UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

IDENTIFIKACE PURIFIKOVANÝCH BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.
Školitel specialista: Mgr. Rudolf Andrýs

Hradec Králové 2014

Bc. Andrea Křížová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Bc. Andrea Křížová

Ráda bych poděkovala Mgr. Rudolfu Andrýsovi a PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, vstřícnost a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovali.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Andrea Křížová
Školitel: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D.
Název diplomové práce: Identifikace purifikovaných biotransformačních enzymů pomocí hmotnostní spektrometrie

Biotransformační enzymy se podílejí na metabolismu řady endogenních látek a xenobiotik. Mnoho těchto enzymů nebylo dodnes ve vztahu k metabolismu xenobiotik charakterizováno vůbec nebo jen velmi okrajově. Pro poznání a pochopení, jak působí na sloučeniny ovlivňující chod organismu jako celku, je důležité biotransformační enzymy purifikovat, identifikovat a podrobně charakterizovat.

Klasická elektroforéza má stále nezastupitelné místo v oblasti purifikace a charakterizace proteinů a ve spojení s hmotnostní spektrometrií představuje neodmyslitelný tandem k jejich identifikaci. K získaní nezpochybnitelných výsledků z hmotnostně-spektrometrické (MS) identifikace proteinů je zásadní vyvarovat se kontaminaci vzorku během jeho zpracování.

Striktním používáním jednorázových pracovních pomůcek, chemikálií v MS čistotě, filtrací roztoků apod. byly na pracovišti Katedry biochemických věd zavedeny zásady pro přípravu vzorků k MS analýze. Data získaná z MS analýz ukázala, že při dodržování těchto zásad lze připravit vzorky v celém rozsahu bez rizika kontaminace. Vypracované zásady a optimalizovaný postup přípravy vzorku byl následně aplikován při identifikaci enzymu AKR1C3 získaného afinitní purifikací z lidských hepatocytů.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Andrea Křížová
Supervisor: PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D
Title of diploma thesis: Identification of purified biotransformation enzymes by means of mass spektrometry

Biotransformation enzymes are involved in the metabolism of a wide range of both endogenous compounds and xenobiotics. Regarding the metabolism of xenobiotics, many of those enzymes have not been characterized at all or only marginally. To get better knowledge about how the biotransformation enzymes affect compounds with significant impact on the organism as a whole, they need to be purified, identified and subsequently thoroughly characterized.

The classical electrophoresis is still irreplaceable for protein purification and characterization. Moreover, combination of electrophoresis with mass spectrometry (MS) represents an inseparable tandem for protein identification. However, to obtain unambiguous outputs from mass-spectrometry based protein identification, it is essential to avoid unwanted contamination of the sample during sample preparation.

Wearing disposable protective equipments, using MS grade chemicals, solutions filtering are examples of rules for sample preparation for MS analysis that were established at the Department of Biochemical Sciences. Data obtained from MS analysis showed that as long as these rules are followed, whole sample preparation procedure can be carried out without risk of unwanted contamination at the department. These rules as well as an optimized sample preparation procedure were subsequently applied for the identification of AKR1C3 enzyme obtained by affinity purification from human hepatocytes.

OBSAH

ÚVOD **9**

I. TEORETICKÁ ČÁST **10**

1 BIOTRANSFORMAČNÍ ENZYMY **10**

1.1 Enzymy redukující karbonylovou skupinu 11

2 PROTEOMIKA **13**

2.1 Rozdělení proteomiky 13

2.1.1 Rozdělení proteomiky podle cílů 13

2.1.2 Rozdělení proteomiky podle přístupů 14

2.2 Metody používané v proteomice 15

2.2.1 Základní metody proteomiky 16

2.2.2 Nové metody používané v proteomice 16

3 KONTAMINACE VZORKŮ ZPŮSOBENÁ PROTEINY **19**

3.1 Kontaminace keratiny 19

3.2 Další zavedené proteiny do vzorků 20

4 KLASICKÁ CESTA IDENTIFIKACE PROTEINŮ **21**

4.1 Purifikace proteinů 21

4.1.1 Izolace proteinů 22

4.1.2 Purifikace proteinů chromatografickými metodami 23

4.2 Elektroforéza proteinů 26

4.2.1 Polyakrylamidová elektroforéza 27

4.2.1.1 Nativní polyakrylamidová elektroforéza 28

4.2.1.2 Polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným 29

4.2.1.3 Dvourozměrná elektroforéza 30

4.3 Vizualizace proteinů v gelu 32

4.3.1 Coomassie Brilliant Blue 32

4.3.2 Stříbření 33

4.3.3 Fluorescenční barviva 34
4.4 Redukce a alkylace proteinů 34
4.5 Enzymová hydrolýza proteinů 35
4.6 Hmotnostní spektrometrie 38
4.6.1 Hlavní komponenty hmotnostního spektrometru 39
4.6.1.1 Ionizace laserem za účasti matrice 40
4.6.1.2 Průletový hmotnostní analyzátor 41
4.6.1.3 Detektor 43
4.6.2 Identifikace proteinů z MS dat 44

II. CÍL PRÁCE 45

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 46
5 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ 46
5.1 Chemikálie 46
5.2 Přístrojové vybavení 47
6 EXPERIMENTÁLNÍ POSTUP 48
6.1 Zásady práce přípravy vzorků pro MS analýzu 48
6.2 Příprava rekombinantních enzymů 48
6.3 Purifikace pomocí afinitní chromatografie 49
6.4 SDS – polyakrylamidová gelová elektroforéza 49
6.4.1 Ústav molekulární patologie v Hradci Králové 49
6.4.2 Katedra biochemických věd v Hradci Králové 51
6.5 Enzymatické štěpení proteinu v gelu 54
6.6 Odsolení vzorků 55
6.7 Příprava vzorku před MS analýzou 56

IV. VÝSLEDKOVÁ ČÁST.....57

7 PŘÍTOMNOST KONTAMINUJÍCÍCH LÁTEK VE VZORKU A STANOVENÍ NEJNIŽŠÍHO DETEKČNÍHO LIMITU 57

7.1 SDS-PAGE s komerčně dostupným gelem 57

7.2 SDS-PAGE s ručně připraveným gelem.....58

7.3 Potvrzení nepřítomnosti kontaminujících látek ve vzorku 59

7.4 Vliv barvení CBB-G250 a stříbra na detekci proteinů pomocí MS.....61

8 IDENTIFIKACE PURIFIKOVANÝCH BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ.....65

V. DISKUZE 66

VI. ZÁVĚR 71

VII. SEZNAM ZKRATEK 72

VIII. POUŽITÉ ZDROJE.....73

ÚVOD

Biotransformační enzymy hrají v organismu člověka důležitou úlohu. Podílejí se na metabolisu endogenních látek i xenobiotik. Tyto enzymy jsou také zapojeny do patogeneze různých onemocnění, například diabetu mellitu, karcinom jater nebo mléčné žlázy. Proto je důležité vyhledávat a identifikovat enzymy, které se účastní biochemických procesů a pochopit jejich mechanismus. Vývoj proteomických metod dnes umožňuje takové enzymy separovat a analyzovat. Získané poznatky mohou být využity k lepší diagnostice nemocí, vývoji individuálních léků nebo k cílené léčbě nemocných.

Tato práce je součástí výzkumu na Katedře biochemických věd zaměřeného na izolaci a identifikaci membránově vázaných karbonylreduktas, které se potencionálně účastní metabolismu xenobiotik.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 Biotransformační enzymy

Organismus je otevřený systém, který přijímá ze svého okolí velké množství látek. Většina látek je využita jako zdroj energie nebo jako stavební materiál (živiny, minerály, voda aj.). Do organismu ale vstupují také látky, které jsou tělu „cizí“, tzv. xenobiotika. Xenobiotika zahrnují širokou paletu sloučenin jako jsou např. léčiva, potravinová aditiva, polutanty a produkty průmyslu. Při obraně proti potencionálně škodlivým látkám hrají důležitou roli enzymy metabolizující xenobiotika – transportní proteiny a biotransformační enzymy.

Xenobiotika jsou v organismu přeměněna chemickými reakcemi. Tyto přeměny katalyzují enzymy, ale ve výjimečných případech dochází i k přeměnám neenzymovým. Enzymy mění chemickou strukturu xenobiotika, čímž se omezí jeho vstup do dalších orgánů a tkání, kde by mohlo působit toxicky. Takto vzniklé sloučeniny - metabolity, jsou více hydrofilní a jejich eliminace z těla probíhá rychleji.

Celkem se biotransformace dělí do 3 fází. Cílem první fáze je do struktury xenobiotika vnést nebo odkrýt funkční skupiny. Tato fáze zahrnuje především reakce oxidační, redukční a hydrolytické. Přeměnu xenobiotik oxidační cestou uskutečňují hlavně enzymy z nadrodiny cytochromů P450. Redukční reakce katalyzují především aldoketoreduktasy a dehydrogenasy/reduktasy. Na hydrolytické přeměně xenobiotik se podílejí esterasy, amidasy a peptidasy.

Ve druhé fázi je molekula xenobiotika konjugovaná s molekulou endogenního původu. Dochází tak k výraznému zvýšení rozpustnosti ve vodě a urychlení eliminace xenobiotika z organismu. U člověka jsou nejběžnější konjugace s kyselinou glukuronovou, glutationem nebo aminokyselinami a dále sulfonace, acetylace a methylace.

Třetí fáze byla nedávno označena jako transmembránový přenos z vnitřního prostředí buňky do prostředí vnějšího (Skálová a Boušová, 2011; Vrzal, 2011).

1.1 Enzymy redukující karbonylovou skupinu

Všechny života schopné buňky jsou neustále vystavovány přírodním nebo syntetickým látkám, které obsahují karbonylovou skupinu a ve velké míře určuje i jejich biologickou aktivitu. Jedná se o sloučeniny typu aldehydů, ketonů a chinonů. Redukce karbonylových skupin na příslušné alkoholy hraje důležitou roli v metabolismu jak látek endogenního původu (např. steroidy, prostaglandiny), kde jsou redukční reakce většinou reverzibilní, tak u xenobiotik (např. léčiva, karcinogeny). V případě xenobiotik se jedná o proces jednosměrný z důvodu dobré eliminace nově vzniklé sloučeniny z organismu (Hoffmann a Maser, 2007; Malátková a kol., 2010).

Aldehydy jsou vysoce reaktivní sloučeniny a reagují např. s lipidy nebo DNA, přičemž dochází ke vzniku nebezpečných produktů lipidové peroxidace nebo oxidačního poškození DNA. Naproti tomu ketony představují méně reaktivní sloučeniny a jsou častou složkou mnohých léčiv i endogenních látek (Hoffmann a Maser, 2007).

Enzymy, které jsou schopné redukovat karbonylové sloučeniny, lze zařadit do 3 velkých nadrodin – aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR). Většina dosud popsaných reduktas se nacházejí v rozpustné (cytosolické) formě, avšak v nadrodině SDR bylo identifikováno i několik desítek membránově vázaných členů (Skálová a Boušová, 2011).

Aldo-ketoreduktasy

Proteiny z nadrodiny AKR se nachází u všech organismů. Nejvyšší aktivita byla prokázána v ledvinách a játrech savců, plazů, obojživelníků a ryb. AKR enzymy jsou vesměs monomerní NAD(P)H-dependentní oxidoreduktasy vyskytující se v buňce převážně ve formě cystosolické a jejich velikost se pohybuje mezi 37-42 kDa.

AKR enzymy katalytují jak reakce oxidační tak redukční. K průběhu reakce využívají jako kofaktor nikotinamidadenindinukleotid (NADH) nebo nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH). Kofaktor se v metabolicky aktivních buňkách vyskytuje většinou v redukované formě (NADPH), proto oxidoreduktasy *in vivo* přednostně katalyzují redukční reakce (Barski a kol., 2008).

Zástupci nadrodiny AKR se podílejí na metabolismu velké řady xenobiotik, např. akrolein, daunorubicin, oracin dolasetron, ale důležitou roli také hrají v metabolismu

endogenních látek jako jsou sacharidy, ketosteroidy nebo produkty peroxidace lipidů. Někteří z těchto zástupců jsou zapojeni také do patogeneze různých onemocnění. Např. AKR1A1, AKR1B10 a AKR1C1-3 se podílejí na tabákem indukované karcinogenezi, AKR1B1 na rozvoji diabetických komplikací či chorob spojených se zánětem jako je sepse nebo karcinom tlustého střeva (Skálová a Boušová, 2011; Chen a Zhang, 2012).

