypeptidovém řetězci zajišťuje ukotvení mezi lipidovými řetězci v plasmatické membráně. MMTV se skládá z 591 aminokyselin, ve



své nativní podobně tvoří několik  $\alpha$ -helixů. N-terminální myristoylace přispívá k tvorbě dimerů (Obr. 3).<sup>37</sup>



Obr. 3: Struktura dimeru MMTV, převzato z <sup>37</sup>.

V publikovaných studiích byl protein MMTV analyzován pomocí několika metod, mezi nimi například gelová elektroforéza<sup>36</sup>, plynová chromatografie s MS detekcí<sup>36</sup> nebo HPLC-MS<sup>38</sup>. Analýza pomocí HPLC-MS byla pro studium MMTV použita i v této diplomové práci.

## 2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytickou metodou využívanou v chemii, biochemii, farmacii a dalších blízkých odvětvích. Mezi klíčové aplikace MS patří elementární a isotopická analýza, organická analýza, určování struktury analytů, charakterizace iontových druhů a chemických reakcí a v neposlední řadě se MS využívá ve spojení se separačními technikami.<sup>39</sup> Cílem MS je identifikovat látky na základě jejich hmotností. Kromě naměřených hodnot poměru hmoty ku náboji ( $m/z$ ) se k určení analytu využívá relativní zastoupení isotopologů, které pomáhá určit, jaké prvky se podílejí na dané struktuře. Při některých experimentech se také využívá fragmentace molekul, která poskytuje další strukturní informace.<sup>39</sup>

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Zkoumané analyty jsou nejprve přivedeny do iontového zdroje, kde jsou ionizovány a získají kladný nebo záporný náboj. Ionty poté putují iontovou optikou do

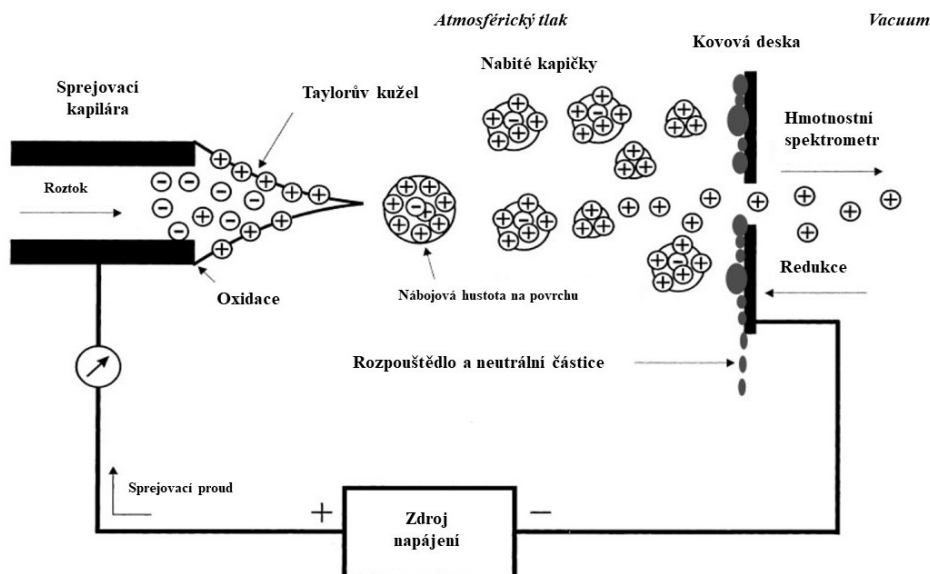
hmotnostního analyzátoru, kde se dělí podle  $m/z$ . Následně jsou ionty detegovány a je zaznamenána intenzita jejich signálů. Výsledkem je hmotnostní spektrum, které zobrazuje intenzitu signálu v závislosti na  $m/z$ .<sup>40</sup>

Experimenty v této diplomové práci byly prováděny na přístroji Orbitrap Fusion Lumos Tribrid od společnosti ThermoFischer Scientific, jako ionizační technika byla použita ionizace elektrosprejem.

### 2.2.1 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI, Electrospray ionisation) je známa přes 50 let, poprvé byla popsána v roce 1968.<sup>41</sup> Od té doby je elektrosprej předmětem řady studií a v současné době je velmi využívanou ionizační technikou s širokým spektrem aplikací od analýzy malých molekul až po velké proteiny a polymery. Jedná se o měkkou ionizační techniku vhodnou především pro středně až vysoce polární analyty. ESI využívá elektrického pole k ionizaci iontů v roztoku a jejich převedení do plynné fáze za atmosférického tlaku, poskytuje jednou nebo vícenásobně nabitě ionty, které jen velmi málo fragmentují přímo ve zdroji. Velké molekuly obsahující více polarizovatelných skupin tvoří častěji vícenásobně nabitě ionty, díky čemuž mohou být analyzovány i v hmotnostních analyzátoch s omezeným hmotnostním rozsahem.<sup>42,43</sup> Stabilita elektrospreje závisí na vhodně zvolené průtokové rychlosti a sprejovacím napětí. V klasickém uspořádání operuje elektrosprej při průtocích 1–1000  $\mu\text{l}/\text{min}$  a podle analytu se volí pozitivní nebo negativní mód.<sup>44</sup>

Jak je znázorněno na Obr. 4, roztok se vzorkem je přiváděn sprejovací kapilárou, na kterou je vkládáno vysoké napětí. Intenzivní elektrické pole tvoří konický meniskus, tzv. Taylorův kužel, ze kterého se uvolňuje aerosol, proud nabitých kapiček, které mají souhlasný náboj, a proto se vzájemně odpuzují.



Obr. 4: Proces tvorby iontů při ionizaci elektrospřejem, převzato z<sup>45</sup> a upraveno.

Následným odpařením rozpouštědla vznikají ionty, které jsou usměřovány pomocí iontové optiky, na kterou je také vkládáno napětí, a jsou dále unášeny k hmotnostnímu analyzátoru. Neutrální molekuly nebo opačně nabitě ionty, jsou zachyceny na kovové destičce před vstupem do analyzátoru.

Při vypařování rozpouštědla dochází ke zmenšování nabitých kapiček, což vede k rostoucí nábojové hustotě na povrchu kapek. Rostoucí odpudivé síly mezi souhlasně nabitými ionty, nazývané také coulombické síly, přesáhnou povrchové napětí, což způsobí desorpci iontů do plynné fáze. Tento jev je nazýván jako model vypařování iontů (IEM, ion evaporation model) a je pozorován především u ionizace menších molekul.<sup>46,47</sup> U velkých molekul se uplatňuje model zbytkového náboje (CRM, charged residue model), kdy dochází k postupnému odpařování rozpouštědla doprovázeném rozpadem kapek (tzv. coulombická exploze). Výsledkem procesu jsou jednotlivé vícenásobně nabitě ionty.

Účinnost přenosu iontů mezi iontovým zdrojem a hmotnostním analyzátozem zásadním způsobem ovlivňuje citlivost a dynamický rozsah spektrometru.<sup>41,44</sup>

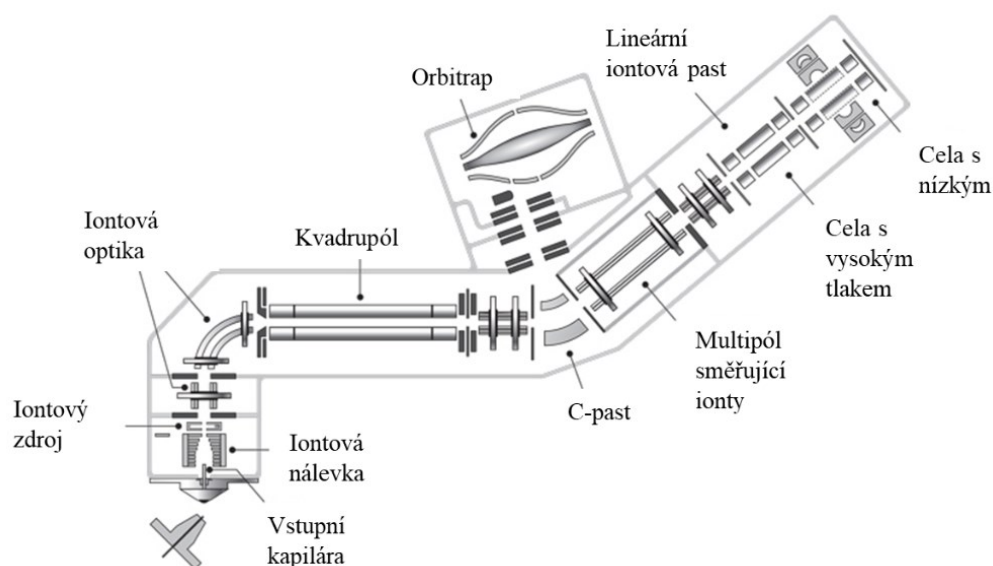
Pro studium komplexnějších vzorků se často využívá spojení HPLC-ESI-MS. Látky separované na HPLC koloně jsou přiváděny do zdroje, kde jsou ionizovány a

transportovány do analyzátoru. Pro snížení nároků na množství analytu a vyšší účinnost se využívá nanoHPLC ve spojení s nanoESI-MS s průtoky v rozmezí 25-500 nl/min. Díky menším kapkám, které se tvoří na sprejovací kapiláře, dochází k rychlejšímu odpařování rozpouštědla. Sprejer je umístěn blíže ke vstupní čočce, čímž se minimalizují ztráty vzorku. Výhodou oproti klasickému elektrospreji je tolerance k solím a menší potlačení signálu nečistotami. Nevýhodou je experimentální náročnost a větší náchylnost k mechanickému poškození.

### 2.2.2 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid

Orbitrap Fusion Lumos Tribrid od společnosti ThermoFischer Scientific je hybridní vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr využíváný pro celou řadu analýz, zejména pro proteomickou analýzu. Jak je vidět na Obr. 5, kombinuje tři analyzátory – kvadrupól, lineární iontovou past a Orbitrap.

Ionty ze zdroje vstupují do analyzátoru pomocí vstupní kapiláry, která odděluje oblasti s různým tlakem. Dále jsou ionty transportovány pomocí iontové nálevky a iontovou optikou jsou dále unášeny a usměrňovány do kvadrupólu a k analyzátoru podle nastavení analýzy. Analyzátozem může být Orbitrap i lineární iontová past. Zároveň lze měřit spektra vyšších řádů, kdy je využívána fragmentace v kolizních celách.



Obr. 5: Schematické znázornění hybridního přístroje Orbitrap Fusion Lumos Tribrid, převzato z <sup>48</sup> a upraveno

### 2.2.2.1 Kvadrupól

Kvadrupól je jednoduchý skenující hmotnostní analyzátor, skládá se ze čtyř paralelních tyčí kruhového průřezu, na které je vkládáno vysokofrekvenční střídavé napětí ( $V$ ). Na dvě protilehlé tyče je vkládáno kladné stejnosměrné napětí ( $U$ ), na druhou dvojici tyčí je vkládáno záporné stejnosměrné napětí. Při určitém poměru stejnosměrného a střídavého napětí ( $U/V$ ) může projít pouze ion o určité  $m/z$ , ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích. Hmotnostní spektrum je poté získáno pomocí zvyšování stejnosměrného a střídavého napětí (při konstantním poměru  $U/V$ ), kdy k detektoru postupně doputují všechny ionty.<sup>39</sup> U hybridních přístrojů jako je Lumos je kvadrupól využíván k přenosu iontů. Na tyče je vkládáno pouze střídavé napětí, tudíž dále projdou všechny ionty, které dále směřují do C-pasti a poté buď do Orbitrapu, nebo lineární iontové pasti.

Při měření spekter vyšších řádů (zejména  $MS^2$ ) slouží kvadrupól k výběru prekurzorů pro fragmentaci. Prekurzorové ionty jsou transportovány do kolizní cely nebo lineární iontové pasti, kde jsou fragmentovány.

### 2.2.2.2 Lineární iontová past

Lineární iontová past je zařízení, které využívá stabilitu iontových drah pro jejich dělení podle  $m/z$ . Uspořádáním je lineární iontová past velmi podobná kvadrupólu. Skládá se ze čtyř hyperbolických nebo kruhových tyčí, které jsou symetricky uspořádané. Ionty jsou zachyceny pomocí dvoudimenzionálního radiofrekvenčního pole. Na přední i zadní straně jsou umístěny elektrody, na které je vloženo stejnosměrné napětí, které zadržuje ionty uvnitř pasti. Díky vzniklému poli uvnitř multipólu lze selektivně vypuzovat ionty. V dnešní době se iontové pasti využívají jako samostatné analyzátoři nebo v tandemovém spojení s dalšími analyzátoři.<sup>49,50</sup>

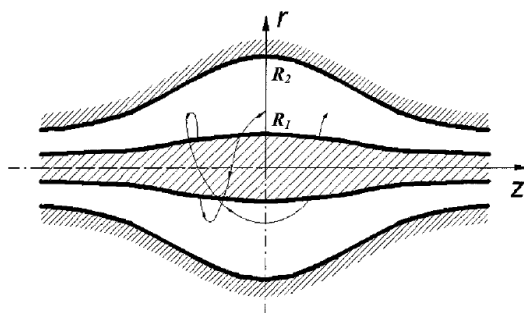
Lineární iontové pasti mají v hybridních instrumentech několik funkcí. V nejjednodušším uspořádání jimi ionty prolétávají. Dále mohou sloužit k zachycení a izolaci prekurzorových iontů, toho se využívá zejména při měření  $MS^n$  spekter. Další důležitou funkcí je fragmentace pro měření spekter vyšších řádů.

### 2.2.2.3 Orbitrap

Hlavní součástí hybridního přístroje Orbitrap Fusion Lumos Tribrid je Orbitrap. První návrh konceptu elektrostatického zachycení iontů publikoval již ve dvacátých

letech 20. století Kingdon.<sup>51</sup> V 80. letech Kingdonovu past upravil a vylepšil zachycení iontů Knight.<sup>52</sup> Ani jedno uspořádání ovšem nevedlo ke generování hmotnostních spekter. Až na konci 20. století přišel Makarov s funkčním analyzátozem.<sup>53</sup> Tento objev vedl k dalšímu technickému vývoji a prvním komerčním přístrojům o pár let později.<sup>54,55</sup>

Orbitrap je hmotnostním analyzátozem s vysokým rozlišením, jedná se o elektrostatickou iontovou past skládající se ze soudkové vnější elektrody a vřetenovité středové elektrody (Obr. 6). Elektrické pole mezi vnitřní a vnější elektrodou vytváří kvadru-logaritmické elektrické pole. Elektrické pole přitahuje ionty ke středové elektrodě, zároveň však působí odstředivá síla. Ionty v Orbitrapu tak rotují kolem středové osy a zároveň se podél ní pohybují tam a zpět. Frekvence pohybu podél elektrody je nepřímo úměrná  $\sqrt{m/z}$ . Pro detekci je měřen indukovaný proud na vnějších elektrodách v čase. Následně jsou pomocí Fourierovy transformace z komplexního signálu izolovány jednotlivé frekvence, které jsou poté převedeny na  $m/z$ . Rozlišovací schopnost je nepřímo úměrná  $\sqrt{m/z}$  a přímo úměrná době měření. Orbitrap je hmotnostním analyzátozem a detektorem zároveň.



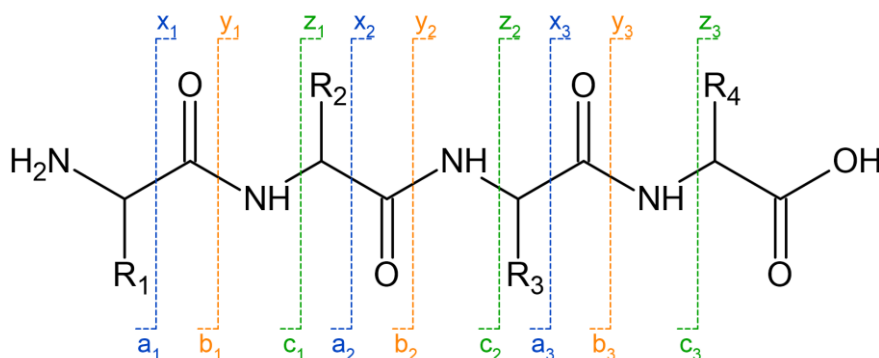
Obr. 6: Schématické znázornění Orbitrapu, převzato z<sup>53</sup> a upraveno

Ionty v Orbitrapu oscilují kolem osy  $z$ . Uvnitř Orbitrapu není kolizní chlazení iontů a je tam vysoké vakuum. Detekce probíhá měřením proudu, který indukují ionty axiálním pohybem kolem středové elektrody. Orbitrap vyžaduje externí akumulaci, chlazení a případnou fragmentaci iontů. K akumulaci a chlazení balíčku iontů slouží C-past, která je přímo napojená na Orbitrap a ze které jsou ionty naráz vpuštěny do Orbitrapu se stejnou počáteční rychlostí.