Nomenklatura nadrodiny AKR enzymů byla vytvořena na základě sekvenční podobnosti aminokyselin. Obecný formát je následující: AKR symbolizuje nadrodinu, arabská číslice označuje rodinu, písmeno představuje podrodinu a poslední arabská číslice určuje vlastního zástupce (např. AKR1C1). Pro začlenění AKR do rodin, by členové měly mít podobnost aminokyselinové sekvence alespoň ve 40 % a u podrodin v 60 %. Jednotlivé enzymy jsou pak chronologicky číslovány podle zařazení jejich sekvence do systému (A new nomenclature, 2014).

V současnosti je známo 15 rodin AKR enzymů. Dohromady čítají více než 150 proteinů. Mezi těmito proteiny se nachází 15 identifikovaných lidských zástupců, kteří patří do 3 rodin (AKR1, AKR6 a AKR7). Jedná se o AKR1C1 (aldehydreduktasa), AKR1B1, 1B10 a 1B15 (aldosareduktasy), AKR1C1, 1C2, 1C3 a 1C4 (hydroxysteroiddehydrogenasy), AKR1D1 (Δ4-3-ketosteroid-5β-reductasa), AKR1E2 (testis-specifický protein), AKR6A3, 6A5 a 6A9 (Kvβ proteiny), AKR7A2 a 7A3 (aflatoxinreduktasy). U většiny z nich byla redukční aktivita vůči xenobiotikům prokázána (Skálová a Boušová, 2011).

2 Proteomika

Proteomika je vědní obor, který se zabývá studiem proteinů, jejich strukturou, lokalizací, vlastnostmi a funkcí. V organismu je genetická informace vyjádřena pomocí proteinů, které jsou skutečnými funkčními molekulami. Proto může proteomika výrazně přispět k porozumění funkcí genů. Charakterizace lidského proteomu je namáhavá, protože je nutné charakterizovat každý protein kódovaný lidským genomem a porozumět jeho vlastnostem a způsobům regulace.

V roce 1994 australský doktorand Mark Wilkins poprvé použil termín „proteom“, který tvoří základ proteomiky. Proteom je soubor všech proteinů, které jsou přítomné v organismu v určitém okamžiku a za přesně definovaných podmínek. Jedná se o velice dynamický systém, protože odráží aktuální metabolický stav, který se mění v závislosti na stárnutí, nemoci, teplotě nebo prostředí. Jelikož se proteomika zaměřuje přímo na genové produkty, mohou být zjištěny také modifikace proteinů, které nejsou zřejmé ze sekvence nukleotidů v DNA, například jejich isoformy (Collinsová a Jiráček, 2004; Kovářová, 2005).

2.1 Rozdělení proteomiky

Existuje celá řada postupů jak analyzovat proteom ať už z hlediska metodologie, účelu nebo cílů. V následujícím textu budou uvedeny principy pouze vybraných, nejčastěji používaných metod.

2.1.1 Rozdělení proteomiky podle cílů

Proteomika se podle hlavních cílů dělí na analytickou, strukturní, funkční a srovnávací. Hlavním cílem **analytické proteomiky** je identifikovat proteiny včetně stanovení molekulové hmotnosti, sekvence aminokyselin a také určení posttranslačních modifikací. Dále je možné definovat nekovalentní interakce proteinů s jinými látkami nebo kvantitativně stanovit heterogenitu proteinů. Pracovní postup je založen na separaci bílkovin ze složitých biologických směsí s využitím elektroforetických nebo chromatografických metod. Izolované proteiny se následně analyzují pomocí

hmotnostní spektrometrie a získaná data se vyhodnocují pomocí bioinformatiky (Chmelík a kol., 2005).

Strukturní proteomika studuje strukturu jednotlivých proteinů a pomáhá pochopit jejich chování, např. tvorbu a stabilitu nativní konformace. Používá k tomu řadu různých technologií, k základním patří rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance (Structural proteomics, 2014).

Cílem **funkční proteomiky** je zjistit biologické funkce daného proteinu a určit jeho roli v buňce. Ke stanovení funkcí proteinu je důležitá interakce s proteinovými partnery. Je zřejmé, že asociace neznámého proteinu s partnery, kteří patří do specifického proteinového komplexu a podílejí se na konkrétním mechanismu, může hodně naznačit, jakou funkci pravděpodobně bude mít v buňce. Postupy, které se používají ke studiu, zahrnují speciální blokační molekuly, jako jsou například protilátky nebo inhibitory (Monti a kol., 2005).

Proteomika srovnávací porovnává rozdíly v syntéze proteinů. Principem je analýza komplexních směsí bílkovin, která hledá změny ve složení proteinů při různých stavech organismu. Nejčastěji sleduje produkci proteinů u buněk abnormálních, tj. maligních nebo stimulovanými léčbou drogové závislosti, a srovnává je s buňkami normálními. Další využití srovnávací proteomiky je například hledání biomarkerů patologických procesů. Běžně používanými metodami jsou dvourozměrná polyakrylamidová elektroforéza a hmotnostní spektrometrie. V dnešní době jsou nicméně stále více upřednostňovány techniky s duálními fluorescenčními značkami nebo se stabilními izotopy (Pandey a Mann, 2000; Monti a kol., 2005).

2.1.2 Rozdělení proteomiky podle přístupů

Proteomiku lze rozdělit nejen podle cílů, ale i podle přístupu (strategie), kterým se analyzuje proteom. Toto rozdělění proteomiky není jednoduché, protože jednotlivé přístupy se mohou vzájemně kombinovat.

Bottom-up proteomika představuje klasický postup identifikace proteinů. Přístup nejprve zahrnuje izolaci proteinů a jejich enzymatické štěpení na proteinové fragmenty – peptidy. Tyto peptidy jsou následně analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Získané údaje z hmotnostního spektra peptidů jsou porovnávány se sekvenčními databázemi (Chmelík a kol., 2005).

Shotgun proteomika je dnes vnímána jako nejperspektivnější přístup, který využívá hmotnostní spektrometrii k identifikaci a kvantifikaci proteinů. Liší se od bottom-up proteomiky v tom, kdy je použito štěpení enzymem. V případě shotgun postupu je komplexní směs proteinů nejprve rozštěpena enzymem na peptidy a až takto připravený vzorek je podroben LC-MS/MS analýze. Obsažené proteiny jsou následně identifikovány pomocí vyhodnocovacího softwaru na základě získaných fragmentačních spekter (Zhang a kol., 2013).

Jelikož proteomický přístup bottom-up obtížně provádí podrobnou charakteristiku proteinu, zvláště určování posttranslačních modifikací, byla vytvořena nová strategie analýzy nazývaná **Top-down**. Postup umožňuje identifikovat celé (intaktní) proteiny bez počátečního enzymatického štěpení. Proteiny o velikosti 11 až 21 kDa jsou nejprve ze směsi izolovány a poté v hmotnostním spektrometru fragmentovány a následně charakterizovány. I tento přístup má nicméně jistá omezení, zejména v oblasti frakcionace z komplexních směsí, ionizací a fragmentací proteinových iontů v plynné fázi (Kelleher, 2004; Breuker a kol., 2008).

Přístup zvaný **middle-down** kombinuje bottom-up a top-down proteomiku. Stejně jako v bottom-up proteomice jsou proteiny před vlastní analýzou enzymatiky štěpeny. Získné polypeptidy o velikosti 3 až 9 kDa se následně fragmentují a nalyzují pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Díky dostatečně velikosti naštěpených polypeptidů je možné získat informace o posttranslačním modifikacích, aniž by byla analýza omezená jako v případě top-down přístupu. Middle-down přístup byl aplikován na proteinech získaných z bakterií, kvasinek a dokonce i lidských buněk. Z provedených experimentů je pravděpodobné, že se v budoucnu tato strategie stane velmi populární při identifikaci biomarkerů a lepší charakterizaci rekombinantních proteinů nebo makromolekulárních léčiv (Kelleher, 2004; Moradian a kol., 2014).

2.2 Metody používané v proteomice

Existuje celá řada analytických metod, které jsou v proteomice používány. Tyto metody jsou v praxi často vzájemně kombinovány a opakovány, což umožňuje analyzovat proteiny z velmi komplexních směsí a získat tak dostatečné množství relevantních dat pro přesné popsání proteomu.

2.2.1 Základní metody proteomiky

Základními pilíři proteomické analýzy jsou metody separační a hmotnostně spektrometrické. Ze separačních metod se upřednostňuje elektroforéza a chromatografie, které mají za úkol oddělit jednotlivé proteiny z komplexních směsí. Identifikaci a kvantifikaci stovek či tisíců proteinů nebo peptidů v jednom experimentu umožňuje hmotnostní spektrometrie (Petrák, 2012).

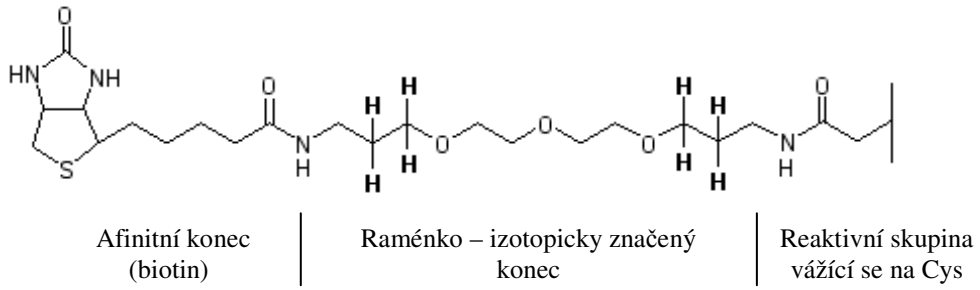
Více informací o výše napsaných metodách je uvedeno v kapitole Klasická cesta identifikace proteinů (viz s. 21).

2.2.2 Nové metody používané v proteomice

S rozvojem analytické instrumentce a metodických přístupů se v proteomice průběžně zavádějí nové metody nezávislé na gelové elektroforéze, jenž rozšířily možnosti studia proteomu. Důvodem bylo zjištění, že technikami kombinující 2-DE s MS nelze detekovat, identifikovat a kvantifikovat všechny proteiny přítomné ve vzorku. Jedná se například o metodu vícerozměrné proteinové identifikace (MudPIT) nebo techniky využívající izotopové značení, např. ICAT (Collinsová a Jiráček, 2004).

Metoda **MudPIT** vychází z vícerozměrné kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Proteiny jsou enzymově štěpeny na peptidy a separovány dvou- či vícerozměrnou kapalinovou chromatografií. V prvním rozměru jsou peptidy obvykle děleny na základě náboje na katexové koloně a v rozměru druhém jsou rozděleny na koloně s reverzní fází podle hydrofobicity. Eluované peptidy jsou následně identifikovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. MudPIT umožňuje rychlou a simultánní separaci a identifikaci proteinů či peptidů z komplexních směsí, včetně proteinů vzácných. Například analýzou celého proteomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo možné detekovat a identifikovat téměř 1500 proteinů, což je 5x více než při použití 2-DE s MS. V oblasti hematologie byla MudPIT využita při charakterizaci proteinů krevních destiček v souvislosti s aterosklerotickým poškozením (Collinsová a Jiráček, 2004; Tomancová a kol., 2009).

Izotopové značky používané v technice **ICAT** obsahují raménka s lehkým nebo těžkým řetězcem, který se liší přítomností izotopu např. ^{2}H. Na konci značky je umístěn biotin pro dobré rozpoznání značených proteinů afinitní chromatografií (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma izotopové značky používané v ICAT.
(Tomancová a kol., 2009)

Princip ICAT je založen na označení dvou vzorků (zdravá a nemocná tkáň) buď lehkou nebo těžkou variantou značky, jenž se kovalentně váží na cysteinové zbytky proteinu. Takto označené proteinové vzorky jsou smíchány a enzymově naštěpeny. Před vlastní MS analýzou jsou značené peptidy odděleny od neznačených pomocí streptavidin afinitní chromatografe. Na základě odlišné molekulové hmotnosti použitých variant značek jsou analyzované peptidy v hmotnostním spektru snadno odlišitelné a kvantifikovatelné podle poměru intenzit signálu. Jelikož technika ICAT využívá separaci pomocí kapalinové chromatografie, může být na rozdíl od metod elektroforetických úspěšně použita ke kvantifikaci proteinů s extrémním pH nebo proteinů membránových. Nevýhodou metody je neschopnost značek vázat se na proteiny, které neobsahují cysteinové zbytky, což na druhé straně snižuje komplexitu vzorků. Technika ICAT byla použita například v oblasti onkologie Pawlikem (2006) k identifikaci tumor specifických proteinů, které byly získány z aspirátů prsních bradavek žen v časném stádiu karcinomu prsu (Collinsová a Jiráček, 2004; Tomancová a kol., 2009).

Úsilí o vytvoření metod pro analýzu genové exprese, které by nebyly závislé na složitých separačních krocích, vyústilo ve vývoj **proteinových čipů**. Tyto čipy se zdají být novou, nadějnou a vysoce kapacitní technikou pro studium proteinů s minimálním množstvím vstupního materiálu a s relativně nízkým požadavkem na čistotu vzorku. Technika, která kombinuje proteinové čipy s MS, je známá jako SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization). Principem metody je interakce proteinů s povrchem čipu. Na takovém čipu jsou přítomné terčíky s různými chemickými (např. iontové nebo hydrofobní) či biochemickými (např. protilátka, receptor) povrchy.

Interakce jsou založeny na adsorpci, elektrostatické interakci nebo afinitní chromatografii. Tyto čipy nacházení uplatnění ve vyhledávání nových biomerkerů různých onemocnění, které jsou přítomné v tělních tekutinách (Seibert a kol., 2004; Češková a kol., 2006).

3 Kontaminace vzorků způsobená proteiny

Technologický vývoj přinesl za posledních 100 let obrovské pokroky jak v metodách separačních, tak i v detekčních. Jakákoliv separace a detekce proteinů ale umožňuje neúmyslné vnesení kontaminantů do vzorků, jenž mohou potencionálně ovlivnit MS analýzu. Velkým problémem jsou většinou proteiny, které nepocházejí z původních vzorků, ale jsou do nich zavedeny záměrně anebo nechtěně. Jedná se například o keratiny nebo proteolytické enzymy (Keller a kol., 2008).

3.1 Kontaminace keratiny

Keratiny se řadí do skupiny skleroproteinů podílejících se na výstavbě intermediárních filament cytoskeletu epitelových tkání a to zejména vlasů, chlupů, nehtů. Ve vrchní vrstvě kůže v průběhu keratinizace vzniká velké množství keratinů, které se odlupují a váží na vláknité nebo prachové částice (Keratin, 2014).

Kontaminace vzorků keratiny negativně zasahuje do MS analýz. Jelikož jsou keratiny proteinového původu, hmotnostní spektrometr je schopen keratiny analyzovat a identifikovat. Záleží pouze na poměrném zastoupení proteinů zájmu a keratinů ve vzorku. Pokud jsou keratiny v koncentraci vyšší než je protein zájmu, tak do MS analýzy velice zasahují, protože keratiny často protein zájmu v hmotnostním spektru překrývají. V opačném případě, kdy je koncentrace proteinů zájmu vyšší, nebývají keratiny v MS analýze problémem. Další možností je, že poměr keratinů a proteinů zájmu je ve vzorku skoro stejný. V tomto případě keratiny do MS analýzy zasahovat více či méně můžou a jistě budou identifikovány.

Hlavním zdrojem keratinů je člověk, dalším zdrojem jsou prachové částice. Ke kontaminaci vzorků může dojít kdykoliv během experimentu, ale hlavně k němu dochází při práci s gelem. Před přípravou vzorků k elektroforéze a po enzymatickém štěpení proteinů v gelu je riziko kontaminace nižší.

K zamezení kontaminace keratiny je důležité pracovat v tzv. bezkeratinovém prostředí. Vytvoření takového prostředí je možné několika kroky. Základním opatřením je snížit množství prachu v laboratoři, na přístrojích a laboratorním skle. Nutné je i minimalizovat riziko kontaminace z oblečení (pláště), které může mít na sobě značné

množství prachových částic. Osoba pracující se vzorky by neměla používat latexové rukavice, protože přírodní kaučuk obsahuje významné množství keratinů a dalších proteinových materiálů. Neméně důležitá je také délka expozice vzorků a gelů s pracující osobou (Biringer, 2002).

3.2 Další zavedené proteiny do vzorků

Proteolytické enzymy, které jsou používané pro přípravu vzorku před MS analýzou, mohou analýzu potencionálně rušit. V ideálním případě je vzorek proteinů ve velkém přebytku, takže potencionální rušení enzymy je minimální. Dnešní moderní MS metody jsou založeny převážně na identifikaci nízkých koncentrací vzorků (ng). V těchto případech jsou poměry protein-enzym často obrácené a potenciální interference jsou významné. Pro minimalizaci interferencí je třeba optimalizovat podmínky enzymatického štěpení proteinů v gelu a používat proteolytické enzymy vysoké čistoty.

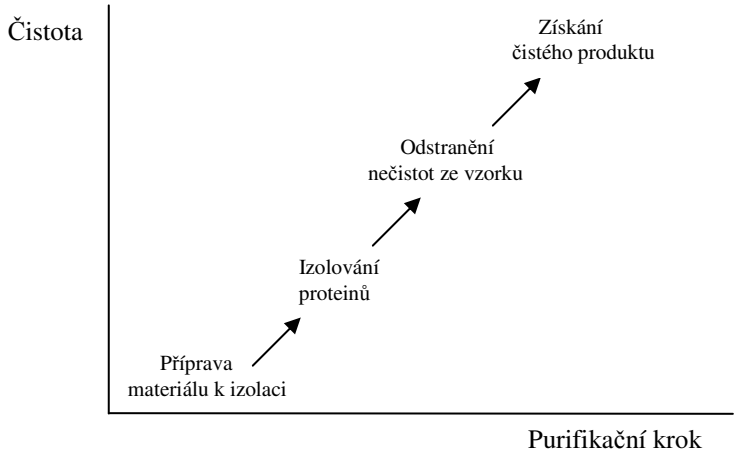
MS analýzu může ovlivnit i řada dalších proteinů, pokud nejsou odstraněny ze vzorku. Příkladem je hovězí sérový albumin (BSA) běžně používaný v imunodetekčních metodách, nebo protilátky, které jsou v imunoprecipitačních roztocích přítomny ve velkém nadbytku a v případě jejich nedostatečné eliminace znemožňují analýzu proteinů zájmu (Keller a kol., 2008).

4 Klasická cesta identifikace proteinů

4.1 Purifikace proteinů

Proteiny, na které je zaměřena pozornost, je třeba nejprve izolovat z biologické tkáně nebo buněčné kultury a poté purifikovat. Purifikačním cílem je získání co nejčistšího biologicky aktivního proteinu v co nejvyšší možné koncentraci.

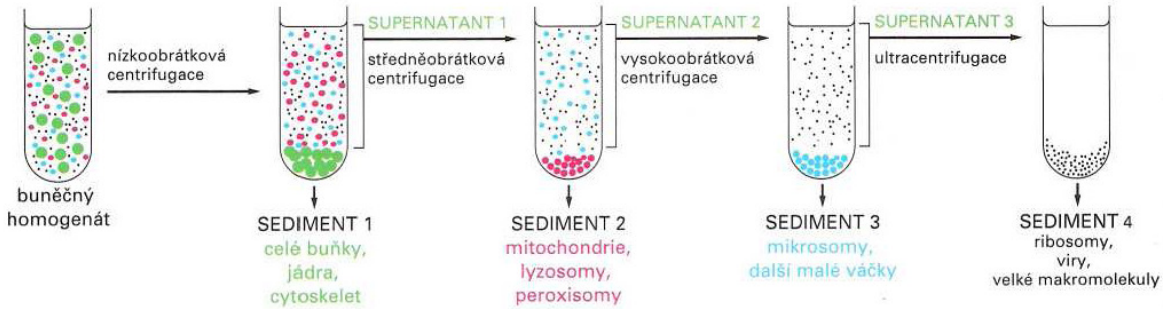
Před zahájením vlastního procesu je nutné si stanovit požadavky a cíle purifikace. K hlavním cílům patří definování požadované čistoty, aktivity a množství cílového proteinu. Pro dosažení vysoké úrovně čistoty, je někdy potřebné použít více purifikačních kroků, ale větší počet purifikačních kroků však často vede k úbytku produktu, purifikace se časově prodlužuje a v neposlední řadě může docházet ke ztrátě biologické aktivity proteinu. Proto je nutné volit metody s co nejvyšší výtěžností. V praxi se používá purifikace dvou- nebo tří-kroková (Obr. 2). V dnešní době je k volbě vhodného purifikačního postupu možné využít počítačových algoritmů, které jsou schopné vybrat nejefektivnější metody separace na základě fyzikálně-chemických vlastností vzorku a predikci koncentrace cílového produktu a kontaminantů po jednotlivých purifikačních krocích (Asenjo a Andrews, 2008; Protein purification strategies, 2014).



Obr. 2: Purifikační strategie.
(Protein purification strategies, 2014)

4.1.1 Izolace proteinů

Zásadním krokem izolace proteinů z tkání je rozbití buněk pomocí jemných mechanických postupů (homogenizace), což zapříčiní rozrušení plasmatické membrány a úniku obsahu buňky do okolního prostředí. K rozbití buněk může docházet několika způsoby, a to pomocí ultrazvuku či rotačního pístu nebo protlačením buněk malým otvorem. K dezintegraci buněčné stěny a membrány u mikroorganismů se navíc používá detergentů nebo enzymů. Při opatrné homogenizaci vzniká hustý homogenát či extrakt obsahující molekuly velké i malé (např. ribosomy, enzymy, membránou uzavřené vakuoly aj.) v téměř neporušeném stavu. Jednoduchý a častý postup, jak následně separovat buněčný homogenát na různé frakce, je centrifugace. Za zmínku například stojí frakční centrifugace, která probíhá opakovaně při stále vyšších rychlostech a odděluje buněčné složky podle velikosti a hustoty částic. Při centrifugaci jsou komponenty větší a těžší méně zadržovány interakcí s molekulami rozpouštědla, proto se pohybují rychleji a tvoří na dně zkumavky sediment. Lehčí a menší složky zůstávají v suspenzi neboli supernatantu (Obr. 3). Získané směsi jsou dále frakciovány pomocí separačních technik (viz s. 23) (Alberts a kol., 2005; Kaš a kol., 2008).



Obr. 3: Princip frakční centrifugace.
(Alberts a kol., 2006)

Některé proteiny se z biologického matriálu neizolují snadno. Příkladem jsou membránové proteiny. Membránové proteiny jsou většinou přítomny v nízkých koncentracích, proto často dochází k jejich nedostatečné izolaci v požadovaném množství. Z tohoto důvodu se většinou přistupuje k přípravě těchto proteinů klonováním (produkce rekombinantních proteinů) nebo je k izolaci použito specifických

postupů, např. afinitní chromatografie. Dalším problémem je izolace integrální proteinů, neboť jsou ve fofolipidové dvouvrstvě ukotveny kovalentně. Proto je nutné k jejich uvolnění do vodného roztoku vložit ještě jeden purifikační krok, kterým je většinou solubilizace buněčných membrán pomocí detergentů. (Collinsová a Jiráček, 2004; Smith, 2011).

Rekombinantní proteiny vznikají procesem, při němž se pomocí různých expresních systémů dá vytvořit protein odvozený od konkrétného genu či jeho části. Protein je z produkujícího organismu následně izolován a purifikován. Izolace proteinu je snadnější, pokud expresní buňky produkují jeho sekreční variantu. V případě vytvoření cytoplasmatického proteinu je nutné přidat ještě lyzační krok k uvolnění obsahu buněk do roztoku. U proteinů, které byly syntetizovány v *E. coli*, je nežádoucí jejich tvorba ve formě inkluzních tělísek. Jedná se o proteiny agregované do nesprávné konformace. Při jejich izolaci je proto nutné tyto tělíska solubilizovat, proteiny denaturovat a poté renaturovat, aby získaly konformaci správnou. Tento proces poskytuje převážně proteiny o vysoké čistotě, ale renaturace je problematická a nemusí být vždy úspěšná. Problém s inkluzními tělísky lze vyřešit připojením sekreční značky, která vznikající protein směřuje do periplasmatického prostoru nebo do kultivačního média (Mergulhao a kol., 2005; Exprese rekombinantních proteinů, 2014).