### 2.2.3 Fragmentace

Podrobnější informace o složení vzorku lze získat tandemovou MS prekurzorového iontu, kdy je vyvolána fragmentace. Fragmentační ionty peptidů závisí na sekvenci aminokyselin.<sup>56</sup> V 80. letech byla navržena nomenklatura fragmentů peptidového řetězce.<sup>57,58</sup> Schéma označování fragmentů je znázorněno na Obr. 7. Důležitější je však rozdíl hodnot  $m/z$  píků ve spektrech, který může být přiřazen zbytkům konkrétních aminokyselin, z čehož lze odečíst sekvenci peptidového řetězce.

Obecně jsou využívány dva typy tandemové hmotnostní spektrometrie – tandem v čase a tandem v místě.<sup>59</sup> Při tandemové analýze v místě je daný prekurzor izolován v prvním analyzátoru a následně je přesunut do kolizní cely, kde je fragmentován. Fragmenty putují do druhého analyzátoru, kde jsou analyzovány. Tandemová analýza v čase probíhá od izolace prekurzorů, přes fragmentaci až po analýzu fragmentů v jednom analyzátoru pouze v různých časových úsecích.<sup>59</sup>



Obr. 7: Schéma nejčastěji používané nomenklatury pro peptidové fragmentace navržené podle<sup>57,58</sup>.

Fragmenty nesoucí alespoň jeden náboj jsou při měření detekovány. Pokud je náboj držen na N-terminálním konci fragmentu, hovoříme o *a*-, *b*- nebo *c*-iontech. V případě, že náboj nese C-konec fragmentu, označujeme fragmenty jako *x*, *y* a *z*.<sup>57,58</sup>

Mezi nejčastěji používané techniky pro fragmentaci peptidů patří kolizně indukovaná disociace, disociace přenosem elektronu nebo disociace pomocí ultrafialového záření.

### 2.2.3.1 Kolizně indukovaná disociace

Kolizně indukovaná disociace (CID, Collision induced dissociation) je nejčastěji využívaným a univerzálním typem fragmentace pro tandemové MS analýzy. Při CID fragmentaci je paprsek vybraných iontů veden přes kolizní celu, kde se nachází kolizní plyn (nejčastěji He, N<sub>2</sub>, Ar) pod relativně vysokým tlakem vzhledem k okolnímu vakuu.<sup>60</sup> Během kolize je část kinetické energie převedena na vnitřní energii, která způsobuje štěpení vazeb a rozpad molekulárních iontů na menší fragmenty. Tyto fragmenty jsou následně analyzovány v hmotnostním analyzátoru.<sup>60,61</sup> CID fragmentace se hojně využívá pro analýzu malých molekul. Lze ji využít i pro analýzu větších molekul, například kratších, méně nabitých peptidů.

Při CID fragmentaci peptidů dochází k jedné nebo více kolizním interakcím molekuly s molekulami neutrálního plynu, což zvyšuje vibrační energii. Vyšší vibrační energie může způsobit disociaci amidové vazby na peptidovém řetězci za vzniku *b* a *y* fragmentačních iontů, dále může dojít ke ztrátám malých neutrálních molekul jako je voda nebo amoniak. Také mohou vznikat fragmenty odvozené od postranních řetězců aminokyselin.<sup>62</sup> CID nelze pro analýzu málo stabilních post-translačních modifikací.

Alternativním typem CID je kolizní disociace při vyšší energii (HCD, higher-energy collision dissociation). V porovnání s klasickou CID, operuje HCD za vyšší aktivační energie a s kratší aktivační dobou. HCD stejně jako CID vede ke vzniku především *b*- a *y*-iontů, nicméně díky větší energii mohou vznikat také *a*-ionty.<sup>62</sup>

### 2.2.3.2 Disociace záchytem elektronu

Disociace přenosem elektronu (ETD, electron transfer dissociation) je využívána zejména pro fragmentaci intaktních proteinů při top-down analýzách, nebo pro fragmentaci peptidů obsahující málo stabilní post-translační modifikace. Jednonásobně nabitý přenašečový anion (např. antracen, fluoranthen) předává elektron vícenásobně protonovanému peptidu. Přenesený elektron způsobí fragmentaci peptidového řetězce na *c* a *z*-ionty s neporušenými modifikacemi na postranních řetězcích.<sup>63</sup>

Při ETD experimentech jsou vícenásobně protonované peptidy zadrženy v přední části LIT cely, doprostřed cely jsou následně přivedeny anionty reagentu. Zapnutím sekundárního napětí dojde k promíchání a reakcím mezi pozitivně a negativně nabitými



ionty. Reakční doba je ukončena axiálním vypuzením aniontů reagentu. Následně je pomocí hmotově selektivního radiálního vypuzení zaznamenáno MS/MS spektrum.<sup>39,63</sup>

Kombinací ETD a HCD vznikla hybridní disociační metoda označovaná jako EThcD.<sup>64</sup> Iontům vznikajícím při ETD je dodávána dodatečná energie a jsou generována více obsáhlá spektra obsahující *b*-, *c*-, *y* a *z* fragmenty.<sup>65,66</sup>

## 2.3 Vyhodnocení hydrofobicity aminokyselin

Jednou z obecných vlastností proteinů je jejich rozpustnost ve vodě. V živých organismech je tento vztah k vodě podstatný z pohledu umístění proteinů v buňce a tím i lokalizaci proteinové funkce. O tom, zda je protein hydrofobní nebo hydrofilní rozhoduje složení a pořadí aminokyselin a sekundární, případně terciární uspořádání polypeptidového řetězce. Hydrofobicitu je možné teoreticky předpovídat. U globulárních proteinů lze výpočtem hydrofobního indexu ze sekvence určit, zda bude daná oblast polypeptidového řetězce zanořena uvnitř proteinu, nebo se bude vyskytovat na povrchu. U transmembránových proteinů slouží výpočet hydrofobicity k určení oblastí, které budou přispívat k tvorbě  $\alpha$ -helixů prostupující lipidovou dvojvrstvou. Dále se dá podle hydrofobních vlastností aminokyselin predikovat chování peptidů na různých separačních systémech.<sup>67</sup>

Byla navržena řada stupnic, podle kterých lze hodnotit hydrofobní vlastnosti aminokyselin. Jednotlivé stupnice se od sebe liší způsobem výpočtu hydrofobního indexu pro jednotlivé aminokyseliny a tím pádem i pořadím aminokyselin seřazených podle daných indexů. Jedním z prvních přístupů k výpočtu hydrofobního indexu je na základě rozdělovacího koeficientu mezi dvěma nemísitelnými kapalinami.<sup>67-69</sup> Dalším způsobem výpočtu hydrofobicity aminokyselin je vyhodnocení přístupné plochy. Tyto metody určují hydrofobní efekt na základě toho, jak je daná aminokyselina v rámci složeného proteinu vystavena solventu.<sup>67,70,71</sup> K výpočtu hydrofobicity se též využívá měření různých fyzikálních vlastností zahrnující mimo jiné povrchové napětí, solvatační energii či molární tepelnou kapacitu.<sup>67,72,73</sup>

V 80. letech minulého století přišli Kyte a Doolittle se stupnicí hydrofobicity, která kombinuje rozdělovací koeficient a vyhodnocení přístupné plochy. Tato stupnice se označuje jako Gravy index. Hodnoty Gravy indexu pro jednotlivé aminokyseliny byly

vypočítány na základě přenosu volné energie (voda – pára) a přístupnosti jednotlivých postranních řetězců, které v roce 1976 publikoval Chothia.<sup>71</sup> Podle jimi navržené stupnice jsou nejvíce hydrofobní aminokyseliny leucin a isoleucin, na opačné straně škály je arginin Tabulka 1.<sup>74</sup>

*Tabulka 1: Hodnoty indexu hydrofobicity (Gravy index) podle Kyte a Doolittle<sup>74</sup>*

<b>Aminokyselina</b>	<b>Gravy index</b>	<b>Aminokyselina</b>	<b>Gravy index</b>
Isoleucin	4,5	Serin	-0,8
Valine	4,2	Tyrosin	-1,3
Leucin	3,8	Prolin	-1,6
Fenylalanin	2,8	Histidin	-3,2
Cystein	2,5	Glutamát	-3,5
Methionin	1,9	Glutamin	-3,5
Alanin	1,8	Aspartát	-3,5
Glycin	-0,4	Asparagin	-3,5
Threonin	-0,7	Lysin	-3,9
Tryptofan	-0,9	Arginin	-4,5

*Vysoká hodnota Gravy indexu značí hydrofobní aminokyselinu*

## 2.4 Vyhodnocování spekter

K automatické interpretaci obsáhlých MS/MS spekter slouží vyhodnocovací programy. Existuje hned několik takových programů, nicméně všechny hledají shodu mezi experimentálním a teoretickým spektrem na základě uživatelem nastavených podmínek. Do parametrů prohledávání se zadává databáze obsahující teoretické sekvence očekávaných proteinů, variabilní a fixní modifikace, enzym štěpení, a další. Čím se však programy liší, jsou algoritmy prohledávání.

Jedním z nejvyužívanějších algoritmů je SEQUEST, který na základě zadané databáze a parametrů štěpení (enzym, maximální počet vynechaných štěpných míst, délka peptidů) vytvoří seznam všech teoreticky přítomných peptidů. Následně provede porovnání hodnot  $m/z$  teoretických peptidů s  $m/z$  identifikovanými v MS spektru. Tímto porovnáním je zúžen seznam kandidátních peptidů. Pro tyto kandidátní peptidy je vygenerováno teoretické fragmentační spektrum, které je poté srovnáno s experimentálně naměřenými MS/MS spektry. Pokud je nalezena shoda mezi teoretickým a experimentálním spektrem, sekvence příslušného peptidu je označena jako identifikovaná.<sup>75</sup> Prohledávací algoritmus SEQUEST podporuje například komerčně dostupný software Proteome Discoverer<sup>TM</sup> od společnosti ThermoFischer Scientific. Tento program je určen pro širokou škálu proteomických analýz od identifikace peptidů a proteinů, přes identifikaci posttranslačních modifikací, až po kvantifikace. Kromě zmíněného SEQUESTu podporuje algoritmy Amanda či Mascot.<sup>76</sup>

Odlišný přístup k prohledávání využívá Paragon<sup>TM</sup> Algorithm.<sup>77</sup> Pro dané MS/MS spektrum je určeno několik sekvenčních značek o dvou až třech aminokyselinách. Každá značka je hodnocena podle pravděpodobnosti, že je určena správně. Značky jsou následně porovnány s databází, čímž jsou nalezeny všechny možné pozice, kde se může značka vyskytovat. Míra, jak moc značka zapadá do segmentu databáze, je označována jako hodnota sekvenčních teplot (STV). Výpočet této hodnoty pro všechny segmenty sekvence v databázi umožňuje jejich seřazení. Segmenty, které s vyšší pravděpodobností odpovídají skutečné sekvenci peptidu pro dané spektrum, jsou zařazeny nahoře. Naopak segmenty, u kterých je nepravděpodobné, že korespondují s daným peptidem, jsou zařazeny níž. Na základě pravděpodobnostních výpočtů pro jednotlivé segmenty a jim přiřazené peptidy, je vyhodnoceno skóre peptidu. Podle skóre je následně určeno, zda byl

peptid identifikován.<sup>77</sup> Výhodou algoritmu je, že přiřazování není závislé na intenzitě a je schopné přiřadit i fragmenty o nízké intenzitě. Paragon algoritmus je podporován softwarem ProteinPilot™ od společnosti Sciex.<sup>77</sup>

V rámci této diplomové práce byla zahájena spolupráce s Ing. Kamilou Clarovou (Ph.D. studentka, VŠCHT Praha), která na základě zadaných požadavků vytvořila skript v programovém jazyce Python pro hledání indikačních fragmentů. Algoritmus prohledává zadaný soubor fragmentačních spekter proti zadaným hodnotám indikačních iontů. Pokud je fragment v MS/MS spektru nalezen, je dané spektrum následně vyhodnoceno a je určena sekvence peptidu. Tento algoritmus byl vytvořen za účelem detekce N-terminální modifikace, která kvůli nízké intenzitě nemusí být detekována v jiných softwarech při prohledávání.

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie a vybavení

Pro experimenty byly použity syntetizované peptidy modifikované mastnými kyselinami. Souhrn použitých lipopeptidů je sepsán v Tabulce 2.

Tabulka č. 2: Souhrn standardů lipopeptidů

Sekvence	Modifikace	Původ
GVSGSK	Myristoyl (N-konec)	ÚOCHB AV ČR, Česká republika
GVSGSK	Palmitoyl (N-konec)	ÚOCHB AV ČR, Česká republika

Dále byly použity proteiny obsahující lipomodifikaci - adenylát-cyklázový toxin (Cya A) izolovaný z *Bordetella pertussis* (poskytnut Mgr. Davidem Jurnečkou, MBÚ AV ČR, Česká republika), matrixový protein myšního tumoru prsní žlázy (MMTV) modifikovaný kyselinou myristovou na N-konci (poskytnut Ing. Michalem Doležalem, Ph.D., ÚOCHB AV ČR, Česká republika) a matrixový protein Mason-Pfizer opičieho viru s histidinovou kotvou (MAPPhis) modifikovaný kyselinou myristovou (poskytnut Ing. Jakubem Sýsem, VŠCHT Praha).

Od firmy Fisher Scientific, USA byla zakoupena voda Optima LC/MS, kyselina mravenčí (FA), kyselina trifluoroctová (TFA). Methanol LiChrosolv, Ethylacetát Chromasolv, Iodoacetamid BioUltra (IAA), 2,2,2-trifluorethanol Bio Ultra (TFE) a dithiothreitol (DTT) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, USA. Od společnosti VWR Chemicals, USA byl pořízen Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM (ACN). 2-propanol LC-MS byl zakoupen od firmy Biosolve, Francie. Proteolytický enzym Trypsin recombinant byl pořízen od společnosti Roche CustomBiotech, Německo. Od firmy Penta, ČR byl zakoupen chloroform stabilizovaný 1 % ethanolu, predestilovaný.

Od firmy Agilent Technologies, USA byly pořízeny stacionární fáze C-18, 40 microM, 10 GM. Od společnosti ThermoFischer Scientific, USA byly zakoupeny C-18 spin kolony.

### 3.2 Instrumentace

Analýzy vzorků obsahující štěpené proteiny byly prováděny na přístroji Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer s UltiMate 3000 RSLCnano systémem od společnosti ThermoFisher Scientific. Byla použita kolona EASY-Spray PepMap RSLC C18 (2 $\mu$ m, 100Å, 50 $\mu$ m x 15 cm) od společnosti ThermoFisher Scientific. Experimentální podmínky měření jsou shrnuty v Tabulce 3. Po každém měření byl systém promyt elučním gradientem s nástřikem 33% roztoku trifluorethanolu (TFE).

Tabulka 3: Experimentální podmínky měření

Teplota kolony	35 °C
Mobilní fáze A	0,1% FA ve vodě
Mobilní fáze B	0,1% FA v acetonitrilu
Průtok mobilní fáze	300 nl·min <sup>-1</sup>
Dávkovaný objem vzorku	1–6 $\mu$ l
Teplota na sprejovací kapiláře	40 °C
Napětí na sprejovací kapiláře	1600 V

Pro měření MS/MS spekter standardních roztoků lipopeptidů s přímým nástřikem byl použit TriVersa NanoMate s nanoESI od společnosti Advion.

### 3.3 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok peptidu GVSGSK s N-terminální myristoylací o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup> byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství látky ve vodném roztoku obsahujícím 20 % methanolu a 0,1 % kyseliny mravenčí. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku vodným roztokem obsahujícím 20 % methanolu a 0,1 % kyseliny mravenčí. Všechny roztoky byly uchovávány ve skle při teplotě -20 °C.

Zásobní roztok peptidu GVSGSK s N-terminální palmitoylací o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup> byl připraven rozpuštěním přesně naváženého množství látky ve vodném

roztoku obsahujícím 20 % methanolu a 0,1 % kyseliny mravenčí. Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku vodným roztokem obsahujícím 20 % methanolu a 0,1 % kyseliny mravenčí. Všechny roztoky byly uchovávány ve skle při teplotě -20 °C.

### **3.4 Enzymatické štěpení lipoproteinu v roztoku pomocí trypsinu**

Bylo odebráno 20 µg proteinu a naředěno do 100 µl 50mM ABC pufru. K roztoku bylo přidáno 5 µl 100mM roztoku redukčního činidla dithiotreitol (DTT). Směs byla 30°min inkubována při 65 °C v třepačce. Následně byl vzorek alkylován přidáním 15 µl 100mM roztoku iodoacetamidu (IAA) a inkubováním ve tmě za laboratorní teploty po dobu 30 min. Po inkubaci byla alkylace zastavena přidáním 10 µl DTT. Poté byl do roztoku přidán trypsin v takovém množství, aby výsledný poměr trypsin:protein byl 1:100. Vzorek byl štěpen po dobu 16 hod při teplotě 37 °C v třepačce. Následně byla reakce zastavena přidáním 2 µl 5% kyseliny octové. Vzorek byl poté odpařen do sucha a rozpuštěn ve 20 µl 20% MeOH s 0,1% TFA pro analýzu.

### **3.5 Enzymatické štěpení lipoproteinu pomocí trypsinu na filtru (eFASP)**

Ke 40 µg proteinu bylo přidáno 5 µl 100mM DTT. Vzorek byl inkubován 30 min při 37 °C v třepačce. Po redukci byl vzorek přenesen na filtr Microcon 10 (Merck KGaA, Německo) a následně centrifugován na 14000 g po dobu 30 min při 18 °C. Poté bylo přidáno 200 µl promývacího pufru A (pA: 8M urea, 5mM DCA, 100mM ABC, H<sub>2</sub>O), vzorek byl centrifugován na 14000 g po dobu 15 min při 18°C. Pro alkykaci bylo do vzorku přidáno 15 µl 100mM IAA a vzorek byl inkubován ve tmě za laboratorní teploty po dobu 30 min. Následně byl vzorek centrifugován na 14000 g při teplotě 18 °C po dobu 15 min. Poté byl vzorek promyt 100 µl pA a centrifugován na 14000 g při teplotě 18 °C po dobu 20 minut. Tento krok byl opakován třikrát. Následovalo promytí 100 µl promývacího pufru B (pB; 5mM DCA, 100 mM ABC, H<sub>2</sub>O) a centrifugování na 14000

g při teplotě 18 °C po dobu 20 minut. Tento krok byl taktéž třikrát opakován. Po promytí byl filtr se vzorkem přenesen do čisté mikrozkušavky. Ke vzorku byl přidán trypsin v takovém množství, aby poměr trypsin:protein byl 1:100. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 16 hodin v třepačce. Po štěpení byl vzorek centrifugován 15 min na 14000 g při 18 °C.

Poté byly naštěpené proteiny eluovány z filtru přidáním 50 µl 50mM pufru ABC a centrifugován na 14000 g po dobu 15 min při 18 °C. Promytí bylo dvakrát opakováno. K eluátu bylo přidáno 200 µl ethylacetátu a 2,5 µl TFA. Vzorek byl důkladně promíchán, doplněn ethylacetátem na objem 1 ml a sonikován 2 minuty ve vodní lázni. Následně byl vzorek 15 minut centrifugován na 14000 g při 18°C. Po centrifugaci byla pomocí injekční stříkačky odebrána horní organická vrstva. Ke zbylému vzorku byl přidán 1 ml ethylacetátu, vzorek byl promíchán a 15 min centrifugován na 14000 g při 18 °C. Poté byla opět odebrána horní organická vrstva. Celá extrakce byla opakována celkem třikrát. Vzorek byl po extrakci odpařen do sucha a rozpuštěn ve 20% MeOH s 0,1% TFA pro analýzu na Lumosu.

### **3.6 Extrakce kapalina – kapalina**

Do skleněné vialky bylo napipetováno 500 µl vody a 500 µl chloroformu. Následně byl do směsi pipetován naštěpený lipoprotein nebo lipopeptidy ze zásobních roztoků. Vialka se směsí byla 2 minuty promíchávána a následně stočena na centrifuze pro oddělení fází. Nejprve byla pomocí injekční stříkačky odebrána do čisté mikrozkušavky vodná fáze, poté do druhé čisté mikrozkušavky byla odebrána organická fáze. Po odebrání obou fází zbyla ve skleněné vialce kapalina označená jako mezifáze. Všechny tři frakce byly odpařeny a poté rozpuštěny ve 20% MeOH s 0,1% TFA pro analýzu na Lumosu.



### 3.7 Extrakce na pevné fázi

Nejprve byla SPE kolona navlhčena 200  $\mu$ l ACN, poté byla ekvilibrována dvojitým promytím 200  $\mu$ l 5% ACN s 0,1% TFA. Mezi každým přidavkem roztoku byla kolona stočena na centrifuze a eluát byl odstraněn. Po ekvilibraci byl na kolonu napipetován roztok štěpeného lipopeptidu nebo lipoproteinu. Kolona byla stočena a eluát byl znovu nanesen na kolonu. Tento krok byl opakován dvakrát pro efektivnější zachycení analytu na sorbentu. Následně byla kolona dvakrát promyta 100  $\mu$ l 5% ACN s 0,1% TFA. Poté byl analyt eluován dvěma proplachy 25% ACN s 0,1% TFA a dvěma proplachy 100% ACN s 0,1% TFA. Po každém promytí byla kolona centrifugována a jednotlivé eluční frakce byly odebírány do čistých mikrozkušavek. Následně byly frakce odpařeny do sucha a rozpuštěny ve 20% MeOH s 0,1% TFA pro analýzu na Lumosu.

### 3.8 Odsolení na PepClean kolonkách

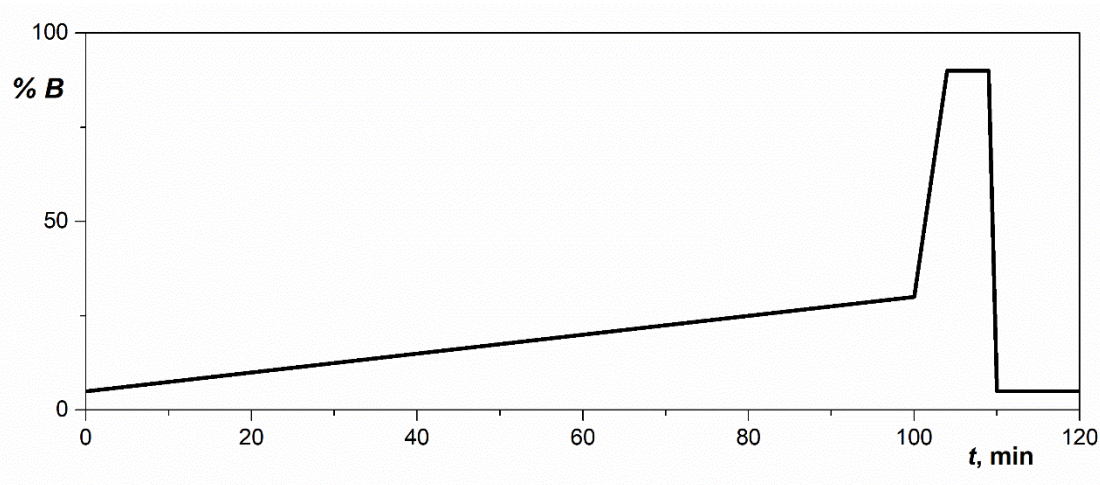
PepClean kolona byla navlhčena 200  $\mu$ l 100% ACN a stočena na centrifuze, eluát byl vylit. Následně byla kolonka ekvilibrována dvojitým promytím 200  $\mu$ l 5% ACN s 0,1% TFA a stočena na centrifuze, eluát byl odstraněn. Po ekvilibraci byl na kolonu napipetován roztok štěpeného proteinu. Kolona byla stočena a eluát byl znovu nanesen na kolonu. Po zachycení vzorku na pevné fázi byla kolona promyta 100  $\mu$ l 5% ACN s 0,1% TFA a stočena na centrifuze. Tento krok byl opakován a eluát byl odstraněn. Následně byla kolona umístěna do čisté mikrozkušavky a vzorek byl eluován promytím 20  $\mu$ l 100% ACN s 0,1% TFA. Tento krok byl opakován. Eluát byl odpařen do sucha a rozpuštěn ve 20% MeOH s 0,1% TFA pro analýzu na Lumosu.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Příprava vzorku

V roce 2019 optimalizovala Mgr. Adéla Pravdová ve své diplomové práci postup pro přípravu vzorků lipopeptidů. Navrhla postup, kdy po enzymatickém štěpení v roztoku následovala extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo extrakce na pevné fázi (SPE).<sup>78</sup> V rámci zmíněné diplomové práce byl postup aplikován na protein MMTV modifikovaný kyselinou myristovou na N-konci.<sup>78</sup>

Během prvních experimentů v předkládané diplomové práci byl tento postup testován na proteinu CyaA, který je modifikován kyselinou palmitovou na dvou lysinech uvnitř řetězce – K860 a K983. Po enzymatickém štěpení trypsinem v roztoku byla polovina vzorku odsolena, druhá polovina byla použita pro LLE a SPE. Všechny vzorky byly měřeny na Lumosu, byla použita gradientová eluce (Obr. 8). Spektra byla vyhodnocována pomocí softwaru Proteome Discoverer od společnosti ThermoFisher Scientific.



Obr. 8: Gradient mobilní fáze (80% acetonitril s 0,1% FA)

U 25 % vzorků (5 z 20) měřených po odsolení byla detekována modifikace kyselinou palmitoolejovou na K983. U extrakcí nebyla modifikace zachycena ani v jednom případě. Modifikace na pozici K860 nebyla detekována v žádném měření.

Za účelem zachycení signálu lipopeptidů byly jednotlivé kroky modifikovány. Nejprve byl testován postup, kdy v redukčním kroku byl místo DTT přidán tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) a směs byla 30 min inkubována při 35 °C. Po štěpení byla

část vzorku odsolena a část extrahována pomocí LLE. Použití jiného redukčního činidla nemělo na výsledek žádný vliv, lipopeptidy nebyly detekovány. Pro další testování byl používán DTT jako redukční činidlo.

Dále bylo testováno štěpení pomocí jiné proteázy. Běžně používaný trypsin štěpí za lysinem a argininem a vzhledem k pozici lipidace na proteinu CyaA bylo uvažováno, že může docházet k odštěpení modifikace trypsinem. Proto byly paralelně testovány dva enzymy – chymotrypsin a GluC. Po štěpení byly vzorky odsoleny a bez další úpravy měřeny. Při štěpení chymotrypsinem byla modifikace kyselinou palmitoolejovou na K983 detekována ve 30 % případů (3 z 9). Nicméně se zhoršilo pokrytí sekvence proteinu. V případě štěpení pomocí GluC nebyl detekován žádný lipopeptid a navíc došlo ke snížení pokrytí sekvence. I přes mírné zvýšení úspěšnosti zachycení lipopeptidu při štěpení chymotrypsinem byl pro další experimenty použit trypsin.

V dalším kroku bylo testováno enzymatické štěpení proteinu na filtru (eFASP). Tento postup má výhodu v tom, že dochází k odstranění solí, detergentů, nukleových kyselin a lipidů ze vzorku.<sup>79</sup> Přítomnost deoxycholové kyseliny v alkylačním a štěpícím pufru zvyšuje účinnost denaturace, rozpuštění a následně i tryptického štěpení.<sup>80</sup> Vzorek je poté bez další úpravy připravený k LC-MS/MS analýze.

Po eFASP se zvýšila úspěšnost detekce kyseliny palmitoolejové na K983 na 70 % (7 z 10), pokrytí sekvence bylo srovnatelné se štěpením v roztoku pomocí trypsinu. Také byla detekována palmitoylace na K860. Tento postup se jevil jako nejspolehlivější, a proto byl zvolen pro další experimenty.

## 4.2 Optimalizace gradientu

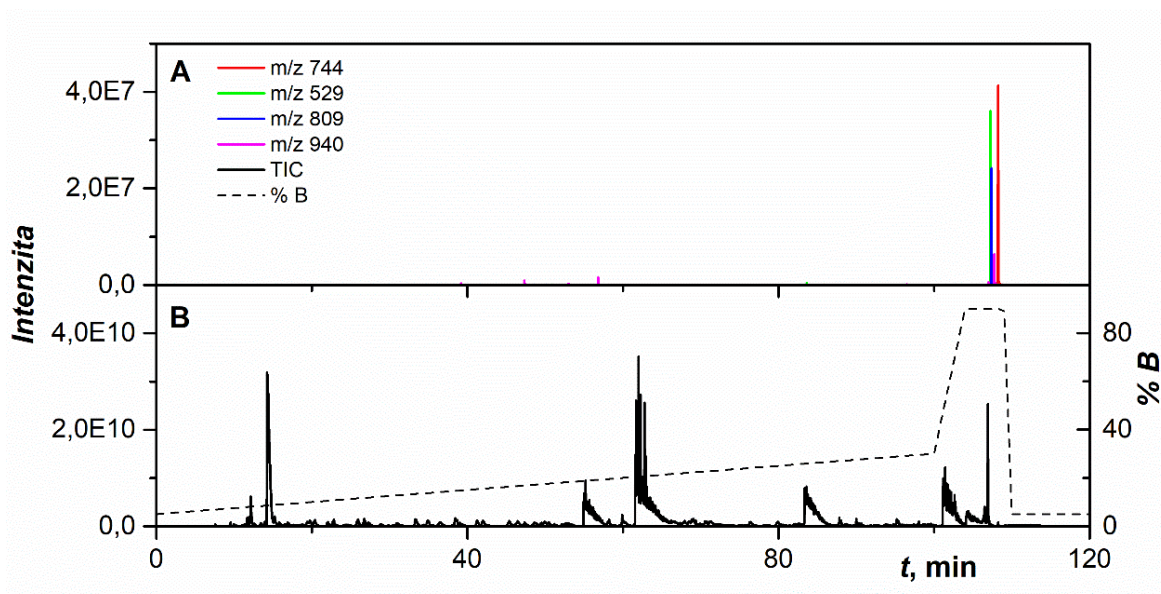
Při měření hydrolyzátu proteinu Cya A na LC-MS/MS systému bylo pozorováno, že lipopeptidy jsou na koloně silně zadržovány a jsou vyplavovány na konci analýzy. Z toho důvodu byly navrženy experimenty s použitím různých gradientů. Cílem bylo zajistit separaci a dřívější eluci lipopeptidů. Gradienty byly testovány na vzorcích obsahující trypsinem naštěpené proteiny CyaA a MMTV. V Tabulce 4 je přehled lipopeptidů přítomných ve vzorcích, které byly sledovány při analýzách.

Tabulka 4: Přehled sledovaných lipopeptidů

Protein	Sekvence	Modifikace	Pozice modifikace	m/z	z
MMTV	GVSGSK	C14	N-term	744,487	1
	GVSGSKQK	C14	N-term	529,334	2
Cya A	EGVATQTTAYGKR	C16:1	K983	809,465	2
	TG <b>K</b> SEFTTFVEIVGK	C16:1	K860	940,046	2

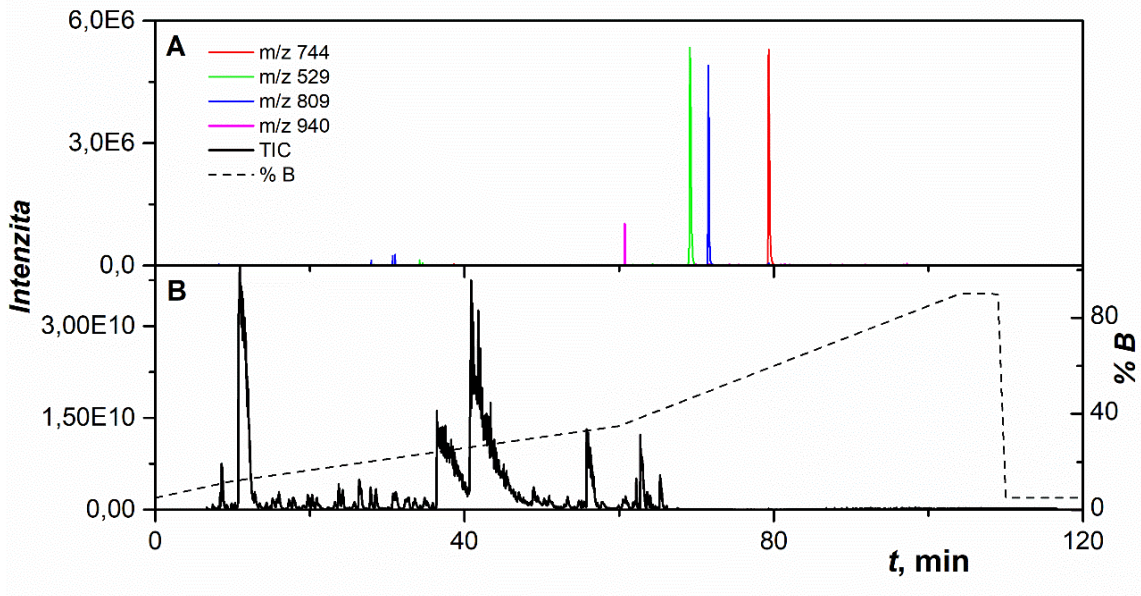
*C14 – kyselina myristová, C16:1 – kyselina palmitoolejová; tučné písmeno v sekvenci označuje modifikovanou aminokyselinu.*

Na Obr. 9 je zaznamenán průběh analýzy vzorku obsahujícího peptidy z proteinů Cya A a MMTV po eFASP s původním gradientem na 120 minut. Ve spodní části je zaznamenán TIC a křivka gradientu, kterou lze rozdělit na dvě části. V první části (0-100 min) se pozvolně zvyšuje obsah organické složky na 30 % mobilní fáze B (80% ACN + 0,1% FA) a elují zejména polární látky. Následně je během 4 minut zvýšen obsah organické složky v mobilní fázi B na 90 %. Vysoké procento organické složky způsobí eluci i velmi nepolárních analytů. Poté je podíl ACN snížen na 5 % a kolona je ekvilibrována. Jak je vidět na TIC záznamu analýzy, peptidy elují v průběhu celého gradientu. Silně hydrofobní lipopeptidy jsou eluovány na konci gradientu při 90 % mobilní fáze B. Všechny čtyři sledované lipopeptidy elují z kolony během jedné minuty, lipopeptidy o *m/z* 529 a 809 elují současně.