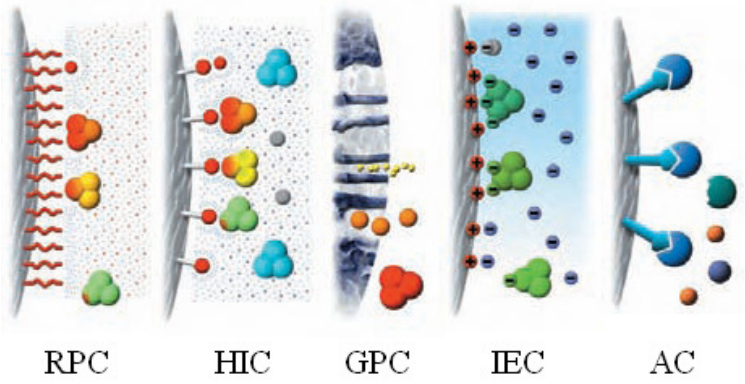
4.1.2 Purifikace proteinů chromatografickými metodami

Komplexní biologické směsi je potřeba rozdělit pomocí separačních technik na jednotlivé složky, jelikož jen čisté proteiny lze detailně charakterizovat. Při separačním procesu dochází k odstranění nežádoucích komponent směsi a k získání koncentrovaného produktu.

Obecným principem chromatografických metod je nestejnoměrné rozdělování komplexní směsi mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází při průchodu chromatografickou kolonou. Směs molekul je unášena mobilní fází a jednotlivé složky jsou poutány ke stacionární fázi nekovalentními interakcemi. Složky vykazující silnější interakce s mobilní fází budou vymývány (eluovány) rychleji než ty, jenž mají silnější interakce s fází stacionární.

Zatímco mobilní fáze může být buď kapalina nebo plyn, fáze stacionární může mít formu různorodou. Většinou se jedná o látku pevnou nebo o film kapaliny, který je zakotvený na pevné látce (Králová a kol., 2008).

Dělění chromatografických metod je založené na dělení komplexní směsi podle fyzikálně-chemických vlastností cílových molekul. Pro účely purifikace se běžně využívají chromatografie v systému obracených fází (RPC) a s hydrofobní interakcí (HIC), které molekuly dělí podle jejich polarity. Separaci na základě velikosti a tvaru molekul uskutečňuje gelově permeační chromatografie (GPC). Iontově měničová chromatografie (IEC) dělí molekuly dle velikosti náboje a separace molekul vazbou na specifický ligand je principem chromatografie afinitní (AC) (Obr. 4) (Affinity chromatography, 2002; Králová a kol., 2008).



Obr. 4: Principy chromatografického dělení látek používaných k purifikaci proteinů.
(Affinity chromatography, 2002)

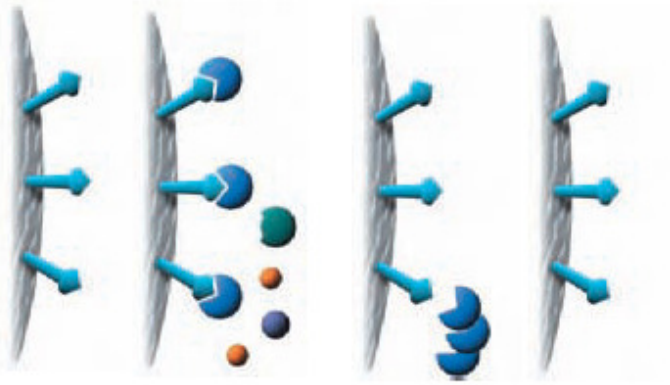
Prvním krokem purifikačního procesu je často afinitní chromatografie, neboť umožňuje získat produkt o poměrně vysoké čistotě a zároveň ho také zakoncentruje. Pokud tato chromatografie neposkytuje dostatečně čistý produkt, přistupuje se k dalšímu kroku čistění a to pomocí jiné chromatografické metody, např. iontově měničové nebo gelově permeační chromatografie (Affinity chromatography, 2002).

V následujícím textu je pozornost věnovaná pouze afinitní chromatografii.

Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie, také nazývaná jako bioselektivní adsorpce, je založená na specifických a reverzibilních interakcích (molekulovém rozpoznávání) mezi biomolekulou a ligandem, např. enzym-substrát, enzym-inhibitor, antigen-protilátka, hormon-receptor apod. Tvorbu biospecifických komplexů zajišťují tzv. nekovalentní interakce - van der Walsovy síly, hydrofobní interakce, vodíkové můstky aj. Dělení na afinitní koloně začíná nanesením vzorku na kolonu. K imobilizovanému ligandu se

adsorbují pouze molekuly žádané a ostatní makromolekuly a kontaminanty jsou postupující mobilní fází unášeny z kolony. Následnou změnou ve složení mobilní fáze jsou navázané molekuly uvolněny z vazby na ligand (Obr. 5) (Hedhammar a kol., 2010).



Obr. 5: Princip afinitní chromatografie.
(Affinity chromatography, 2002)

Stacionární fází afinitní chromatografie je obvykle pevný nosič s kovalentně navázaným specifickým ligandem. Jako nosiče se používají stabilní hydrofilní makroporézní nebo neporézní matrice, které musí splňovat jistá kritéria. Hlavními kritérii takové matrice jsou tepelná, mechanická, chemická stabilita a matrice by měla co nejméně interagovat s analytem. Dalšími požadavky při volbě vhodného nosiče jsou dostatečná permeabilita, velký specifický povrch nebo rezistence k enzymovému a mikrobakteriálnímu napadení. Nosič musí také obsahovat velké množství chemických skupin, které po jejich aktivaci například bromkyanem či divinylsulfonem umožní připojení ligandu. V afinitní chromatografii jsou populárními nosiči silikagel, agaróza, polyakrylamid aj.

Pro úspěšnou separaci je důležitý výběr vhodného ligandu. Ligandy se dělí na monospecifické (např. steroidní hormony, receptory) nebo skupinově vázané (např. protein G). Vazba mezi biomolekulou a ligandem musí být dostatečná, aby nedošlo k předčasné eluci cílových molekul, ale nesmí být ani moc silná, neboť by uskutečněná vazba eluci znemožnila. Mezi často používané ligandy se řadí enzymy, inhibitory enzymů, receptory, protilátky, lektiny nebo nukleové kyseliny, ale jejich aplikace je omezena vysokou cenou či jejich relativní nestabilitou. Z tohoto důvodu je dnes snaha nahradit tyto přírodní ligandy syntetickými, jako jsou barviva nebo deriváty

kyseliny borité, které ale obvykle vykazují skupinovou selektivitu a interagují s různými proteiny současně (Vařilová, 2005; Hedhammar a kol., 2010).

Desorpce reverzibilně navázaných molekul na ligand nosiče se provádí elucí. Eluce by měla být šetrná, aby nedošlo k deaktivaci funkce proteinu nebo degradaci matrice. Eluce je možná několika způsoby a to buď specificky nebo nespecificky. Při specifické eluci je molekula z vazby na ligand uvolněna pomocí jiné molekuly, která má vyšší afinitu k ligandu nebo k analytu. Tento způsob eluce bývá efektivnější a šetrnější k uvolněným molekulám. Na druhou stranu se jedná o proces poměrně drahý, protože jinými molekulami jsou často vzácné bioligandy a je nutné je přidávat ve vyšší koncentraci, aby byly schopné se v kompetitivním procesu prosadit. Při nespecifické eluci je vazba mezi ligandem a separovanou molekulou rozrušena například změnou pH nebo iontové síly elučního pufru. Působením pufru se změní struktura ligandu nebo separované látky a komplex se rozpadne. Po eluci změnou pH elučního pufru je někdy nutné neutralizovat pH získané frakce, aby se niminalizovalo riziko denaturace bílkovin (Vařilová, 2005; Králová a kol., 2008; Hedhammar a kol., 2010).

4.2 Elektroforéza proteinů

Elektroforéza je základním technikou proteomiky. Ferdinand Friedrich Reuss už v roce 1807 pomocí voltova článku popsal posun molekul vody v elektrickém poli k negativními pólu a také přesun částic jílu v elektrickém poli. O více než 100 let později se elektromigrační metody dočkaly zásadního pokroku díky práci Arneho Tiselia, který dokázal v roztoku mezi elektrodami separovat sérové proteiny a opticky sledovat pohyblivé rozhraní jednotlivých molekul (Petrák, 2012).

Obecný princip elektroforetických metod je založen na pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Částice jsou hnány gradientem elektrického pole mezi dvěma elektrodami směrem k elektrodě opačného znaménka. Při průchodu médiem jsou částice vystaveny odporu sil vnitřního tření, které tyto částice brzdí. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku (Králová a kol., 2008).

K separaci proteinů se používá řada elektroforéz, jež se liší jak principy separace, tak informacemi, které mohou o proteinech poskytnout. V praxi jsou často používáné gelové elektroforézy jako například nativní polyakrylamidová elektroforéza (PAGE),

polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) nebo dvourozměrná elektroforéza (2-DE) (Hayworth, 2014).

4.2.1 Polyakrylamidová elektroforéza

Polyakrylamidová elektroforéza se řadí do skupiny zónových elektroforéz, které probíhají na nosičích, v tomto případě na gelu. Gel vzniká polymerací akrylamidu a bisakrylamidu (N,N'- methylenbisakrylamid), jenž umožňuje zesíťení lineárních vláken a vytvoření prostorové struktury. Polymerace je zahájena volnými radikály, které vznikají rozkladem persíranu amonného. Do směsi je vždy přidáván stabilizátor volných radikálů N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED). Vzniklý polyakrylamidový gel vykazuje několik výhodných vlastností. Je intertní, mechanicky odolný, transparentní a nabízí možnost přípravy s nastavenými parametry jako je hustota zesítění gelu a gradient hustoty gelu (Peč a kol., 2008; Hayworth, 2014).

Elektroforéza probíhá ve speciálních nádobách naplněných pufrem, do kterých se nosič se vzorky umístí mezi dvě elektrody, mezi nimiž prochází stejnosměrný proud. Uspořádání elektroforézy je buď v trubičkách nebo plošné, tj. mezi deskami. Plošné uspořádání vykazuje vyšší citlivost oproti uspořádaní v trubičkách a také lze na jednu desku nanést více vzorků. Jistou nevýhodou plošného uspořádání je, že vyžaduje určitou zkušenost, příprava gelů je náročná a v případě koupených komerčních gelů se jedná o jistou finanční zátěž (Králová a kol., 2008).

Zásadní dělení elektroforetických technik využívajících polyakrylamidový gel není podle typu nebo tvaru gelu, ale zda je uskutečněna v kontinuálním či diskontinuálním systému. Diskontinuita může být jak v koncentracích gelu, tak hlavně v pH a iontové síle. U jednoduchých kontinuálních systémů je nevýhodou vyšší stupeň difúze, který je výrazný u menších a rychle se pohybujících molekul. Proto je nutné nanášet na start velmi malý objem koncentrovaného vzorku, aby se dosáhlo dobrého elektroforetického rozlišení i u rychleji pohybujících se zón. Problém vyřešil diskontinuální systémem, pomocí kterého je možné získat velmi ostré zóny. Diskontinuální systém využívá dva gely s různě velkými póry (separační a zaostřovací) a pufry o různém pH (6,8 a 8,3). Zaostřovací gel s velkými póry přijde do styku s dělenou směsí jako první. Uplatňuje se zde tzv. samozaostřující efekt. Tento efekt způsobí, že zpožďující se iont za zónou odpovídající jeho příslušné pohyblivosti se urychlí, aby dohnal „svou“ zónu. Totéž se děje i v opačném případě, kdy je iont

rychlejší. Při vstupu iontů do separačního gelu se jejich pohyb zpomalý a ionty v podobě velmi úzkých zón v gelu jsou seřazeny podle svých pohyblivostí (Králová a kol., 2008, Peč a kol., 2008).

4.2.1.1 Nativní polyakrylamidová elektroforéza

Při nativní PAGE se vedle elektroforetické pohyblivosti uplatňuje navíc princip molekulového síta, neboť různě velké částice procházejí skrz póry v gelu různou rychlostí. K elektroforetické migraci dochází, protože většina proteinů v alkalickém prostředí pufru nese negativní náboj. Čím vyšší je hustota negativního náboje, tím rychleji proteiny budou migrovat. Pohyb proteinů se ale v gelu zpomalí v závislosti na jejich velikosti a tvaru, neboť velké molekuly oproti malým obtížněji pronikají gelem (Králová a kol., 2008; Hayworth, 2014).