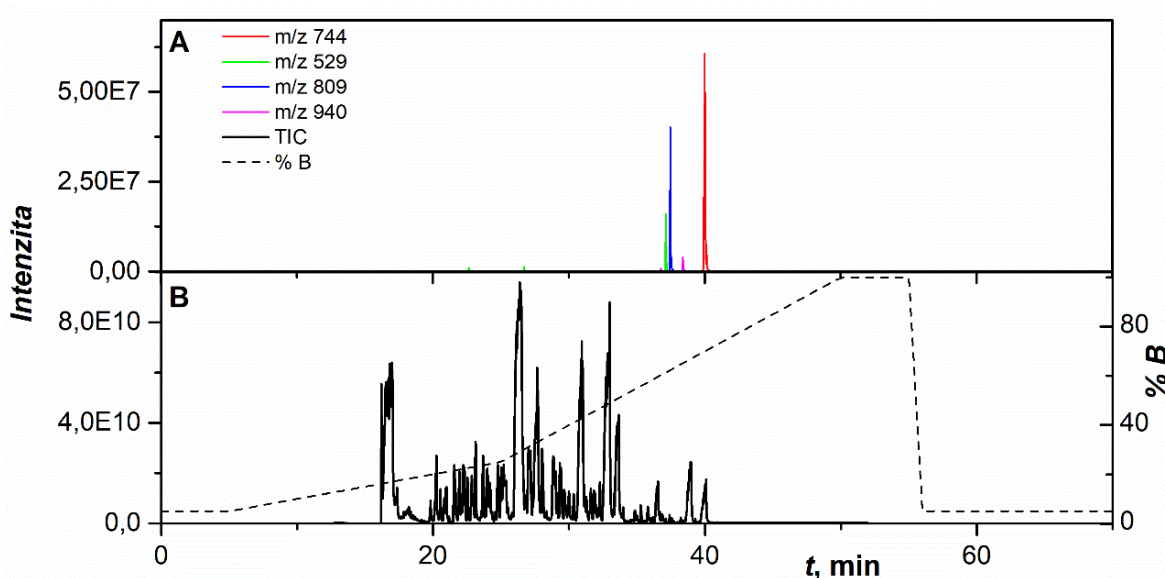
Obr. 9: Záznam LC-MS/MS analýzy hydrolyzátu Cya A a MMTV. A – XIC vybraných lipopeptidů, červenou křivkou je znázorněn peptid Myr-GVSGSK, zelenou křivkou je znázorněn lipopeptid Myr-GVSGSKQK, modrou křivkou je znázorněn peptid EGVATQTTAYGK(Pal)R, fialovou křivkou je znázorněn lipopeptid TGK(Pal)SEFTTFVEIVGK. B – TIC vzorku (černá křivka), černou přerušovanou křivkou je znázorněn gradient mobilní fáze B (80% ACN + 0,1% FA).

Pro lepší separaci lipopeptidů a jejich dřívější eluci byl gradient upraven. Záznam analýzy s použitím upraveného gradientu je znázorněn na Obr. 10. Nárůst podílu organické složky je strmější, během prvních 5 minut roste na 10 % a dále do 60. minuty na 35 %. Do 104. minuty stoupá podíl mobilní fáze B na 90 %. Ve 109. minutě je podíl organické složky opět snížen na 5 % pro ekvilibraci. Jak je patrné z TIC záznamu na Obr. 10, došlo k výraznému posunu retenčních časů peptidů. Většina peptidů eluovala do 70. minuty, eluce lipopeptidů se rovněž posunula, navíc jsou vzájemně dobře separované.



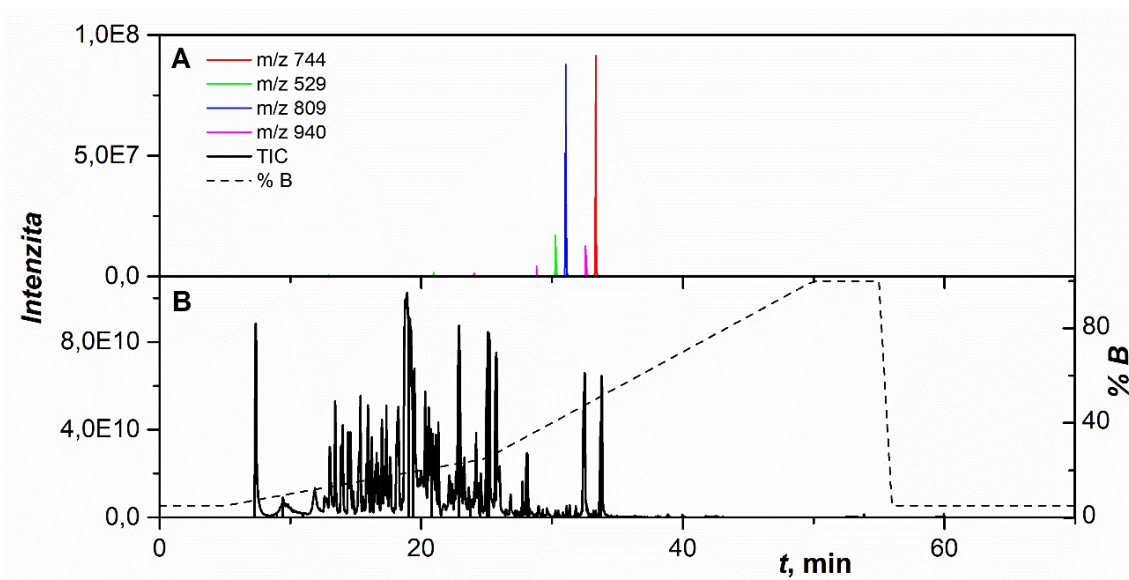
Obr. 10: Záznam LC-MS/MS analýzy hydrolyzátu Cya A a MMTV. A – XIC vybraných lipopeptidů, červenou křivkou je znázorněn peptid Myr-GVSGSK, zelenou křivkou je znázorněn lipopeptid Myr-GVSGSKQK, modrou křivkou je znázorněn peptid EGVATQTTAYGK(Pal)R, fialovou křivkou je znázorněn lipopeptid TGK(Pal)SEFTTFVEIVGK. B – TIC vzorku (černá křivka), černou přerušovanou křivkou je znázorněn gradient mobilní fáze B (80% ACN + 0,1% FA).

Následně byl gradient ještě upraven a zkrácen na 70 minut (Obr. 11). Aby nedocházelo k rychlé eluci polárních peptidů na začátku analýzy, byl na začátek analýzy přidán isokratický krok, kdy do 5. minuty zůstává obsah pufru B na 5 %. Do 25. minuty roste podíl organické složky na 25 %. Mezi 25. a 50. minutou roste obsah pufru B na 100 %. Vysoká hladina ACN je udržována 5 minut, poté je snížena na 5 %. Výsledek analýzy je zaznamenán na Obr. 11. Většina peptidů eluuje mezi 12. a 45. minutou. Lipopeptidy elují přibližně v rozmezí 5 minut, v porovnání s předchozím gradientem došlo ke zhoršení separace lipopeptidů.



Obr. 11: Záznam LC-MS/MS analýzy hydrolyzátu Cya A a MMTV. A – XIC vybraných lipopeptidů, červenou křivkou je znázorněn peptid Myr-GVSGSK, zelenou křivkou je znázorněn lipopeptid Myr-GVSGSKQK, modrou křivkou je znázorněn peptid EGVATQTTAYGK(Pal)R, fialovou křivkou je znázorněn lipopeptid TGK(Pal)SEFTTFVEIVGK. B – TIC vzorku (černá křivka), černou přerušovanou křivkou je znázorněn gradient mobilní fáze B (80% ACN + 0,1% FA).

Pro rychlejší eluci lipopeptidů a jejich separaci bylo upraveno složení mobilní fáze. Eluční síla složky B byla zvýšena tím, že se koncentrace acetonitrilu zvýšila z 80 na 100 %. Průběh analýzy je znázorněn na Obr. 12.



Obr. 12: Záznam LC-MS/MS analýzy hydrolyzátu Cya A a MMTV. A – XIC vybraných lipopeptidů, červenou křivkou je znázorněn peptid Myr-GVSGSK, zelenou křivkou je znázorněn lipopeptid Myr-GVSGSKQK, modrou křivkou je znázorněn peptid EGVATQTTAYGK(Pal)R, fialovou křivkou je znázorněn lipopeptid TGK(Pal)SEFTTFVEIVGK. B – TIC vzorku (černá křivka), černou přerušovanou křivkou je znázorněn gradient mobilní fáze B (100% ACN + 0,1% FA).

Změna složení mobilní fáze měla za následek snížení retenčního času všech přítomných peptidů do první poloviny analýzy. Lipopeptidy eluovaly v polovině gradientu a v porovnání s předchozím měřením došlo ke zlepšení separace lipidovaných peptidů. Tento gradient byl vybrán jako nejvhodnější pro další experimenty.



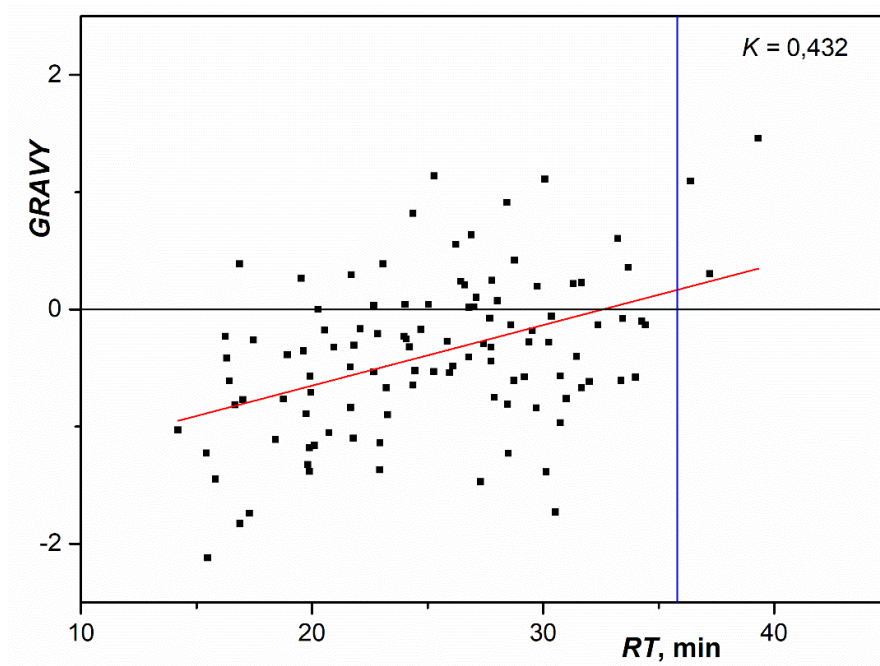
### 4.3 Chování peptidů na chromatografii a vztah ke Gravy indexu

Je obecně platné, že hydrofilní peptidy jsou při chromatografii na reverzních fázích vyplavovány dříve, zatímco více zadržované hydrofobní peptidy jsou vyplavovány později v průběhu analýzy. Lipopeptidy jsou v porovnání s nemodifikovanými peptidy hydrofobnější a retenční čas (RT) mají srovnatelný se silně hydrofobními nemodifikovanými peptidy. Je pro ně obtížné predikovat jejich RT. Pokud by existoval spolehlivý postup k predikci hydrofobicity peptidů korespondující s retenčním časem (RT) peptidů, dal by se experimentálně určit RT lipidovaného peptidu. V dosud publikované literatuře je uvedeno několik způsobů, jak lze určit hydrofobicitu peptidů a proteinů. Jedním z nich je výpočet Gravy indexu.<sup>74</sup>

V rámci této diplomové práce bylo zkoumáno, zda vypočítaná hodnota Gravy indexu koresponduje s RT peptidů, a zda je možné určit na základě RT hodnotu hydrofobního indexu pro modifikované peptidy. Závislost RT na Gravy indexu byla testována na lipoproteinu Cya A.

Bylo provedeno 6 měření tryptického hydrolyzátu proteinu Cya A s použitím optimalizovaného gradientu (Obr. 12). Během analýzy bylo identifikováno v průměru 109 peptidů. Pro všechny identifikované peptidy byl určen RT a byla vypočítána hodnota Gravy indexu (gravy-calculator.de, Stephan Fuchs, Německo). Následně byla vynesena závislost Gravy indexu peptidu na průměrném RT peptidu (Obr. 13).

Na Obr. 13 lze pozorovat, že některé peptidy mající velmi podobnou hodnotu Gravy indexu eluují ve značně odlišných RT. Na druhé straně lze pozorovat peptidy s rozdílnou hodnotou Gravy indexu, které téměř koeluují. Je tedy patrné, že výpočet Gravy indexu není pro predikci eluce peptidů, potažmo lipopeptidů, vhodný.



Obr. 13: Závislost Gravy indexu peptidů tryptického hydrolyzátu Cya A na retenčním čase (RT). Červenou křivkou je vykreslena lineární regrese. Modrou svislicí je znázorněn RT lipopeptidu EGVATQTTAYGK(Pal)R. K – korelační koeficient.

Modrou svislicí je na Obr. 13 znázorněn RT palmitovaného peptidu proteinu Cya A. Samotný peptid bez mastné kyseliny má hodnotu Gravy indexu rovnu -1,45; což značí, že se jedná o hydrofilní peptid. Tento nemodifikovaný peptid nebyl při analýze zachycen, není tedy známa hodnota jeho RT. Z hodnot RT peptidů s podobnou hodnotou Gravy indexu lze předpokládat, že by daný peptid mohl eluovat přibližně kolem 20. minuty. Pozorovaný modifikovaný peptid eluuje ve 36. minutě mezi hydrofobními peptidy. Je tedy patrné, že navázání mastné kyseliny značně zvyšuje hydrofobicitu peptidu a způsobuje pozdější eluci peptidu při RP-HPLC analýze.

Pro statistické zhodnocení závislosti byla data proložena lineární regresí a byl vypočítán korelační koeficient<sup>81</sup>. Hodnota korelačního koeficientu ( $K = 0,432$ ) značí slabou pozitivní korelaci mezi veličinami. I ze statistického vyhodnocení vztahu lze vyvodit, že na základě hodnoty Gravy indexu nelze jednoznačně predikovat RT peptidu.

Z výsledků analýzy je patrné, že pro naše účely je predikce RT na základě hodnoty Gravy indexu obtížně použitelná. Mezi hodnotou Gravy indexu a RT peptidu neplatí jasná závislost. Také nelze zjistit příspěvek mastné kyseliny k celkové hydrofobicitě modifikovaných peptidů, tím pádem není možné predikovat, v kterém časovém rozmezí analýzy budou lipopeptidy eluovat.