Pomocí nativní elektroforézy se dají separovat proteiny o velikosti 5-2000 kDa, přičemž záleží na velikosti pórů v gelu. Velikost pórů závisí nepřímo úměrně na koncentraci akrylamidu, např. 7% polyakrylamidový gel má větší póry než 12%. Gel s menší densitou akrylamidu se používá k separaci proteinů o vysoké hmotnosti, naopak gel s vysokou hustotou akrylamidu umožňuje separovat proteiny o malé molekulové hmotnosti. Koncentrace akrylamidu je většinou 3-15% a koncentrace bisakrylamidu nejčastěji odpovídá 5 % celkové koncentrace akrylamidu (Hayworth, 2014; Polyacrylamide gel electrophoresis, 2014).

Hlavní předností nativní elektroforézy je, že nepoužívá žádné denaturační činidla, proto jsou interakce v rámci multimerních komplexů zachovány. Toho se dá využít k získání informací o struktuře proteinu. Tato elektroforéza se také uplatňuje v detekci enzymové aktivity proteinu, stanovení isoenzymových spekter proteinu nebo k separaci biologicky aktivních molekul (Peč a kol., 2008; Hayworth, 2014).

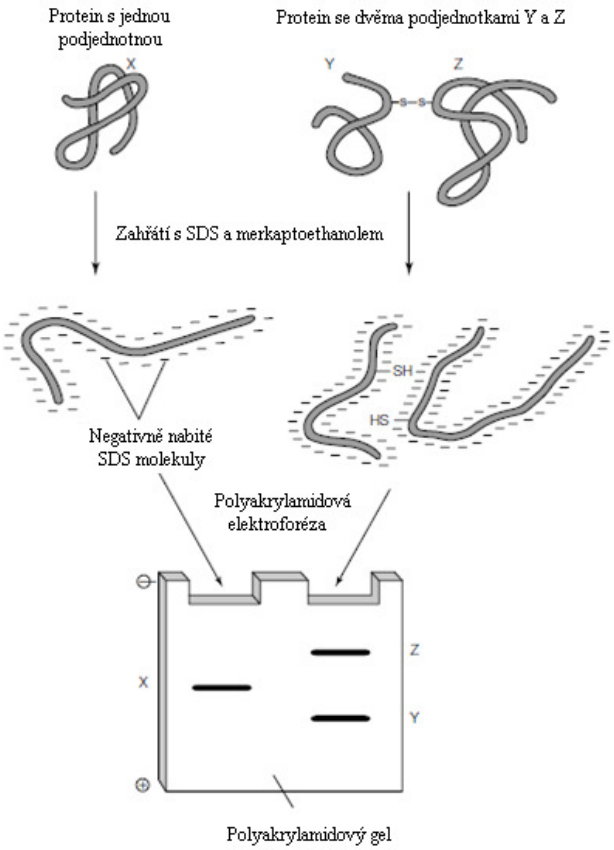
Nedostatkem nativní elektroforézy a všeobecně všech polyakrylmidových elektroforéz je fakt, že příprava a manipulace s gelem je náročná, neboť akrylamid a bisakrylamid je toxický. Také je nelze snadno automatizovat, ale i přes své nedostatky stále zůstávají ztěžejní součástí proteomiky (Polyacrylamide gel electrophoresis, 2014).

4.2.1.2 Polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným

SDS-PAGE je hojně využívanou metodou pro proteomické účely, která probíhá ve formě 1-D elektroforézy nebo je v kombinaci s izoelektrickou fokusací. Běžně se používá ke separaci proteinů s molekulovými hmotnostmi od 10 do 300 kDa (Graves a Haystead, 2002).

SDS-PAGE vznikla spojením polyakrylamidové elektroforézy s diskontinuálním systémem (Petrák, 2012). Tato metoda vyžaduje, aby byly proteiny redukovány (SDS a 2-mercaptoethanol) před nanesením na gel. Protein vazbou s molekulami SDS získá vysoký negativní náboj, který je úměrný jeho hmotnosti. Dáno je to tím, že proteiny váží asi 1,4 g SDS na 1 g proteinu. Také se pomocí SDS sjednocuje konformace proteinu do té míry, že relativní molekulová hmotnost proteinu odpovídá velikosti komplexu s SDS. Tím se eliminuje vliv tvaru proteinu na jeho pohyblivost. Aby komplexy protein-SDS vznikly, je důležité také rozštěpit disulfidové můstky mezi řetězci proteinů pomocí redukčního činidla. Denaturace proteinů je dokončena varem. Po úpravě proteiny získají jednotný tvar a mají stejnou hustotu povrchového náboje. Proteiny se následně separují na základě jedné vlastnosti, kterou je molekulová hmotnost. Po vizualizaci separovaných proteinů se dá určit jejich relativní molekulová hmotnost srovnáním dráhy migrace se standardem o známé molekulové hmotnosti (Obr. 6) (Peč a kol., 2008; SDS, 2009).

SDS-PAGE se vyznačuje snadnou reprodukovatelností a podle způsobu detekce proteinů i dobrou citlivostí (Graves a Haystead, 2002). Nevýhodou této elektroforézy je fakt, že vazba SDS na protein vyvolá ve většině případů ztrátu biologické aktivity, proto například enzymy po proběhlé elektroforéze již není možné na základě jejich aktivity prokázat (Králová a kol., 2008).

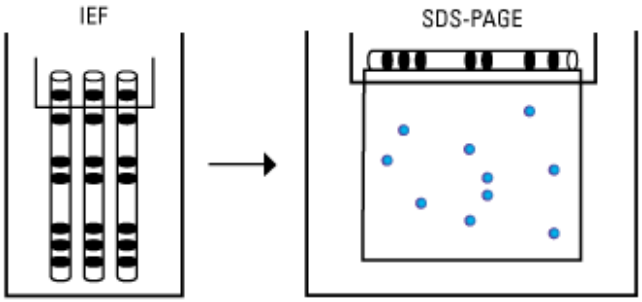


Obr. 6: Princip separace proteinů SDS-PAGE.
(Electrophoresis of proteins, 2014)

4.2.1.3 Dvourozměrná elektroforéza

V roce 1975 se několika týmům podařilo zkombinovat izoelektrickou fokusaci a polyakrylamidovou elektroforézu v jednu metodu a tím zásadně zvýšit rozlišení separace. Dvourozměrná elektroforéza (2-DE) umožnila první pokusy o zmapování proteomu a v devadesátých letech odstartovala nástup proteomiky (Petrák, 2012).

Metoda vychází z principů dvou elektroforetických metod. V prvním rozměru probíhá izoelektrická fokusace (IEF). Při ní jsou rozpuštěné a denaturované proteiny separovány v proužku polyakrylamidového gelu s imobilizovaným gradientem pH podle svých izoelektrických bodů (pI). V druhém rozměru je tento proužek gelu obsahující separované proteiny z předchozího kroku přiložen kolmo k polyakrylamidovému gelu. Tyto proteiny jsou dále separovány technikou SDS-PAGE podle svých relativních molekulových hmotností (Obr. 7) (Righetti, 2004).



Obr. 7: Princip separace dvourozměrnou elektroforézou
(Hayworth, 2014)

Dvourozměrná elektroforéza je vhodná k dělení komplexnějších směsí proteinů před jejich identifikací pomocí MS. Pomocí 2-DE lze separovat v ideálním případě až několik tisíc proteinů, ale bez předcházející vícestupňové frakcionace, lze zobrazit pouze proteiny nejhojnější. Například u typické savčí buňky se dají zobrazit jen ty proteiny, které se vyskytují v řádu desítek tisíc kopií. Další nevýhodou metody je, že není vhodná pro velké proteiny nad 150 kDa a ani malé do 15 kDa. Nehodí se ani pro proteiny s extrémním izoelektrickým bodem. Limitující je i její instrumentální náročnost, která komplikuje automatizaci a analýzu velkého počtu vzorků. Další slabostí 2-DE je její časová náročnost a pracnost celého procesu, protože metoda vyžaduje dovednosti a zručnost pro tvorbu kvantitativně a prostorově reprodukovatelných gelů. Na druhou stranu 2-DE uchovává informaci o posttranslačních modifikacích a také o jednotlivých variantách určitého proteinu, jenž se liší velikostí nebo nábojem (Wilkins a kol., 1998; Gygi a kol., 2000).

Primárně je 2-DE stále používána k profilování syntetizovaného proteinu a proteomickému mapování buňky, organel či mikroorganismů. Při profilování syntézy proteinů je výhoda 2-DE v porovnání několika vzorků jak kvantitativně, tak kvalitativně. Objevení nebo ztráta skvrn na gelu může informovat o rozdílné syntéze proteinu a intenzita těchto skvrn může poskytnout kvantitativní údaj o úrovni syntézy proteinu. Další využití 2-DE je k zachycení proteinů, ve kterých se vyskytla určitá varianta posttranslační modifikace, jelikož mnohé modifikace ovlivňují pI a molekulové hmotnosti (Graves a Haystead, 2002).

4.3 Vizualizace proteinů v gelu

Pro vizualizaci proteinů po proběhlé elektroforéze je v široké míře používáno barvení pomocí koloidního Coomassie Brilliant Blue, stříbření a fluorescenční barvy. Metody barvení se od sebe odlišují nejen svými principy a náročnosti provedení, ale i detekčními limity a lineárním rozsahem (Tab. 1) (Gauci a kol., 2011).

Tab. 1: Běžně používaná barviva pro vizualizaci proteinů po elektroforetické separaci.
(Miller a kol., 2006; Granvogl a kol., 2007)

Barvivo	Inkubační doba (h)	Detekční limit (ng)	Lineární rozsah (řádově)	Kompatibilita s MS
CBB R-250	12 - 48	30 - 100	1-1,3	+
CBB G-250 koloidní	15	1 - 16	1-1,3	+
Stříbření	0,25 - 3	0,5	1-2	+
Sypro Ruby	5,5 - 12	0,5 - 5	3	+
Deep Purple	3,5	0,1	4	+

4.3.1 Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Brilliant Blue (CBB) je název dvou podobných trifenylmethanových barviv (CBB G-250 a CBB R-250), která se liší počtem methylových skupin (Commassie, 2013).

CBB bylo vyvinuto pro textilní průmysl, ale v dnešní době se hlavně používá v proteomice k obarvení proteinů v gelu. Poprvé barvení proteinů CBB publikoval Fazekas de St. Groth s kolegy v roce 1963. Principem barvení je vazba barviva na aminoskupiny proteinů v kyselém prostředí. Z chemického hlediska se vazba uskutečňuje pomocí elektrostatických a hydrofobních interakcí.

Pro vytvoření pracovního protokolu barvení CBB byla využita studie vedená Neuhoffem (1986), jenž zkoumala více než 600 variant detekce CBB G-250. Ze získaných informací byl vytvořen protokol, který je dnes základem téměř všech koloidních CBB G-250 barvících metod a dostupných komerčních souprav. Protokol byl také vypracován na CBB R-250, ale ukázalo se, že toto barvení je méně citlivé než při použití CBB G-250 (Miller a kol., 2006).

Candiano (2004) dále modifikoval barvící protokol pro CBB G-250, který je dnes znám jako Blue silver CBB G-250. Jedná se zatím o nejcitlivější barvení s využitím CBB, které dosahuje detekčního limitu v případě BSA až 1 ng na proteinový proužek. Hlavní změny oproti protokolu prezentovaném Neuhoffem a kol. (1986) jsou ve zvýšené koncentraci barviva (0,12% na místo 0,1%) a kyseliny fosforečné (ze 2% na 10%). Zvýšené množství kyseliny způsobí snížení pH barvícího roztoku z 1,2 na 0,5. Dochází tak k protonaci všech disociovaných skupin, kyseliny aspargové, kyseliny glutamové a karboxylového C-konce proteinu, čímž dojde ke zrušení náboje přítomného na proteinu, což následně vede k nárůstu hydrofobních interakcí mezi barvivem a zbytky aminokyselin proteinu (Candiano a kol., 2004; Miller a kol., 2006).

Mezi výhody barvení CBB se řadí opakované a snadné použití barviva a nízká cena. O něco nižší citlivost oproti stříbření je dobře kompenzována kompatibilitou s MS. Nevýhodami jsou dlouhé časy barvení a úzký dynamický rozsah (Westermeier a kol., 2005).

4.3.2 Stříbření

V roce 1979 byl publikován Merrilem a kol. postup pro barvení proteinů v gelu stříbřením, který byl 100-krát citlivější než CBB. Principem je redukce iontů stříbra na kovové stříbro, která probíhá na povrchu proteinů. Stříbro se pak váže na postranní řetězce aminokyselin a to především na thiolové a karboxylové skupiny (Gharahdaghi a kol., 1999; Candiano a kol., 2004).

Tato metoda byla následně modifikována a rozšiřována o vývoj alternativních stříbřících metod. Dnes existuje více než 100 variant tohoto barvení se stejnými základními kroky - fixace, impregnace, vývojka a ustálení vývojky. V závislosti na protokolu se detekční limit barvení pohybuje od 1 ng až do 100 pg (Miller a kol., 2006; Gauci a kol., 2011).

Mezi slabiny stříbření patří úzký dynamický rozsah, proto není stříbření moc spolehlivé pro kvantitativní analýzu, a časté interference s MS. Interference jsou zapříčiněné formaldehydem a glutaraldehydem, jenž způsobují kovalentní modifikace proteinů a blokují štěpení trypsinem. Existují však specifické protokoly stříbření, které jsou s MS kompatibilní. Tyto protokoly odebraly z pracovního postupu formaldehyd a glutaraldehyd. Například Chevallet (2008) modifikoval protokol stříbření (Sweet silver), který vykazuje zatím nejlepší výsledky, co se týče meze detekce a pokrytí

sekvence při MS analýze. V pracovním protokolu byl formaldehyd nahrazen redukujícím cukrem rozpuštěným v borátovém pufru (Gharahdaghi a kol., 1999; Chevallet a kol., 2008; Gauci a kol., 2011).

4.3.3 Fluorescenční barviva

Jelikož má detekce proteinů pomocí stříbra a CBB jistá omezení, byla zde snaha o vytvoření nového způsobu barvení. Od zavedení barvení proteinů pomocí Nilské červené, byla vyvinuta řada fluorescenčních barviv, která se používají v elektroforetických metodách. Fluorescenční barviva se od sebe liší jak svými vlastnostmi, tak citlivostí. Příkladem těchto barviv je rodina Sypro, jejíž barviva se vyskytují v různých variantách. U barviv Sypro Red, Sypro Orange a Sypro Tangerine je citlivost srovnatelná s CBB. Citlivějším barvivem je Sypro Ruby, kterým je možné detekovat protein v množství až 1 ng na proteinový proužek. Další používané barvivo, známé jako Deep Purple, je ještě citlivější. S jeho pomocí je možné detekovat až stovky pikogramů proteinu (Mackintosh a kol., 2003; Westermeier a kol., 2005).

Fluorescenční barviva se vyznačují nejen vysokou citlivostí a kompatibilitou s MS, ale i reprodukovatelností a širokým lineárním dynamickým rozsahem. Tato barviva jsou však relativně drahá. V porovnání se stříbrem a CBB je cena až o řád vyšší (Westermeier a kol., 2005).

4.4 Redukce a alkylace proteinů

Přístup bottom-up nebo shotgun vyžaduje k správné identifikaci proteinů pomocí MS kvalitní fond peptidů. K jejich získání se proteiny rozštěpí pomocí proteolytických enzymů. V případě štěpení enzymů v gelu, je nutné před samotným štěpením odstranit z tohoto gelu barvivo. Důvodem jsou interakce sulfonových skupin barviva se zbytky aminokyselin argininu a lysinu, které znemožňují enzymatické štěpení trypsinem (Westermaier a kol., 2008; Protein digestion handout, 2014). Poté je důležité zpřístupnit co nejvíce míst, na kterých probíhá štěpení proteinů, což je možné redukcí disulfidových vazeb, které jsou v proteinu přítomné. Volné thiolové skupiny vzniklé touto redukcí jsou však velice reaktivní a proto je důležité zabránit jejich případné reoxidaci zablokováním. Blokace probíhá nejčastěji vnesením alkylového zbytku.

Reoxidace thiolových skupin vzdušným kyslíkem probíhá prakticky okamžitě, tedy je nutné, aby byla alkylace uskutečněna okamžitě buť v jednom kroku s redukcí, nebo ve dvou následujících krocích (Simpson, 2003; Hale a kol., 2004).

Redukce disulfidové vazby je obvykle provedena v mírně alkalickém prostředí za zvýšené teploty (56-95 °C). K této reakci se běžně používají nízkomolekulární thiolové reduktanty a to až v tisícinásobném molárním přebytku. Mezi takové reduktanty se řadí 2-mercaptoethanol (MeSH), dithiothreitol (DTT) nebo jeho izomer dithioerythritol (DTE). Dalšími činidly, která jsou na bázi trialkylfosfinů jsou tributylfosfin (TBP) a tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) (Simpson, 2003).

V současné době je nejpoužívanějším redukčním činidlem DTT. Oproti MeSH má vyšší redukční potenciál a je rozpustnější ve vodě. Jeho slabou stránkou je schopnost reagovat s alkylačními činidly (např. jodoacetamidem), což může negativně ovlivňovat výtěžek alkylace. Oproti tomu TCEP je zajímavou alternativou redukčního činidla, které nabízí několik výhod oproti DTT. TCEP je mnohem odolnější k oxidaci, působí rychleji a nereaguje s jinými funkčnímy skupinami a alkylačními činidly. Redukce i alkylace tudíž může probíhat v jednom kroku (Simpson, 2003; Protein digestion handout, 2014).

Alkylace thiolové skupiny cysteinu se nejčastěji uskutečňuje pomocí alkylačních činidel na bázi haloacetátů a haloacetamidů, např. kyselina jodoctová (IAA) a jodacetamid (IAM). Reakce probíhá v mírně alkalickém prostředí (pH 8-9) ve tmě, jelikož tato činidla za světla ve vodných roztocích podléhají rozkladu. V prostředí s nižší hodnotou pH hrozí oxidace methioninu a naopak se zvyšujícím pH roste riziko modifikace aminokyselin. Reakce s IAM v porovnání s IAA probíhá zhruba šestkrát rychleji (Plowman a kol., 2003; Hustoft a kol., 2012).

4.5 Enzymová hydrolýza proteinů

Štěpení proteinů pro následnou MS anylýzu je uskutečněno pomocí enzymů. Jeli známé štěpící místo enzymu, dá se odvodit, jaké peptidy při štěpení budou vznikat. Proteiny lze štěpit i chemicky, ale jedná se o štěpení pouze doplňkové, kde není z konkrétních důvodů možné provést enzymovou proteolýzu. Příkladem může být použití bromkyanu (BrCN), který je vhodný pro štěpení ve vodě nerozpustných nebo membránových proteinů (Havliš a kol., 2005).

Proteolýza může být provedena v roztoku nebo v elektroforetickém gelu. Ke štěpení v roztoku se přistupuje, jestliže je nutné rychle získat informace o celkovém proteinovém složení vzorku, nebo pokud je potřeba detekovat proteiny ve velmi malých koncentracích. Z důvodu rozptýlení proteinů v roztoku, dochází k jejich lepšímu štěpení pomocí enzymů a výtěžek peptidů je vyšší v porovnání se štěpením proteinů v gelu (Kinter a Shermen, 2000).

Štěpení v přítomnosti polyakrylamidového gelu je často používaná technika, protože separační metody (1-DE a 2-DE) poskytují hodně důležitých informací o proteinech (např. molekulová hmotnost, izoelektrický bod), z nichž lze odvodit, který proužek nebo skvrna bude zřejmě obsahovat hledaný protein. Štěpení je ale komplikované, neboť molekula enzymu musí proniknout přes gel k substrátu. Pro optimální prosycení gelu štěpícím roztokem je proto nutné, aby byl proteinový proužek skalpelem rozdělen na kostičky o velikosti cca 1 mm^3. Tyto kostičky jsou před přidáním štěpícího roztoku dehydrovány acetonitrilem a poté rehydratovány štěpícím roztokem (Kinter a Shermen, 2000; Havliš a kol., 2005).

Běžně používané proteolytické enzymy jsou zahrnuty v tabulce 2. Největší uplatnění nacházejí endopeptidasy, ale svůj význam mají i karboxypeptidasy a aminopeptidasy. Poslední dvě skupiny enzymů se používají pro tzv. žebříčkové sekvenování (ladder sequencing) a také k analýze posttranslačních modifikací proteinů.

Tab. 2: Přehled proteolytických enzymů běžně používaných v proteomice.

(Havliš a kol., 2005)

Enzym	**Místo štěpení**	**Výjimka**	**Rozsah pH**
Trypsin	C-konec R-X, K-X	X = P	7,0–9,0
Chymotrypsin	C-konec F-, Y-, W-, L-, I-, V- a M-X	X = P	7,5–8,5
Endoproteinasa Glu-C (V8-DE)	C-konec E-X, D-X	X = P	4,0–8,0
Endoproteinasa Lys-C	C-konec K-X	(X = P)	8,5–8,8
Endoproteinasa Arg-C	C-konec R-X	(X = P)	7,5-8,5
Endoproteinasa Asp-N	N-konec X-D, X-E		6,0-8,5
Elastasa	C-konec A, V, L, I, G, S		8,5
Pepsin	F, M, L, W (zvl. F-L, F-F, F-Y)		2–4
Pronase	směs endo- a exoproteinas, štěpí téměř všechny peptidové vazby		7,0–8,0[a]
Subtilisin	široká specifita, pref. C-konec nenabité aminokyseliny		7,0–11,0
Thermolysin	široká specifita (W, Y, F, I, L, V, A, M), převážně N-konec X-F, X-L		6,0–10,0

[a] V závislosti na povaze směsi

Ze všech dostupných proteolytických enzymů se nejvíce používá trypsin. Jedná se o serinovou endopeptidasou s pH optimem v alkalické oblasti (pH 7-8) a striktní substrátovou specifikou. Díky výhodnému pH optimu trypsinu je možné pracovat s levným těkavým pufrem na bázi hydrogenuhličitanu amonného (pH 7,8). Trypsin štěpí proteiny za argininem a lysinem, které zanechává na C-konci vzniklých peptidů a tím poskytuje přiměřené množství definovaných peptidů o velikosti vhodné pro MS analýzy. Ke štěpení nedochází jen v případě, že tyto aminokyseliny sousedí s prolinem. Při štěpení obsahuje štěpící roztok vápenaté ionty, které potlačují autolýzu trypsinu. Samotné štěpení proteinů obvykle trvá 12 hodin při teplotě 37 °C (Havliš a kol., 2005).

Chymotrypsin je serinová endopeptidasa, která nahrazuje nebo doplňuje trypsin. Tento enzym má na rozdíl od trypsinu specifiku štěpení nižší. Chymotripsin štěpí peptidovou vazdu na C-konci převáženě aromatických kyseliny jako je tyrosin, fenylalanin, leucin aj. Štěpení nenastává, následuje-li prolin.

Extracelulární endopeptidasa Glu-C (V8) je enzym získaný z bakterie *Staphylococcus aureus* a specificky štěpí glutamové peptidové vazby. Za určitých podmínek štěpí také aspartové peptidové vazby. Rychlost štěpení tímto enzymem je nižší, pokud se glutamový zbytek nachází v N-koncovém nebo C-koncovém tripeptidu a ke štěpení nedochází vůbec, pokud je vazba mezi kyselinou glutamovou a prolinem. Endopeptidasa Lys-C z *Lysobacter enzymogenes* štěpí peptidové vazby na C-konci lysinu. Další endopeptidasy Arg-C z *Clostridium histolyticum* a Arg-C z *Lysobacter enzymogenes* mají společná specifitu a štěpí u argininového karboxylu. Poslední často používanou endopeptidasou je Asp-N z *Pseudomonas trati*, která štěpící peptidové vazby na N-konci kyseliny asparagové či cysteové. V midlle-down přístupu se při štěpení proteinů uplatňují enzymy Glu-C a Asp-N (Havliš a kol., 2005; Moradian a kol., 2014).

Elestasa je enzym, který vykazuje homologii s trypsinem i chymotrypsinem, zejména pokud jde o důležité katalytické aminokyseliny a specifita štěpení zahrnuje nepolární nearomatické zbytky (Havliš a kol., 2005).

Kyselá aspartátová endopeptidása pepsin je taktéž v proteomice využívaná. Specifita štěpení zahrnuje hydrofobní zbytky, zvláště aromatické. Pepsin je aktivní při nízkém pH, kdy je štěpený protein zároveň denaturován a výměnné interakce mezi difulfidickými kůstky jsou ojedinělé (Vaňková, 1999).

Produkt s obchodní značkou Pronase je tvořen z *Streptomyces griseus*. Jedná se o filtrát z kultury zmíněné streptomycety obsahující směs proteolytických enzymů.

Významnou složkou je serinová endopeptidasa proteasa E, která přednostně štěpí u karboxylu kyseliny glutamové (Havliš a kol., 2005).