Vhodnější přístup pro hodnocení hydrofobicity a predikci RT modifikovaných i nemodifikovaných peptidů je na základě experimentálně získaných dat z RP-HPLC analýz. Pro další studování této problematiky by bylo zapotřebí provést RP-HPLC analýzy vzorků obsahující nemodifikované peptidy a peptidy se stejnou sekvencí nesoucí různé lipomodifikace.

## 4.4 Optimalizace MS detekce

Při optimalizaci gradientu byl pro MS detekci použit datově závislý mód (DD). V Orbitrapu byla zaznamenána MS spektra pro všechny ionty v rozsahu  $m/z$  350-2000. Vybrané ionty (s minimální intenzitou  $10^3$  a nábojovým stavem 2-6) byly vybrány v kvadrupólu a následně fragmentovány v kolizní cele pomocí HCD při kolizní energii (CE) 30 eV. V Orbitrapu byla zaznamenána MS/MS spektra. Celý cyklus trval 2 s.

Zbytek mastné kyseliny je na peptid vázán kovalentní vazbou, která je poměrně stabilní a tím pádem hůře štěpitelná při fragmentaci. Při vyhodnocování fragmentačních spekter nebylo na první pohled zřejmé, že spektrum odpovídá modifikovanému peptidu. Ionty indikující přítomnost modifikace mají příliš nízkou intenzitu na to, aby byly identifikovány vyhodnocovacím softwarem.

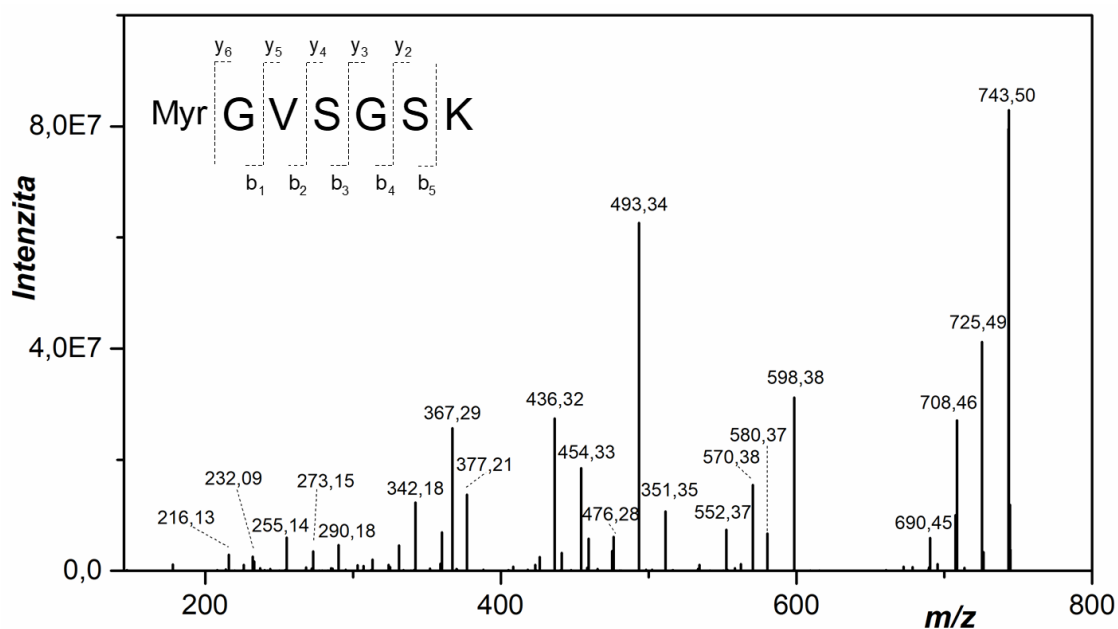
### 4.4.1 Fragmentace standardních lipopeptidů

Pro nalezení optimálních podmínek fragmentace lipidovaných peptidů, byl navržen experiment, při kterém byly fragmentovány syntetické lipopeptidy. Bylo cíleno na N-terminální modifikace, zejména myristoylace. Byl použit roztok obsahující peptid o sekvenci GVSGSK modifikovaný kyselinou myristovou na N-konci a roztok téhož peptidu s N-terminální kyselinou palmitovou. Vzorky byly měřeny na Lumosu s nanoESI zdrojem TriVersa NanoMate od společnosti Advion. Byly použity fragmentace pomocí CID, HCD, ETD a EThcD při různých kolizních energiích. Cílem bylo najít optimální fragmentační podmínky pro identifikaci N-terminální myristoylace. Byly sledovány indikační fragmentační ionty, které poukazují na přítomnost mastné kyseliny, tedy fragment samotné mastné kyseliny a následně fragment aminokyselin s mastnou kyselinou. V Tabulce 5 je přehled všech teoretických fragmentů lipopeptidu Myr-GVSGSK. Nejvíce bylo cíleno na acyliový ion kyseliny myristové o  $m/z$  211,205, který vzniká štěpením amidové vazby mezi kyselinou myristovou a glycinem, pro přehlednost byl tento ion označen jako  $b_0$ . Dále byl hledán fragment  $b_1$  ( $m/z$  268,227), který vzniká štěpením peptidové vazby mezi myristovaným glycinem a valinem. Prahová hodnota relativní intenzity signálu iontu pro detekci byla nastavena na 1 %.

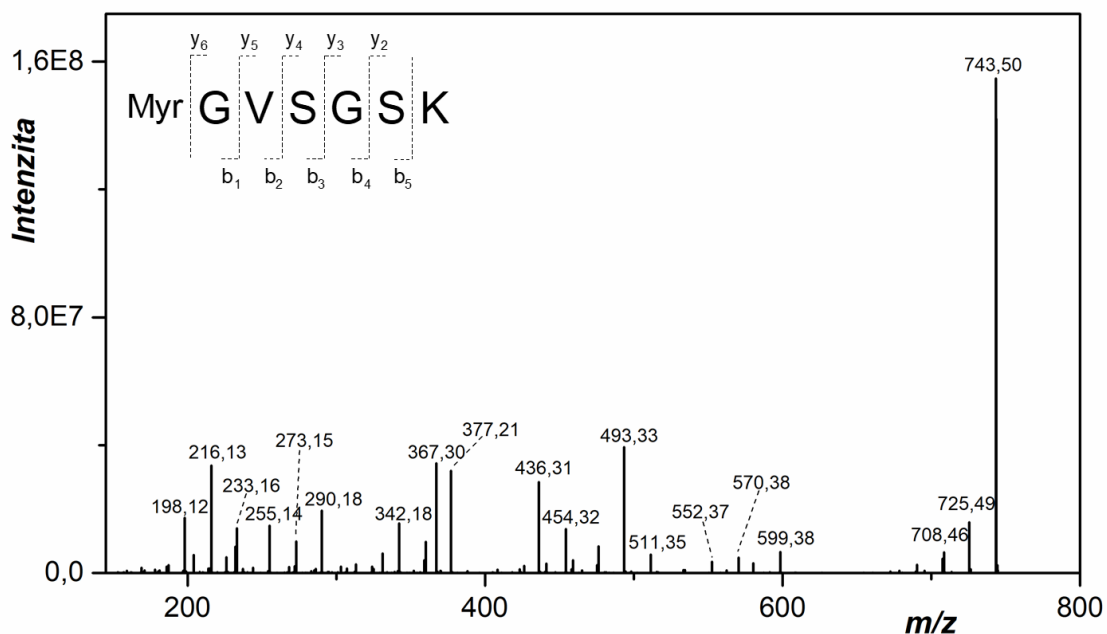
Tabulka 5: Teoretické fragmenty lipopeptidu Myr-GVSGSK

A	B	C	#	Sekvence	#	X	Y	Z
183,210	211,205	228,232	0	Myr			743,479	726,453
240,232	268,227	285,253	1	G	6	559,260	533,280	516,255
339,300	367,295	384,322	2	V	5	502,238	476,259	459,234
426,332	454,327	471,354	3	S	4	403,170	377,191	360,165
483,354	511,349	528,375	4	G	3	316,138	290,159	273,133
570,386	598,381	615,407	5	S	2	259,116	233,137	216,112
697,473	725,468	-	6	K	1	172,084	146,105	129,080

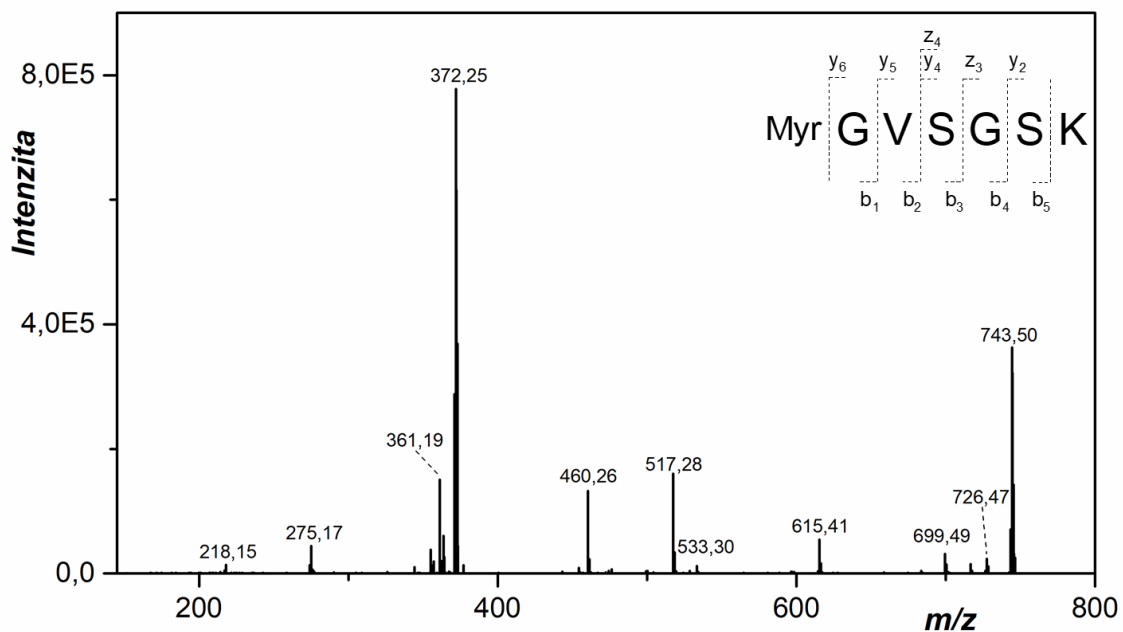
Na Obr. 14-17 jsou znázorněna fragmentační spektra pro jednotlivé fragmentační techniky. Pro CID a HCD fragmentaci byl vybrán jednonásobně nabitý peptid o  $m/z$  743,50; při ETD a EThcD byl fragmentován dvojnásobně nabitý peptid o  $m/z$  372,25. Fragmentační spektra jsou doplněna schématickým znázorněním detekovaných fragmentů.



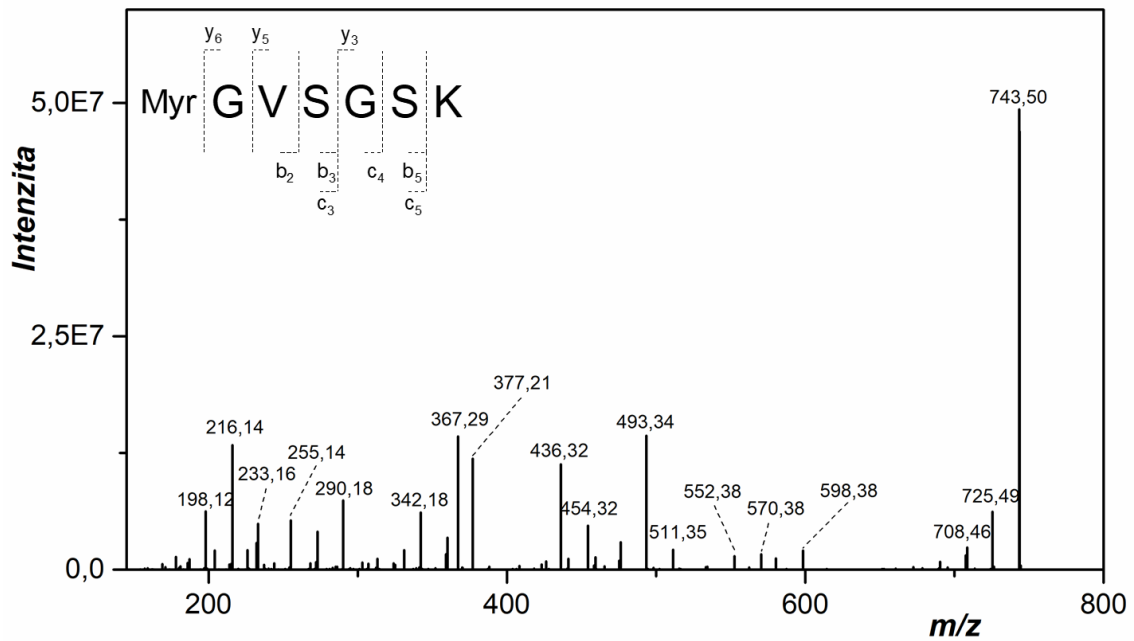
Obr. 14: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Myr-GVSGSK ( $m/z$  743,50) získaného CID fragmentací při CE 30 eV. V levém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.



Obr. 15: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Myr-GVSGSK (m/z 743,50) získaného HCD fragmentací při CE 30 eV. V levém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.

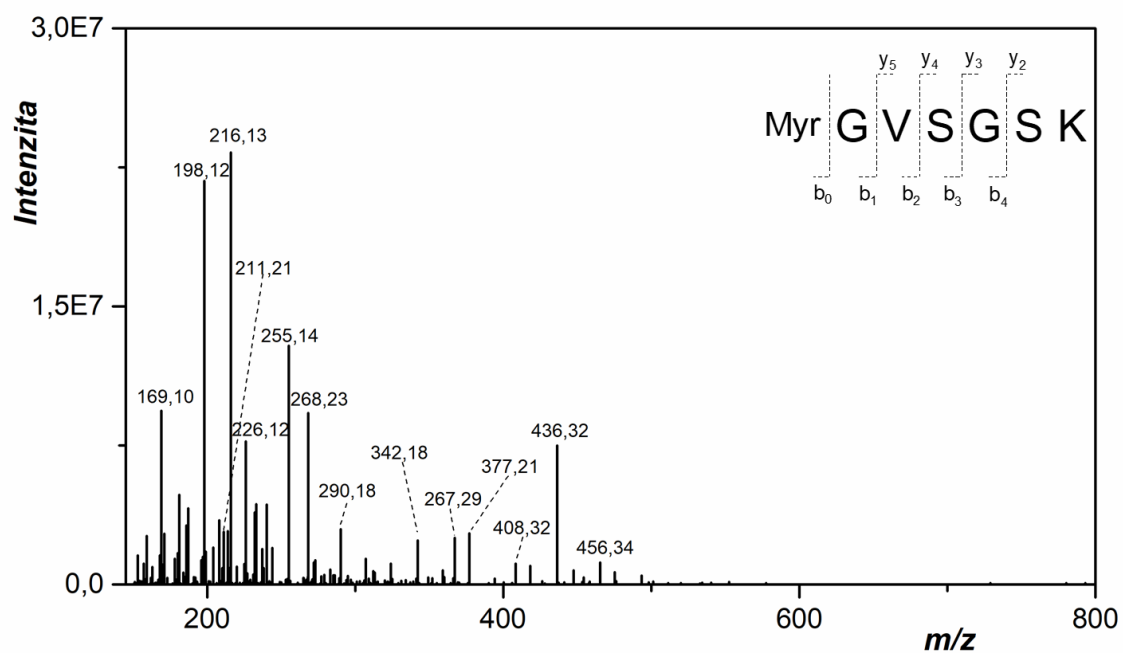


Obr. 16: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Myr-GVSGSK (m/z 372,25) získaného ETD fragmentací. V pravém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.



Obr. 17: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Myr-GVSGSK ( $m/z$  372,25) získaného EThcD fragmentací. V levém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.