Nespecifická proteinasa subtilisin představuje širokou skupinu extracelulárních serinových endopeptidas, které jsou produkovány bakteriemi rodu *Bacillus*. Subtilisin typ Carlsberg a subtilisin BPN patří mezi nejznámější enzymy. Specifita štěpení je nízká. Subtilisiny jsou užitečné v případě, kdy jiné proteinasy neposkytují vhodné peptidy k doplnění aminokyselinové sekvence.

Termolysin je metaloendopeptidasa získaná z *Bacillus thermoproteolyticus*, která není specificky vyhraněná a štěpení probíhá na N-konci hydrofobních aminokyselin (např. leucin, fenylalanin). Pro počáteční štěpení proteinů se moc nepoužívá, protože typický protein obsahuje mnoho potencionálních míst ke štěpení a vznikla by příliš složitá směs velmi malých fragmentů. (Vaňková, 1999; Havliš a kol., 2005)

4.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je široce používaná destruktivní analytická metoda umožňující nejen kvantitativní a kvalitativní analýzu, ale i analýzu izotopického složení jednotlivých prvků, ze kterých je vzorek složen. Počátky MS jsou datovány na konci devatenáctého století. První hmotnostní spektrometr sestrojil J. J. Thomson s pomocí F. W. Astona. MS má své využití v oblasti přírodních věd například při studiu rostlinných a živočišných genomů. V proteomice je jejím úkolem identifikovat a kvantifikovat proteiny (Petrák, 2012).

Princip MS spočívá v převedení molekul na ionty. Vzniklé ionty se následně rozdělují podle poměru hmotnosti a náboje (*m/z*). Tyto ionty dopadají na detektor, který vysílá signál do počítačové jednotky. Záznam těchto signálů je převeden do formy hmotnostního spektra, přičemž osa (X) znázorňuje efektivní hmotnosti iontů (m/z) a osa (Y) jejich relativní zastoupení ve směsi, které je vypočítané z počtu dopadů iontů na detektor (Stulík a kol., 2008).

Hmotnostní spektrometrie se dělí do několika skupin podle způsobu ionizace, separace atd. Ionizace se rozlišuje na „tvrdou“ a „měkkou“. Typickým zástupcem „tvrdých“ ionizačních technik je elektronová ionizace (EI). Nevýhodou EI je, že molekula získá veliký přebytek vnitřní energie, který se projeví fragmentací molekulárního iontu někdy v takovém rozsahu, že v hmotnostním spektru zcela chybí.

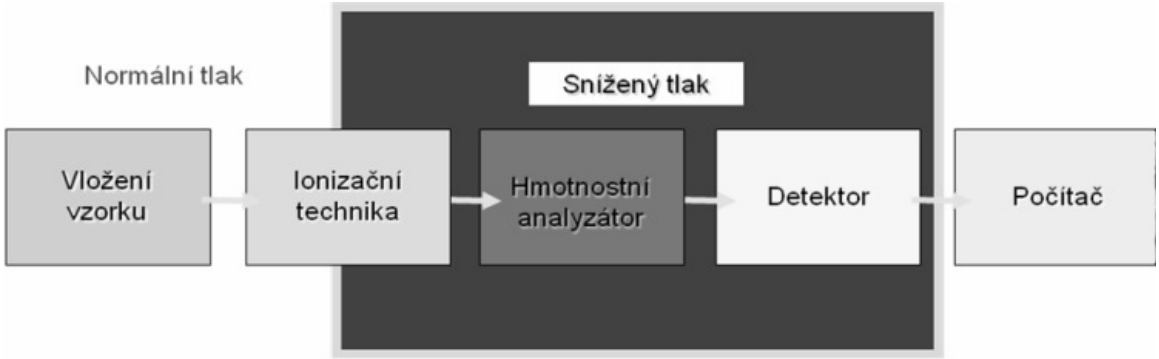
Tento problém vyřešily „měkké“ ionizační techniky. Molekulám analytu je předáváno méně energie a nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci. Existuje řada „měkkých“ ionizačních technik, například ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo nárazem rychlými atomy (FAB) aj. Další typem měkké ionizace je desorpce analytu z pevných povrchů pomocí laseru. Mezi takové techniky se řadí ionizace laserem za účasti matrice (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation), desorpční elektrosprej (DESI) atd (Friedecký a kol., 2012).

Hmotnostní analyzátor využívá k separaci buď pole magnetické, elektrické nebo jejich kombinaci. Pro práci s proteiny lze použít různé typy hmotnostních analyzátorů, hlavně jsou jimi iontové pasti, analyzátory průletové (TOF), analyzátory kvadrupólové, orbitrap či iontová cyklotronová rezonance (Cañas a kol., 2006).

V rámci této práce je pozornost věnována pouze hmotnostnímu spektrometru typu MALDI-TOF.

4.6.1 Hlavní komponenty hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr je složen ze zdroje ionizace, hmotnostního analyzátoru a detektoru, které tvoří základ přístroje. Dalšími částmi jsou vstupní systém pro vzorek, řídící počítačová jednotka a vakuum, v němž je uložen analyzátor, detektor i zdroj ionizace (Obr. 8) (Cañas a kol., 2006).



Obr. 8: Obecné schéma hmotnostního spektrometru
(Vidová a kol., 2008)

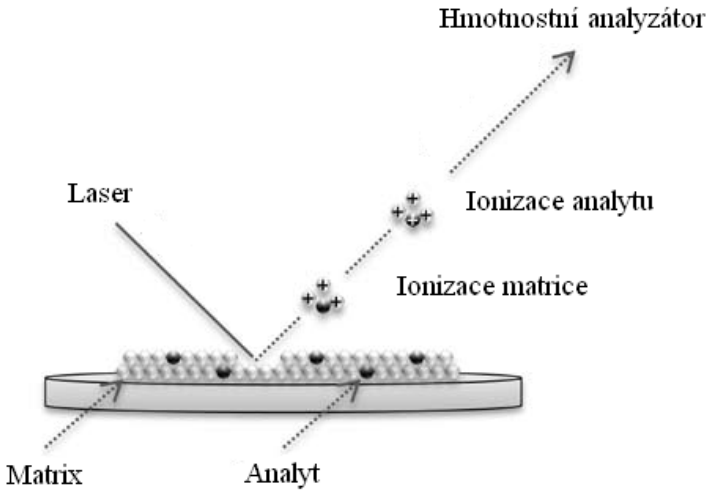
4.6.1.1 Ionizace laserem za účasti matrice

Koncem osmdesátých let F. Hillenkamp a M. Karas použili k ionizaci proteinů laser v přítomnosti organické matrice - matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). Ionizace je proces, při kterém se z elektricky neutrálních atomů nebo molekul stávají kladně nebo záporně nabité ionty (Petrák, 2012).

MALDI je měkká ionizační technika využívající jako matrici většinou slabé aromatické kyseliny, které jsou schopné absorbovat energii laserového záření, ionizovat vzorek a nereagují s analytem. Pro analýzu menších peptidů (< 10 KDa) se nejčastěji používá kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA). Kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (SA) je vhodná pro proteiny větší než 10 kDa. Pro analýzu neutrálních sacharidů naopak vyhovuje kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DBH) a pro oligonukleotidy kyselina 3-hydroxypikolinová (HPA) (Karas a kol., 1995; Cañas a kol., 2006).

K desorpci jsou používány nejčastěji lasery emitující v UV oblasti, např. dusíkaté lasery o vlnové délce 337 nm, nebo v IR oblasti, jako jsou CO_2 lasery (Stulík a kol., 2008).

Ionizace pomocí MALDI probíhá ve dvou fázích, v první fázi se vzorek smíchá s matricí obsahující organickou kyselinu a roztok se nanese na kovovou destičku s terčíky, kde dojde ke kokrystalizaci matrice se vzorkem. V druhé fázi je směs vzorku a matrice vystavena laserovému paprsku. Matrice absorbuje energii laserového pulsu a její rozklad ionizuje molekuly vzorku přenesením protonu z matrice (Obr 9). Tímto způsobem se obvykle tvoří ionty typu $[M+H]^+$ a $[M-H]^-$. Dále se mohou v hmotnostním spektru nacházet fragmenty analytu, klastry nebo ojediněle vícenásobně nabité ionty. Vzniklé nabité ionty, které jsou urychleny silným elektrickým polem, vstupují do hmotnostního analyzátoru (Hoffman a kol., 2007; Stulík a kol., 2008).



Obr. 9: Princip ionizace MALDI
(Friedecký a kol., 2012)

4.6.1.2 Průletový hmotnostní analyzátor

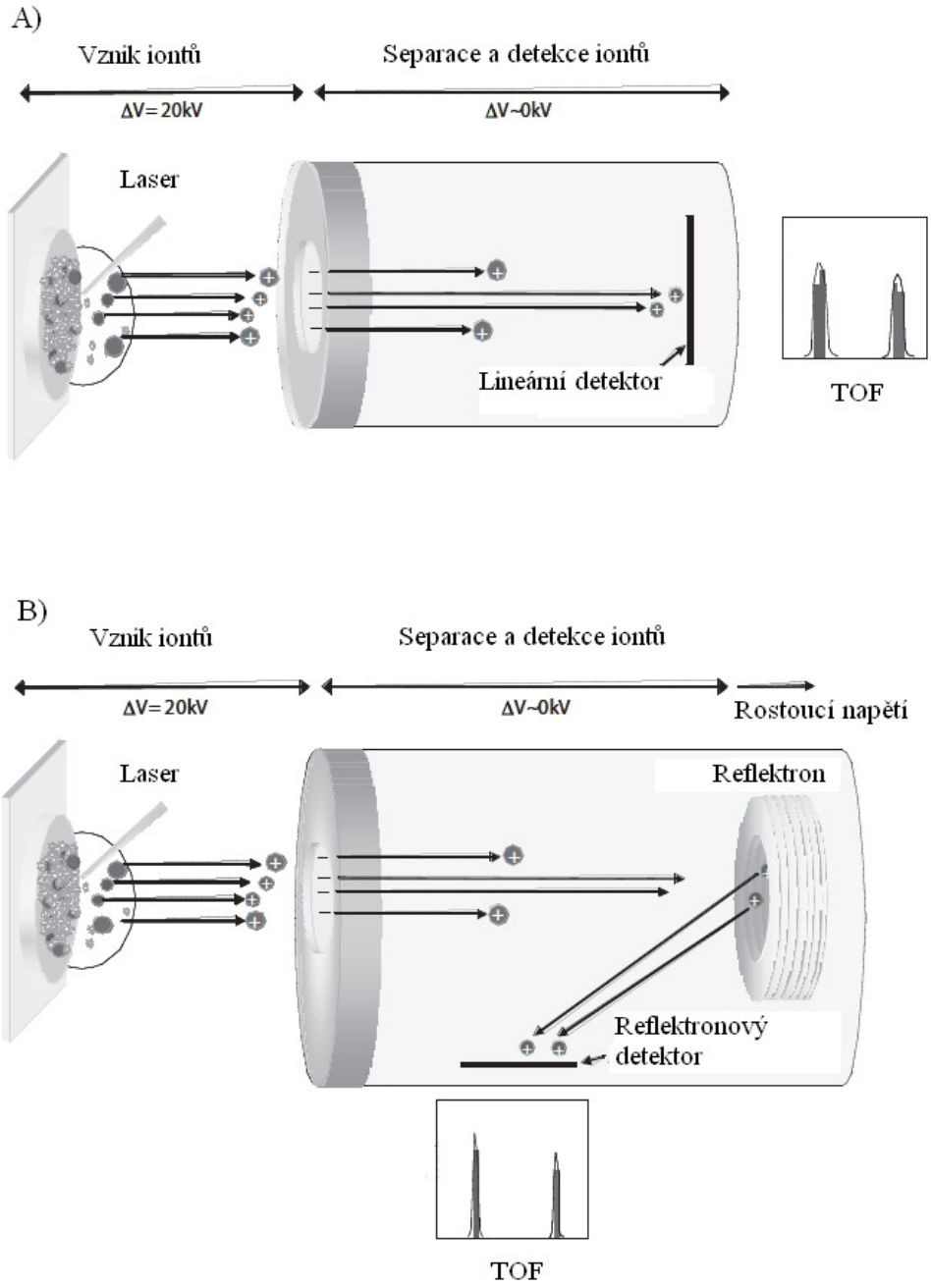
V roce 1948 byl vytvořen koncept průletového hmotnostního analyzátoru (time-of-flight, TOF), ale fyzické podoby se dočkal roku 1955 (Petrák, 2012).