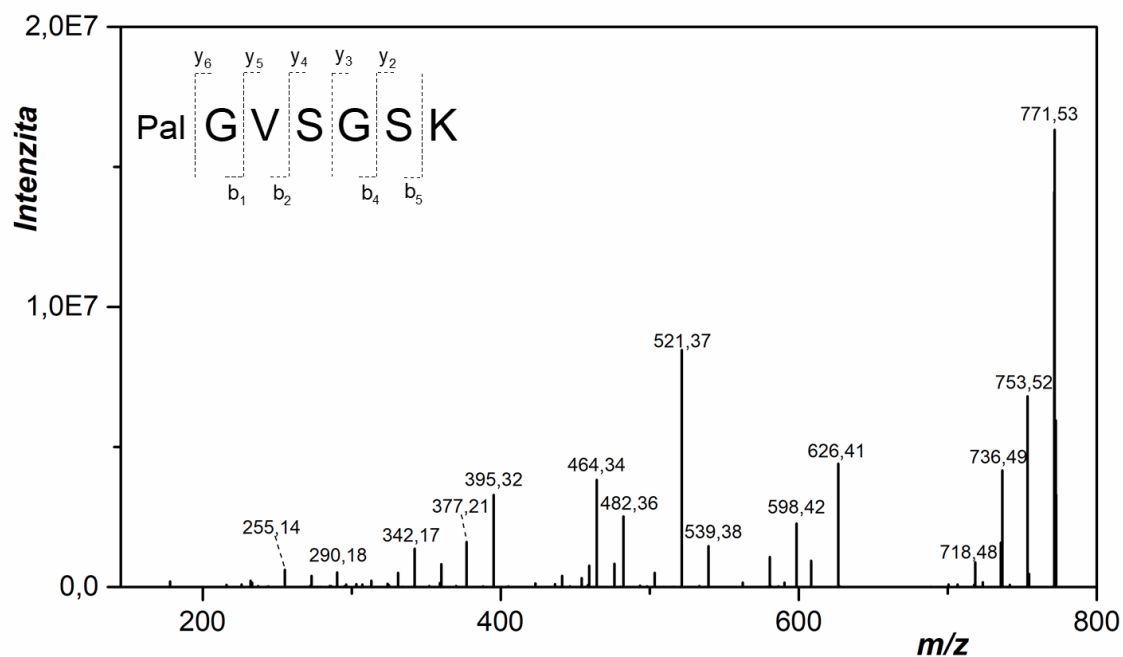
Všechny fragmentační techniky poskytovaly informačně bohatá spektra. Ve všech spektrech, kromě ETD, byl zachycen ion o  $m/z$  268,23 ( $b_1$ ). Se zvyšující se CE se zvyšovala i intenzita signálu fragmentu. U ETD nebyly detekovány ani očekávané analogický ion  $c_1$  ( $m/z$  285,25). Ion o  $m/z$  211,21 s relativní intenzitou vyšší než 5 % byl pozorován pouze u HCD fragmentace při vyšší kolizní energii (CE 45 eV). Při takto vysoké energii však docházelo ke značnému rozbití peptidu a ztrátě celkové strukturní informace (Obr. 18).



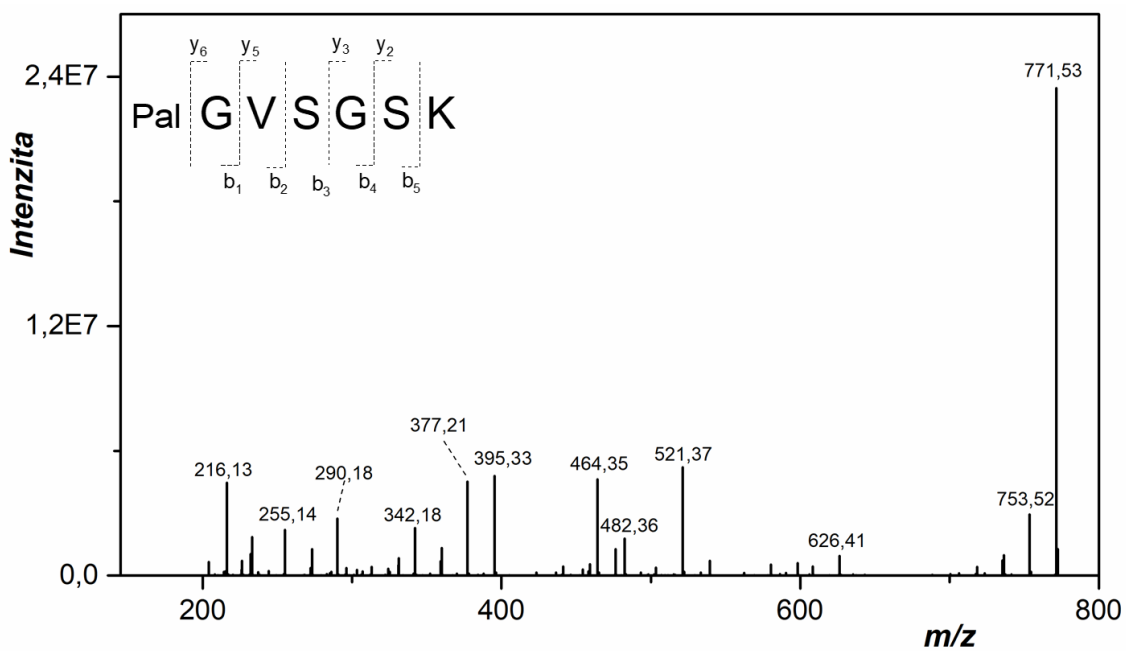
Obr. 18: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Myr-GVSGSK ( $m/z$  743,50) získaného HCD fragmentací při CE 45 eV. V pravém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.

U vzorků obsahujících palmitovaný peptid GVSGSK byl sledován fragment kyseliny palmitové  $b_0$  ( $m/z$  239,237) a fragment palmitovaného glycinu  $b_1$  ( $m/z$  296,258). Při fragmentacích byly pozorovány analogické výsledky k myristovanému peptidu (Obr. 19–23).

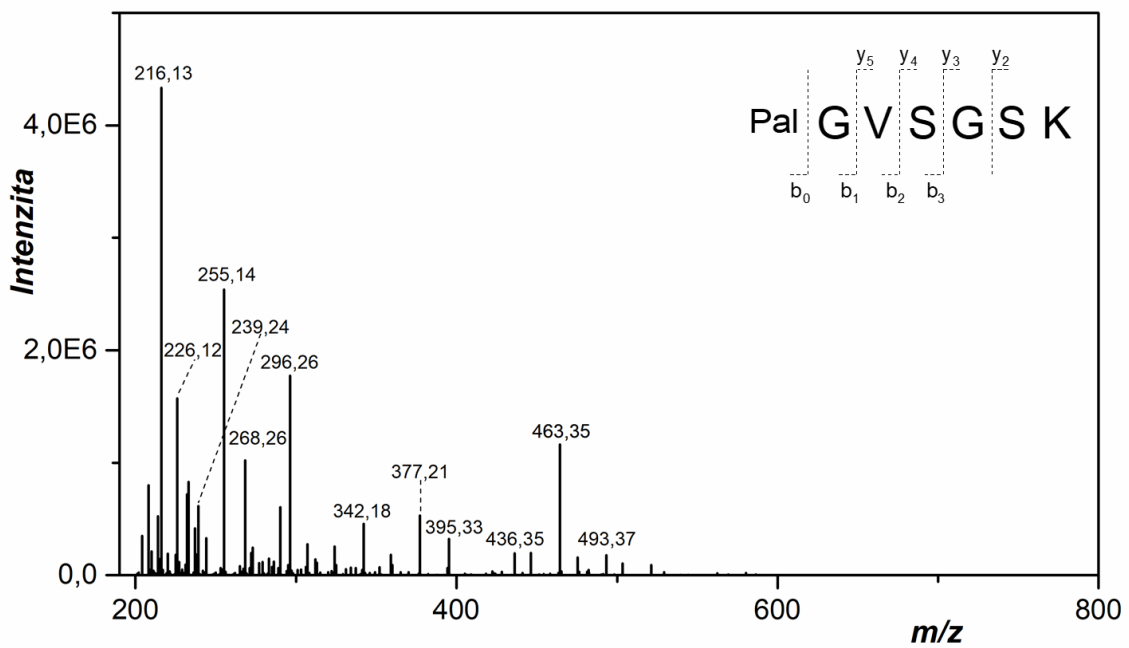




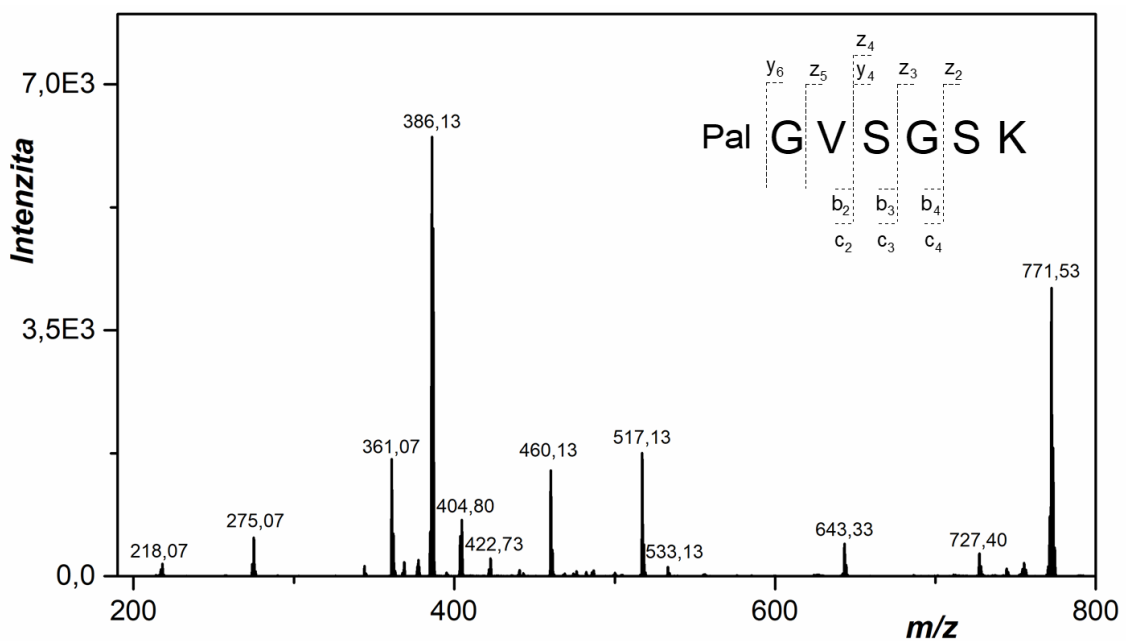
Obr. 19: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Pal-GVSGSK ( $m/z$  771,53) získaného CID fragmentací při CE 30 eV. V levém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.



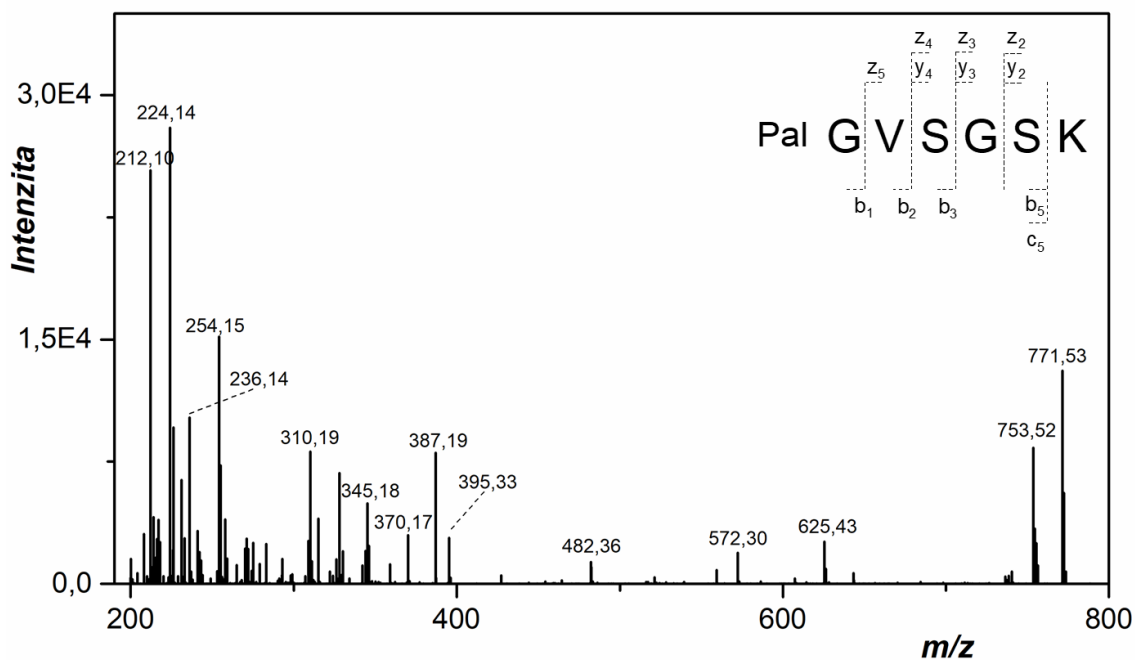
Obr. 20: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Pal-GVSGSK ( $m/z$  771,53) získaného HCD fragmentací při CE 30 eV. V levém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.



Obr. 21: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Pal-GVSGSK ( $m/z$  771,53) získaného HCD fragmentací při CE 45 eV. V pravém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.



Obr. 22: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Pal-GVSGSK ( $m/z$  386,27) získaného ETD fragmentací. V pravém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.



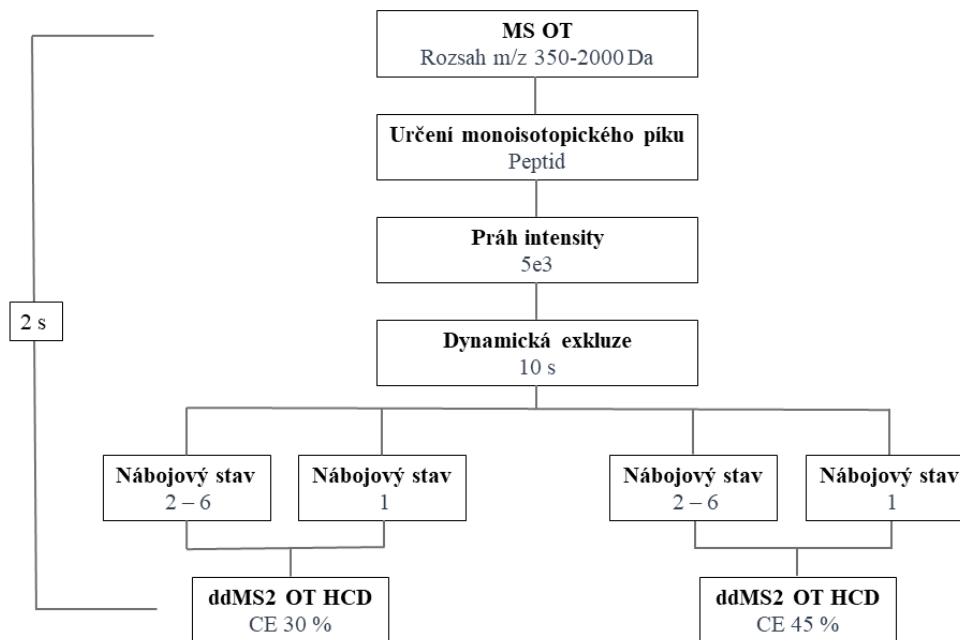
Obr. 23: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Pal-GVSGSK ( $m/z$  386,27) získaného EThcD fragmentací. V pravém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.

Na základě získaných poznatků o fragmentaci lipopeptidů, byla vytvořena MS/MS metoda pro detekci lipidovaných peptidů s použitím HCD fragmentace při CE 30 a 45 eV. Záměrně byly zvoleny dvě kolizní energie, jelikož při vyšší energii dochází k detekci identifikačních iontů o  $m/z$  211,21 a 268,23 (respektive  $m/z$  239,24 a 296,26) s relativně vysokou intenzitou (> 5 %), avšak ztrácí se část informace o celkové struktuře peptidu. Proto byla jako druhá kolizní energie zvolena CE 30 eV, která poskytuje fragmenty, ze kterých lze odečíst celou sekvenci peptidu.

#### 4.4.2 Aplikace na LC-MS/MS metody

Na základě výsledků získaných při studování fragmentace lipopeptidů byla navržena LC-MS/MS metoda pro analýzu tryptických hydrolyzátů proteinů s cílením na N-terminální myristoylaci. Byla použita gradientová eluce optimalizovaná v předchozích experimentech (Obr. 12). Pro MS detekci byl použit DD mód podle následujícího nastavení. V Orbitrapu byla zaznamenána MS spektra pro všechny ionty v rozsahu  $m/z$  350-2000. Vybrané ionty (s minimální intenzitou  $1e^4$  a nábojovým stavem

1 a 2-6) byly izolovány v kvadrupólu a následně fragmentovány v kolizní cele pomocí HCD při CE 30 eV. V Orbitrapu byla zaznamenána MS/MS spektra. Celý cyklus trval 2 s. Schéma nastavení MS detekce je znázorněno na Obr. 24.



Obr 24: Schéma nastavení DD módu pro MS detekci s cílením na N-terminální myristoylaci

Metoda byla aplikována na vzorky obsahující hydrolyzát proteinu MMTV a standardní roztoky myristovaného a palmitovaného peptidu GVSGSK. Výsledky měření byly vyhodnoceny pomocí softwaru ProteomeDiscoverer s prohledávacím algoritmem SEQUEST do společnosti ThermoFisher Scientific.

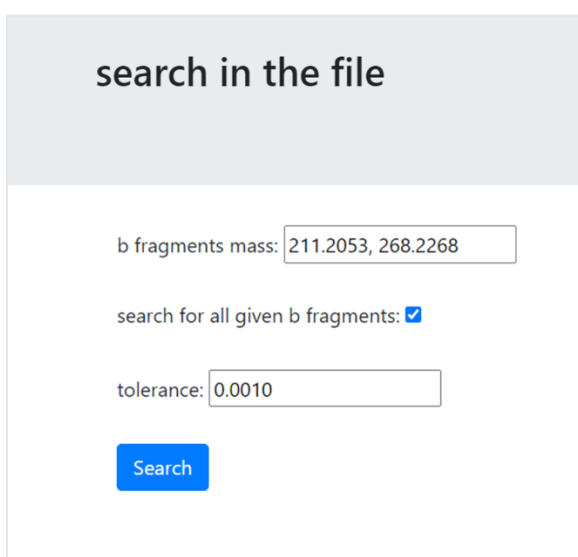
Měření ověřilo, že navržená metoda pro analýzu lipopeptidů funguje. Ve všech měřeních byla zachycena modifikace na N-konci kyselinou myristovou, respektive palmitovou.

## 4.5 Vyhodnocování spekter

K automatické interpretaci souborů, které obsahují mnoho MS/MS spekter slouží vyhodnocovací programy. Tyto programy identifikují peptidy a proteiny na základě shody mezi experimentálními a teoretickými spektry. Různé programy se liší algoritmem vyhodnocování. Problematické z hlediska identifikace mohou být post-translační modifikace. Pokud je intenzita signálu modifikace příliš nízká, nemusí být algoritmem spolehlivě vyhodnocena a lokalizována na správné místo v sekvenci peptidu.

Za účelem co nejspolehlivější detekce lipidace (zejména N-myristoylace) byla v rámci této diplomové práce zahájena spolupráce s Ing. Kamilou Clarovou, která na základě zadaných požadavků vytvořila skript v programovacím jazyce Python pro prohledávání fragmentačních spekter (ve formátu „mgf“). Algoritmus prohledává zadaný soubor fragmentačních spekter proti požadovaným hodnotám indikačních iontů. Pokud je fragment v MS/MS spektru nalezen, je dané spektrum následně vyhodnoceno a je určena sekvence peptidu.

Pro uživatelsky příjemnější ovládání byla pro skript vytvořena webová aplikace. Schéma uživatelského rozhraní je znázorněno na Obr. 25.



search in the file

b fragments mass: 211.2053, 268.2268

search for all given b fragments:

tolerance: 0.0010

Search

Obr. 25: Uživatelské rozhraní webové aplikace pro prohledávání fragmentačních spekter (autor: Ing. Kamila Clarová)

Naměřená data ve formátu .raw byla pomocí programu msConvert (ProteoWizard)<sup>82</sup> konvertována na soubor .mgf, který je následně nahrán do aplikace. Po nahrání souboru s fragmentačními spektry může uživatel zvolit, proti jakým hodnotám fragmentů má být soubor prohledán. Při zadání více fragmentů lze zvolit, zda mají být hledána spektra obsahující všechny zadané fragmenty, nebo spektra obsahující alespoň jeden z fragmentů. Dále je možné zvolit, s jakou odchylkou mají být fragmenty hledány. Výsledkem prohledávání je soubor obsahující fragmentační spektra splňující zadané podmínky. Bylo předpokládáno, že fragmenty budou nalezeny v MS/MS spektrech získaných fragmentací při vyšší kolizní energii (45 eV). Pro získání informace o struktuře peptidu je následně vyhodnoceno odpovídající MS/MS spektrum ( $m/z$  peptidu, RT) zaznamenané pro HCD při CE 30 eV.

Skript byl testován na 4 vzorcích tryptického hydrolyzátu proteinu MMTV, do kterého byly přidávány standardní roztoky syntetických lipopeptidů v různých absolutních množstvích v nástřiku (100, 200, 1000 a 2000 fmol). Vzorky byly měřeny pomocí výše zmíněné LC-MS/MS metody. Každé měření bylo opakováno třikrát.

V Tabulce 6 je souhrn výsledků po měření a prohledání pomocí navrženého skriptu. Byly sledovány ionty jednonásobně ( $m/z$  743,50) a dvojnásobně ( $m/z$  372,25) nabitého myristovaného peptidu GVSGSK. V tabulce je zaznamenan celkový počet fragmentačních spekter jednotlivých prekurzorových iontů. Ve vedlejším sloupci je zapsán počet fragmentačních spekter prekurzorů, ve kterých byl detekován alespoň jeden hledaný indikační fragment ( $m/z$  211,21 nebo  $m/z$  268,23). Dále je uveden počet fragmentačních spekter prekurzorů, ve kterých byly nalezeny oba sledované fragmenty zároveň. V posledním sloupci je počet fragmentačních spekter, ve kterých nebyl identifikován ani jeden hledaný fragment. Tolerance vyhledávání byla nastavena na  $m/z = 0,001$ .

Tabulka č. 6: Počet identifikovaných spekter prekurzorových iontů lipopeptidu a počet spekter prekurzorových iontů obsahující hledané fragmenty v triplikátech po vyhodnocení skriptem

<i>n</i> fmol	<i>m/z</i>	<i>z</i>	Číslo měření	Celkem MS/MS spekter	Alespoň jeden fragment	Oba fragmenty	Žádný fragment
100	743,503	1+	I	2	2	1	0
			II	2	2	2	0
			III	2	2	1	0
	372,255	2+	I	2	2	1	0
			II	2	2	1	0
			III	2	2	2	0
200	743,503	1+	I	2	2	2	0
			II	2	2	2	0
			III	2	2	2	0
	372,255	2+	I	2	2	2	0
			II	2	2	1	0
			III	2	2	1	0
1000	743,503	1+	I	11	9	4	2
			II	10	9	3	1
			III	10	10	3	0
	372,255	2+	I	6	6	4	0
			II	6	6	4	0
			III	6	6	5	0
2000	743,503	1+	I	10	9	5	1
			II	9	7	4	2
			III	9	8	6	1
	372,255	2+	I	7	6	4	1
			II	7	5	4	2
			III	6	6	2	0

*n* – absolutní množství lipopeptidu Myr-GVSGSK v nástřiku; *z* – nábojový stav

Zleva: první sloupec – koncentrace lipopeptidu Myr-GVSGSK; druhý a třetí sloupec – hodnota *m/z* a nábojový stav peptidu (prekurzorový ion); čtvrtý sloupec – číslo měření vzorku; pátý sloupec – celkový počet fragmentačních spekter prekurzorového iontu *m/z* 753,50 (respektive *m/z* 372,25); šestý sloupec – počet MS/MS spekter pro daný prekurzor obsahující alespoň jeden z hledaných fragmentů (*m/z* 211,21 nebo 268,23); sedmý sloupec – počet MS/MS spekter pro daný prekurzor obsahující oba hledané fragmenty zároveň, osmý sloupec – MS/MS spektra daného prekurzoru neobsahující ani jeden z hledaných fragmentů.

Ve všech vzorcích byla identifikovaná lipomodifikace. Pro dvě nejnižší nanesená množství se neliší celkový počet MS/MS spekter, liší se však počet spekter, ve kterých byly zachyceny oba fragmenty. Při absolutním množství 200 fmol byly hledané fragmenty nalezeny ve větším počtu MS/MS spekter než v případě 100 fmol. Pro nejvyšší nanesené množství (1000 a 2000 fmol) jsou celkové počty spekter a detekovaných fragmentů srovnatelné. Pozitivní je i relativně nízký počet spekter která neobsahují ani jeden z hledaných fragmentů.

Z tabulky lze vyvodit, že nanesené množství peptidu hraje roli v počtu identifikovaných spekter a detekovaných fragmentů. Pro množství lipopeptidu v nástřiku nižší než 100 fmol může být obtížnější modifikaci odhalit i vzhledem k citlivosti měření.

Výsledky prohledávání MS/MS spekter navrženým skriptem ukázaly, že algoritmus je schopný detekovat N-terminální myristoylaci, případně palmitoylaci, v souboru fragmentačních spekter.

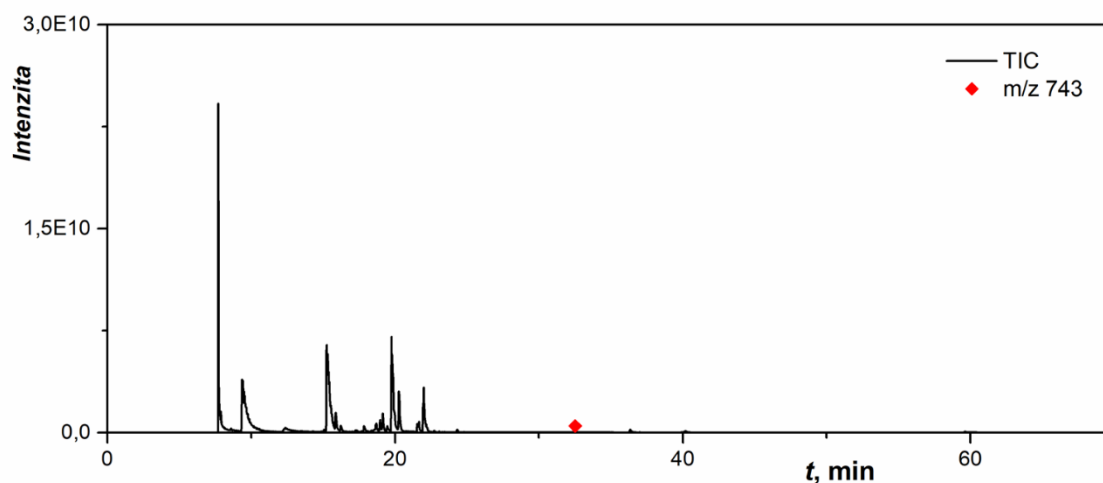
Skript bude i nadále vyvíjen ve spolupráci s Ing. Kamilou Clarovou. V dalších krocích bude automatizován pro identifikaci sekvencí ve spektrech obsahujících hledané fragmenty a také bude rozšířen o vyhledávání dalších lipomodifikací. Cílem bude vytvořit samostatně fungující prohledávací algoritmus cílený na lipomodifikace proteinů.



## 4.6 Aplikace metody na vzorek proteinu MAPPhis

Celý proces optimalizovaný v rámci předkládané diplomové práce byl testován na vzorku matrixového proteinu Mason-Pfizer opičího viru s histidinovou kotvou (MAPPhis) modifikovaný kyselinou myristovou na N-konci. Cílem experimentu bylo detekovat lipidovou modifikaci tohoto proteinu.

Protein byl nejprve naštěpen trypsinem pomocí eFASP. Do vzorku byly pro kontrolu přidány standardní roztoky lipopeptidů (myristovaný a palmitovaný GVSGSK) o koncentraci  $100 \text{ fmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Následně byl hydrolyzát analyzován pomocí LC-MS/MS. Pro HPLC analýzu byl použit 70minutový gradient zobrazený na Obr. 12. Pro MS detekci byla zvolena metoda s HCD fragmentací při CE 30 a 45 eV (Obr. 24). Výsledky měření byly prohledány ve výše zmíněném skriptu, zároveň byly výsledky vyhodnoceny v programu Proteome Discoverer. Výsledek LC-MS/MS analýzy je vidět na Obr. 26.

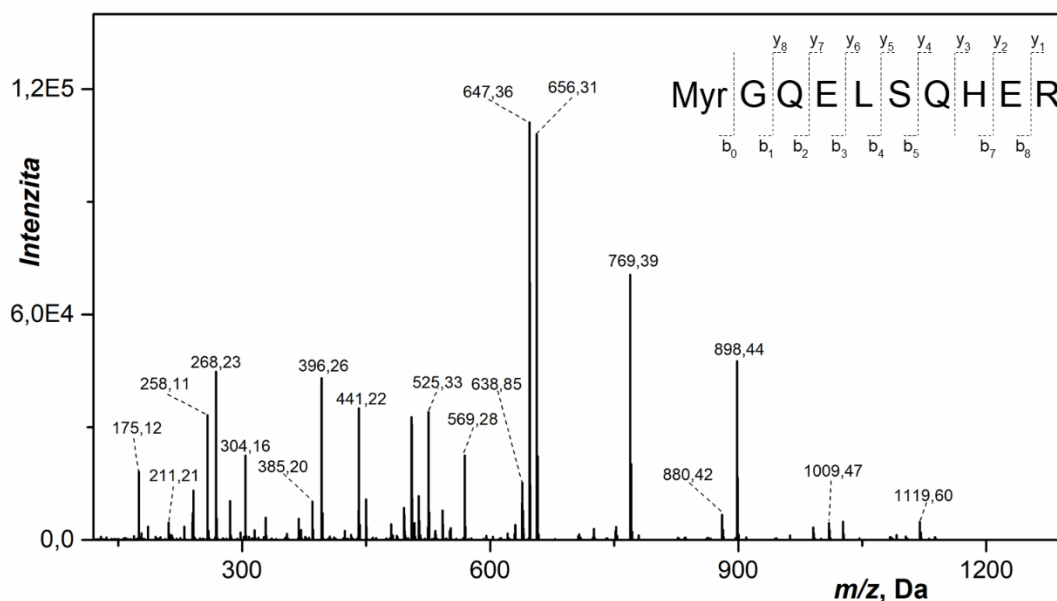


Obr. 26: Záznam LC-MS/MS analýzy hydrolyzátu proteinu MAPPhis. Černou křivkou je znázorněn TIC vzorku, červená značka označuje RT lipopeptidu Myr-GVSGSK.

Po prohledání ve skriptu byla identifikována myristoylace na syntetizovaném peptidu GVSGSK. Dále bylo identifikováno 10 kandidátních peptidů, jejichž MS/MS spektra obsahovala oba hledané fragmenty a poukazovala na přítomnost N-terminální myristoylace. Peptidy odpovídaly lipidové modifikaci i hodnotou RT, eluovaly mezi 31.

a 33. min Pro srovnání Myr- GVSGSK měl RT 32,5 min. Z fragmentačních spekter iontu o  $m/z$  647,36 (Obr. 27 a 28) byl identifikován N-terminální peptid proteinu MAPPhis o sekvenci GQELSQHER nesoucí myristoylaci na N-terminálním glycinu. Zbylých 9 kandidátních peptidů nalezených při prohledávání ve skriptu nebylo identifikováno. Pro jejich identifikaci by bylo zapotřebí provést ruční *de novo* sekvenování.

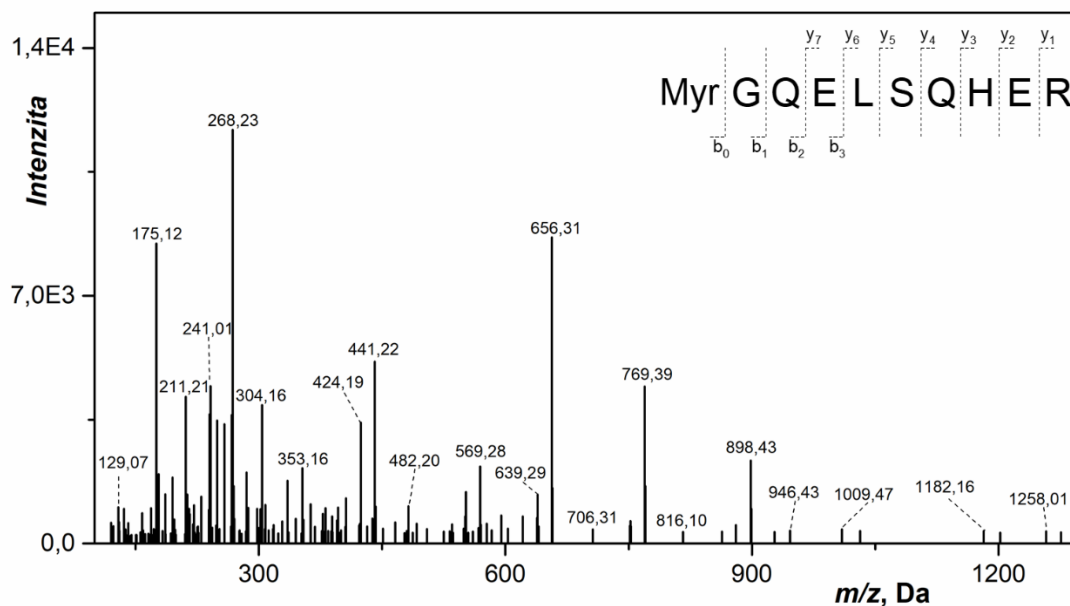
Při prohledání dat v Proteome Discovereru bylo identifikováno 13 peptidů z proteinu MAPPhis. Mezi identifikovanými peptidy byl i N-terminální peptid nesoucí myristoylaci.



Obr. 27: Záznam  $MS^2$  spektra pro peptid Myr-GQELSQHER ( $m/z$  647,36, 2+) získaného při LC-MS/MS analýze hydrolyzátu proteinu MAPPhis HCD fragmentací při CE 30 eV. V pravém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.

Fragmentační spektrum zaznamenané při CE 30 eV (Obr. 27) bylo velmi bohaté, obsahovalo téměř všechny fragmentační ionty peptidu. Dokonce byl pozorován ion  $b_0$  o  $m/z$  211, který při předchozích měřeních lipopeptidů nebyl při této CE detekován.

V  $MS/MS$  spektru získaném HCD fragmentací při CE 45 eV (Obr. 28) byly detekovány oba indikační ionty ( $m/z$  211 a 268), dále bylo zachyceno značné množství dalších fragmentačních iontů peptidu. Nicméně informace o struktuře nebyla tak obsáhlá jako u spektra při 30 eV.



Obr. 28: Záznam MS<sup>2</sup> spektra pro peptid Myr-GQELSQHER ( $m/z$  647,36, 2+) získaného při LC-MS/MS analýze hydrolyzátu proteinu MAPPhis HCD fragmentací při CE 45 eV. V pravém horním rohu je schéma zachycených fragmentů.

Tímto experimentem bylo ověřeno, že metoda navržená v předkládané diplomové práci je schopna odhalit N-terminální myristoylaci ve vzorku tryptického hydrolyzátu proteinu MAPPhis.

V dalších experimentech by bylo třeba ověřit vhodnost metody na složitější a komplexnější vzorky obsahující vedle lipoproteinů i nemodifikované proteiny. Pro tyto účely by bylo vhodné vyzkoušet například zakoncentrování pomocí extrakčních technik (SPE, LLE). Dále lze také pracovat na vylepšení této metody. Kromě dalšího vývoje výše zmíněného skriptu, lze do větší hloubky prozkoumat fragmentace lipomodifikací, a to nejen N-terminální myristoylace a palmitoylace.

## 5 Závěr

V rámci této diplomové práce byla optimalizována HPLC-MS/MS metoda pro analýzu proteinů nesoucí modifikaci mastnou kyselinou.

V první části byla optimalizována příprava vzorku lipoproteinů zahrnující proteolytické štěpení proteinu. Nejprve byla testována dvě redukční činidla – DTT a TCEP. Obě činidla poskytovala obdobné výsledky a pro další experimenty byl zvolen DTT jako redukční činidlo. Následně byly testovány tři proteázy – trypsin, chymotrypsin a GluC. Pro srovnání těchto enzymů bylo sledováno pokrytí sekvence proteinů a úspěšnost identifikace lipidové modifikace. Nejspolehlivější výsledky vykazoval trypsin, proto byl vybrán pro další experimenty. Poté byl testován postup enzymatického štěpení na filtru (eFASP). Tento postup vykazoval srovnatelné pokrytí sekvence jako enzymatické štěpení v roztoku, nicméně úspěšnost identifikace se oproti předešlým postupům výrazně zvýšila. Z tohoto důvodu byl pro další experimenty použit právě tento postup.

V další části práce byla optimalizována gradientová eluce pro LC-MS/MS analýzu. Cílem bylo zlepšit separaci lipopeptidů na chromatografické koloně a zároveň posunout eluci těchto peptidů. Jako nejvhodnější 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). Pro zvýšení účinnosti vymytí lipopeptidů ze systému byla zvýšena eluční síla mobilní fáze B. Místo původně používaného 80% ACN s 0,1% FA byl použit 100% ACN s 0,1% FA.

Následně byla optimalizována metoda MS detekce. Na syntetických lipopeptidech byly testovány různé fragmentační techniky (CID, HCD, ETD a EThcD) s různým nastavením kolizní energie. Během těchto experimentů bylo cíleno na fragmenty indikující přítomnost N-terminální myristoylace či palmitoylace. Nejlepší výsledky poskytovala HCD fragmentace. Při vyšší CE (45 eV) byly identifikovány indikační ionty, nevýhodou však byla ztráta části informace o celkové struktuře peptidu. Proto byla pro MS detekci použita HCD fragmentace při dvou různých CE (30 a 45 eV).

Dále byl ve spolupráci s Ing. Kamilou Clarovou navržen skript v Pythonu pro vyhodnocování spekter peptidů s cílením na N-terminální myristoylace. Program prohledával fragmentační spektra, ve kterých hledal indikační spektra.

V poslední části práce byla ověřena funkčnost celého navrženého postupu analýzy lipoproteinů. Postup byl aplikován na vzorek proteinu MAPPhis s cílem detekovat N-terminální myristoylaci proteinu. Výsledky ukázaly, že navržený postup je schopný detekovat N-terminální myristoylaci ve vzorku proteolyticky rozštěpeného proteinu.

## 6 Seznam zdrojů

1. Folch, J. & Lees, M. Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. *J. Biol. Chem.* **191**, 807–817 (1951).
2. Tate, E. W., Kalesh, K. A., Lanyon-Hogg, T., Storck, E. M. & Thinon, E. Global profiling of protein lipidation using chemical proteomic technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **24**, 48–57 (2015).
3. Resh, M. D. Fatty acylation of proteins: New insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1451**, 1–16 (1999).
4. Salaun, C., Greaves, J. & Chamberlain, L. H. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J. Cell Biol.* **191**, 1229–1238 (2010).
5. Patwardhan, P. & Resh, M. D. Myristoylation and Membrane Binding Regulate c-Src Stability and Kinase Activity. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 4094–4107 (2010).
6. Jiang, H. *et al.* Protein Lipidation: Occurrence, Mechanisms, Biological Functions, and Enabling Technologies. *Chem. Rev.* **118**, 919–988 (2018).
7. Russell Johnson, D., Bhatnagar, R. S., Knoll, L. J. & Gordon, J. I. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 869–914 (1994).
8. Hewlett, E. L., Urban, M. A., Manclark, C. R. & Wolff, J. Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1926–1930 (1976).
9. Hannoush, R. N. Synthetic protein lipidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **28**, 39–46 (2015).
10. Resh, M. D. Covalent lipid modifications of proteins. *Curr. Biol.* **23**, (2013).
11. Eisenhaber, B., Eisenhaber, F. & S., M.-S. NMT - The MYR predictor. <http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm>. Navštíveno 5.6.2020.
12. Xie, Y. *et al.* GPS-Lipid: A robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
13. Bologna, G., Yvon, C., Duvaud, S. & Veuthey, A. L. N-terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics* **4**, 1626–1632 (2004).
14. Castrec, B. *et al.* Structural and genomic decoding of human and plant myristoylomes reveals a definitive recognition pattern. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 671–

- 679 (2018).
15. Tate, E. W., Bell, A. S., Rackham, M. D. & Wright, M. H. N-Myristoyltransferase as a potential drug target in malaria and leishmaniasis. *Parasitology* **141**, 37–49 (2014).
  16. Aicart-Ramos, C., Valero, R. A. & Rodriguez-Crespo, I. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 2981–2994 (2011).
  17. Epstein, W. W., Lever, D., Leining, L. M., Bruenger, E. & Rilling, H. C. Quantitation of prenylcysteines by a selective cleavage reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 9668–9670 (1991).
  18. Tschantz, W. R., Digits, J. A., Pyun, H. J., Coates, R. M. & Casey, P. J. Lysosomal Prenylcysteine Lyase Is a FAD-dependent Thioether Oxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 2321–2324 (2001).
  19. Tschantz, W. R., Zhang, L. & Casey, P. J. Cloning, expression, and cellular localization of a human prenylcysteine lyase. *J. Biol. Chem.* **274**, 35802–35808 (1999).
  20. Kinoshita, T. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors: Biochemistry and cell biology: Introduction to a thematic review series. *J. Lipid Res.* **57**, 4–5 (2016).
  21. Confer, D. L. & Eaton, J. W. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science (80-. )*. **217**, 948–950 (1982).
  22. Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Hewlett, E. L. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science (80-. )*. **266**, 433–435 (1994).
  23. Pearson, R. D., Symes, P., Conboy, M., Weiss, A. A. & Hewlett, E. L. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J. Immunol.* **139**, 2749–2754 (1987).
  24. Bellalou, J., Ladant, D. & Sakamoto, H. Synthesis and secretion of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase as a 200-kilodalton protein. *Infect. Immun.* **58**, 1195–1200 (1990).
  25. Barry, E. M. *et al.* *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J. Bacteriol.* **173**, 720–726 (1991).

26. Glaser, P. *et al.* The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2**, 19–30 (1988).
27. Novak, J. *et al.* Structure–function relationships underlying the capacity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin to disarm host phagocytes. *Toxins (Basel)*. **9**, (2017).
28. Masin, J., Osicka, R., Bumba, L. & Sebo, P. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: A unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. *Pathog. Dis.* **73**, (2015).
29. Basar, T. *et al.* The conserved lysine 860 in the additional fatty-acylation site of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase is crucial for toxin function independently of its acylation status. *J. Biol. Chem.* **274**, 10777–10783 (1999).
30. Guo, Q. *et al.* Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J.* **24**, 3190–3201 (2005).
31. Hewlett, E. L., Gordon, V. M., McCaffery, J. D., Sutherland, W. M. & Gray, M. C. Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis*. *J. Biol. Chem.* **264**, 19379–19384 (1989).
32. Bittner, J. J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science (80- )*. **84**, 162 (1936).
33. Ross, S. R. Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. *Viruses* **2**, 2000–2012 (2010).
34. Swanstrom, R. & Wilis, J. *Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins*. (Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
35. Maurer-Stroh, S. & Eisenhaber, F. Myristoylation of viral and bacterial proteins. *Trends Microbiol.* **12**, 178–185 (2004).
36. Hizi, A. *et al.* Analysis of gag proteins from mouse mammary tumor virus. *J. Virol.* **63**, 2543–2549 (1989).
37. Doležal, M. *et al.* Myristoylation drives dimerization of matrix protein from mouse mammary tumor virus. *Retrovirology* **13**, (2016).
38. Junková, P., Pleskot, R., Prechal, J., Sýs, J. & Ruml, T. Differences and commonalities in plasma membrane recruitment of the two morphogenetically



- distinct retroviruses HIV-1 and MMTV. *J. Biol. Chem.* **295**, 8819–8833 (2020).
39. Gross, J. H. *Mass spectrometry: A textbook: Second edition. Mass Spectrometry: A Textbook: Second Edition* (2011). doi:10.1007/978-3-642-10711-5.
  40. Ho, C. S. *et al.* Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin. Biochem. Rev.* **24**, 3–12 (2003).
  41. Dole, M. *et al.* Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240–2249 (1968).
  42. Hoffmann, E. & Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. (John Wiley, 2007).
  43. Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A. & Kraj, A. *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications (A Mass Spectrometer's Building Blocks and Tandem Mass Spectrometry)*. (Wiley, 2008).
  44. Fenn, J. B. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). in *Angewandte Chemie - International Edition* vol. 42 3871–3894 (2003).
  45. Cech, N. B. & Enke, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 362–387 (2001).
  46. El-Aneed, A., Cohen, A. & Banoub, J. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.* **44**, 210–230 (2009).
  47. Baldwin, M. A. Mass spectrometers for the analysis of biomolecules. *Methods Enzymol.* **402**, 3–48 (2005).
  48. Thermo Fischer Scientific. <https://planetorbitrap.com/orbitrap-fusion-lumos#tab:schematic>. Navštíveno 16.7.2020.
  49. Welling, M., Schuessler, H. A., Thompson, R. I. & Walther, H. Ion/molecule reactions, mass spectrometry and optical spectroscopy in a linear ion trap. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **172**, 95–114 (1998).
  50. Hager, J. W. A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, (2002).
  51. Kingdon, K. H. A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Phys. Rev.* **21**, 408–418 (1923).
  52. Knight, R. D. Storage of ions from laser-produced plasmas. *Appl. Phys. Lett.* **38**, 221–223 (1981).

53. Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156–1162 (2000).
54. Makarov, A., Denisov, E., Lange, O. & Horning, S. Dynamic Range of Mass Accuracy in LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 977–982 (2006).
55. Makarov, A. *et al.* Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113–2120 (2006).
56. Kinter, M. & Sherman, N. E. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. (John Wiley and Sons Inc., 2000).
57. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Letter to the editors. *Biol. Mass Spectrom.* **11**, 601–601 (1984).
58. Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T. & Watson, J. T. Novel Fragmentation Process of Peptides by Collision-Induced Decomposition in a Tandem Mass Spectrometer: Differentiation of Leucine and Isoleucine. *Anal. Chem.* **59**, 2621–2625 (1987).
59. Murray, K. K. *et al.* Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **85**, 1515–1609 (2013).
60. Holmes, J., Aubry, C. & Mayer, P. What and What Not to Expect from Gas-Phase Ions. in *Assigning Structures to Ions in Mass Spectrometry* (CRC Press, 2006). doi:10.1201/9780203492475.ch2.
61. Sleno, L. & Volmer, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **39**, 1091–1112 (2004).
62. Lingdong Quan, M. L. CID,ETD and HCD Fragmentation to Study Protein Post-Translational Modifications. *Mod. Chem. Appl.* **01**, (2013).
63. Syka, J. E. P., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J. & Hunt, D. F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9528–9533 (2004).
64. Frese, C. K. *et al.* Toward full peptide sequence coverage by dual fragmentation combining electron-transfer and higher-energy collision dissociation tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 9668–9673 (2012).
65. Mommen, G. P. M. *et al.* Expanding the detectable HLA peptide repertoire using electron-transfer/ higher-energy collision dissociation (EThcD). *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* **111**, 4507–4512 (2014).
66. Frese, C. K. *et al.* Unambiguous phosphosite localization using electron-transfer/higher-energy collision dissociation (ET<sub>h</sub>CD). *J. Proteome Res.* **12**, 1520–1525 (2013).
  67. Biswas, K. M., DeVido, D. R. & Dorsey, J. G. Evaluation of methods for measuring amino acid hydrophobicities and interactions. *J. Chromatogr. A* **1000**, 637–655 (2003).
  68. Nozaki, Y. & Tanford, C. The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale. *J. Biol. Chem.* **246**, 2211–2217 (1971).
  69. Lawson, E. Q. *et al.* A simple experimental model for hydrophobic interactions in proteins. *J. Biol. Chem.* **259**, 2910–2912 (1984).
  70. Lee, B. & Richards, F. M. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.* **55**, (1971).
  71. Chothia, C. The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *J. Mol. Biol.* **105**, 1–12 (1976).
  72. Bull, H. B. & Breese, K. Surface tension of amino acid solutions: A hydrophobicity scale of the amino acid residues. *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 665–670 (1974).
  73. Makhatadze, G. I. & Privalov, P. L. Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: Hydration effect. *J. Mol. Biol.* **213**, 375–384 (1990).
  74. Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132 (1982).
  75. Eng, J. K., McCormack, A. L. & Yates, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 976–989 (1994).
  76. ThermoFisher.com. Proteome Discoverer Software.  
<https://www.thermoFisher.com/cz/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-software/multi-omics-data-analysis/proteome-discoverer-software.html>. Navštíveno 30.7.2020.
  77. Shilov, I. V. *et al.* The paragon algorithm, a next generation search engine that

- uses sequence temperature values sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1638–1655 (2007).
78. Pravdová, A. Separace a identifikace lipopeptidů pomocí chromatografie a hmotnostní spektrometrie. (Karlova Univerzita, 2019).
  79. Erde, J., Loo, R. R. O. & Loo, J. A. Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *J. Proteome Res.* **13**, 1885–1895 (2014).
  80. Lin, Y. *et al.* Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins. *Anal. Biochem.* **377**, 259–266 (2008).
  81. Fiřtová, L. Korelace - co to je korelace a co znamená korelační koeficient. <https://exceltown.com/navody/pokrocila-analyza-regrese-korelace/korelace-co-to-vlastne-je/>. Navštíveno 7.8.2020.
  82. Chambers, M. C. *et al.* A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* **30**, 918–920 (2012).