TOF je kombinován především s ionizační technikou MALDI. Hmotnostní rozsah TOF je teoreticky neomezený, praktické limitace přístroje jsou dány typem použitého ionizačního zdroje. Mezi další výhody analyzátoru se řadí potenciálně přesnější stanovení hmotností iontů, krátká doba analýzy a vysoká citlivost (Lee a kol., 2011).

Analyzátor je oblíben i pro svoji jednoduchost. Hlavní částí je letová trubice umístěná ve vakuu. Na začátku trubice je iontový zdroj s odpuzovací elektrodou a akcelerační mřížkou, na konci je detektor. Iontům je dodáno stejné množství kinetické energie a v pulzech jsou akcelerovány elektrickým polem do letové trubice, kde se pohybují směrem k detektoru. Rychlost (v) iontů se stejným nábojem závisí na jejich hmotnosti (m) dle rovnice $E_{kin}=½mv^2$. Z toho vyplývá, že se ionty s nižší hodnotou m budou pohybovat rychleji než ionty s vyšší hodnotou m. Hodnota m/z je vypočtena z doby letu mezi zdrojem a detektorem (Cañas a kol., 2006; Stulík a kol., 2008).

V moderních přístrojích jsou letové trubice vybaveny tzv. reflektronem (iontovým zrcadlem). Reflektron otáčí směr letu o téměř 180°, čímž se prodlouží dráha a doba letu iontů před jejich dopadem na detektor. Takovéto uspořádání vyrovnává rozdíly

v hodnotách kinetické energie iontů dané látky, což významně zlepšuje rozlišení ve spektru (Obr. 10) (Stulík a kol., 2008; Parker a kol., 2010).

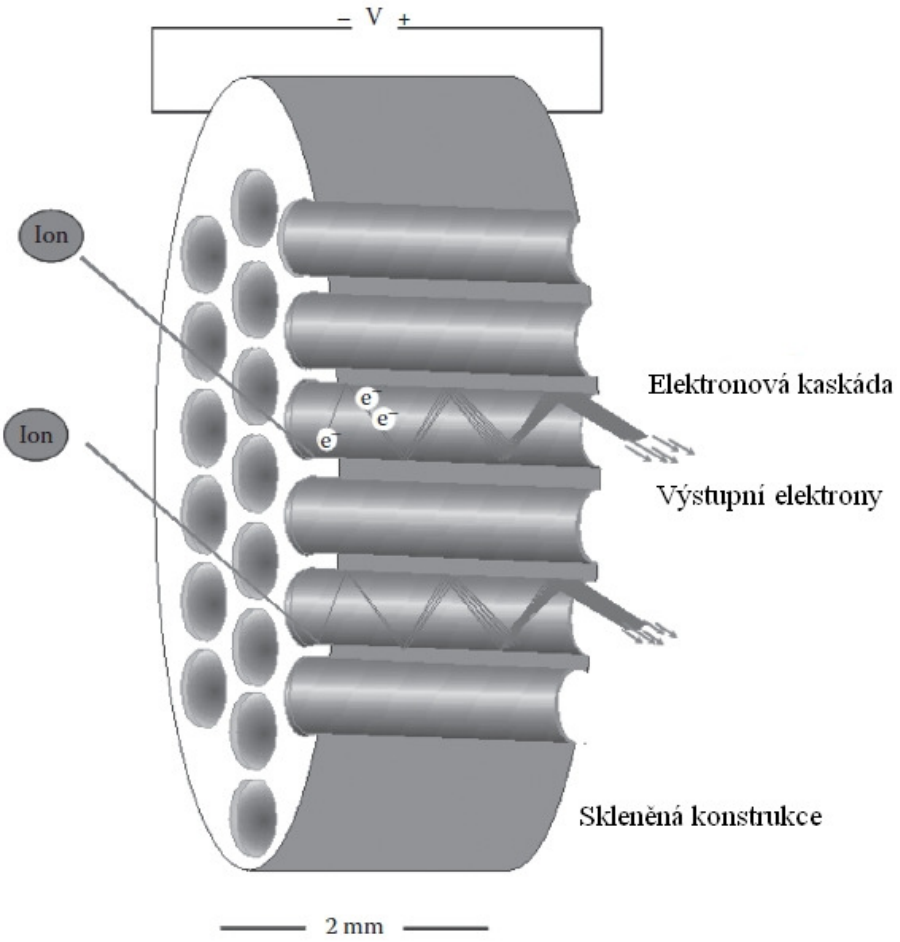


Obr. 10: Schéma MALDI-TOF. Průletový analyzátor. (A) lineárním módu a (B) reflektronovém módu**.** (Parker a kol., 2010)

4.6.1.3 Detektor

K zachycení iontů z hmotnostního analyzátoru slouží detektory. Ty jsou schopné převést proud dopadajících iontů na proud elektronů. V hmotnostní spektrometrii se hojně používají detektory násobičové. Skládají se z jedné nebo ze soustavy jednotlivých dynod. Princip elektronového násobiče spočívá v dopadu kladně nabitých iontů na dynodu, na které je vloženo záporné napětí. Iont vyrazí elektron, jenž dopadá na místo s méně negativním potenciálem a emituje další elektrony. Dalšími nárazy dochází k urychlení proudu elektronů, který je dále veden do zesilovače a vyhodnocen. Tento detektor ale není vhodný pro molekuly se slabým nebo přerušovaným proudem iontů a také pro rychle se měnící hodnoty *m/z*.

Většina TOF analyzátorů používá jako detektor multikanálovou destičku (multichannel plate). Destička je koncepčně podobná elektronovému násobiči s tím rozdílem, že je složena z několika násobičů v poli (Obr. 11). Tyto detektory jsou tak účinné, že umožňují detekovat jednotlivé dopadající ionty (Parker a kol., 2010).



Obr. 11: Schéma multikanálového detektoru
(Parker a kol., 2010)

4.6.2 Identifikace proteinů z MS dat

Nedílnou součástí analýzy proteinů je zpracování získaných dat z hmotnostního spektrometru. Úspěšná identifikace závisí především na kvalitě dat a správné interpretaci s použitím bioinformatiky.

Jednoduchou metodou identifikace proteinů je **peptidové mapování** (peptide mass fingerprinting – PMF). K identifikaci se používají vyhledávající programy jako je MASCOT, ProteinPilot aj., do kterých jsou vloženy získaná MS data. Pomocí těchto programů jsou automaticky prohledávány databáze (např. SwissProt), přičemž se hledají peptidové štěpy se stejnou hmotností. Za předpokladu, že je primární struktura studovaného proteinu v databázi přítomna, podaří se protein se značnou jistotou identifikovat (Káš a kol., 2006; Řehulka a kol., 2007).

PMF je metoda citlivá, rychlá, snadno automatizovatelná a pro vlastní analýzu se spotřebuje pouze malá část vzorku (cca 5-10 %). Zbytek vzorku může být dále použit pro alternativní metodu s cílem ověřit identifikovaný protein nebo získat informace o postranslačních modifikacích (Řehulka a kol., 2007).

Přestože jsou dnešní hmotnostní spektrometry schopné stanovit hmotnost peptidu či proteinu s velkou přesností, stejně často nestačí k jejich jednoznačné identifikaci. Z tohoto důvodu se přistupuje k **sekvenování peptidů**. Při sekvenování se peptidům zájmu dodá taková energie, která je schopná vyvolat jejich fragmentaci. Poté je změřeno hmotnostní spektrum vzniklých fragmentů a z rozdílů jejich hmotností lze odvodit krátký sekvenční úsek některého z peptidů přítomného ve směsi. Použitím vhodného vyhledávacího programu (např. MS-Pattern nebo MS-Tag) lze identifikovat protein vyhledáváním shodných sekvencí v databázích (Káš a kol., 2006; Řehulka a kol., 2007).

II.CÍL PRÁCE

Cílem této práce je optimalizace a zavedení proteomických metod, které by umožnily identifikaci lidských proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Práce je součástí projektu zabývajícího se purifikací a následnou identifikací lidských membránově vázaných reduktas karbonylových sloučenin.

Dílčí cíle:

1. *Optimalizace přípravy SDS - polyakrylamidových gelů pro MS analýzy*
   - Prevence kontaminace vzorků
   - Porovnávání vlivu barvení Coomassie Briliant Blue G250 a Sweet silver na detekci proteinů pomocí MS

2. *Zavedení a optimalizace enzymatického štěpení v gelu*

3. *Aplikace zavedených postupů pro následnou identifikaci pomocí MS u biotransformačních enzymů získaných afinitní chromatografií*

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Použité chemikálie a přístrojové vybavení

5.1 Chemikálie

Acetonitril (ACN) (Merck)

Akrylamid (Sigma-Aldrich)

Bisakrylamid (Sigma-Aldrich)

Bromfenolová modř (Riedel-de Haëen)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Merck)

D-ribosa (Sigma-Aldrich)

Dusičnan stříbrný ($AgNO_3$) (Penta)

Enzym aldo-ketoreduktasa 1C3 (AKR1C3)

Enzym trypsin pro sekvenování (Promega)

Ethanol 96% (Penta)

Hexakyanidoželezitan draselný ($K_3[Fe(CN)_6]$) (Sigma-Aldrich)

Glycerol 85 % (Kulich)

Hydroxid sodný (NaOH) (Penta)

Hydrogenuhličitan amonný (NH_4HCO_3) (Sigma-Aldrich)

Isobutanol (Penta)

Jodacetamid (IAM) (Sigma-Aldrich)

Kyselina 4-hydroxy-α-kyan-skořicová (CHCA)(Sigma-Aldrich)

Kyselina boritá (Sigma-Aldrich)

Kyselina o-fosforečná 85 % (Penta)

Kyselina chlorovodíková 35 % (Penta)

Kyselina octová 99% (Penta)

Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich)

2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

Methanol (Penta)

N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)

Peroxodisíran amonný (APS) (Lachema)

Síran amonný ($(NH_4)_2SO_4$) (Sigma-Aldrich)

Thiosíran sodný ($Na_2S_2O_3$) (Lachema)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Penta)

5.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy

Automatické pipety, špičky (Bio-Hit)

Centrifuga Biofuge stratos (Heraeus)

Centrifuga Mini spin plus (Eppendorf)

Elektroforéza MiniProtean (Bio-Rad)

GelDoc XR (Bio-Rad)

Kádinky

Kolonky Empore™ C18-SD SPE Cartridges (Supelco)

Kývačka Unimax 1010 (Heidolph)

Magnetická míchátka

Mikrozkumavky (Eppendorf)

Odměrné válce

Předvážky (Kern)

Skalpel

Třepačka IKA MS 3 basic (IKA)

Ultrazvuková vana UC 005 AJ1 (Tesla)

Vakuový koncentrátor Eppendorf 50 301 (Eppendorf)

6 Experimentální postup

6.1 Zásady práce přípravy vzorků pro MS analýzu

Pro minimalizaci rizika kontaminace analyzovaných vzorků byla při práci v laboratoři stanovena následující pravidla. Pracovní plochy laboratoře byly důkladně omyty lihomethanolem. Osoby museli používat ochranné pomůcky, mezi které patřily nitrilové či vinylové rukavice, čistý plášť nebo košile s dlouhými rukávy po celou dobu práce se vzorky a chemikáliemi. Jednorázové pracovní pomůcky jako špičky, mikrozkumavky byly vyhrazeny pouze pro MS analýzy. Ostatní pomůcky, jako laboratorní sklo, předměty k navažování, pomůcky pro přípravu gelů nebo nutných k vlastní elektroforéze atd., byly řádně omyty prostředkem na nádobí (Jar), opláchnuty vodou a lihomethanolem. Potřebné chemikálie se nechávaly co nejméně času otevřené a při jejich vážení se dbalo na očištění špachtle nebo lžičky též lihomethanolem. Připravené roztoky byly přefiltrovány přes filtr s póry 0,2 µm a označeny jako čisté – určené pro MS analýzu.

6.2 Příprava rekombinantních enzymů

Rekombinantní enzym AKR1C3 byl připraven podle Dudové (2011) nezávisle na této práci.

Kódující sekvence enzymu byla amplifikována pomocí PCR. PCR produkt byl zaligován do vektoru pET-15b(+). Vzniklý konstrukt byl transformován metodou teplotního šoku do kompetentních *E.coli*, kmen HB101. Po ověření správnosti vložené sekvence, restrikční analýzou a sekvenací byl tento konstrukt transformován do expresního kmene *E. coli*, BL21 (DE 3). Tyto buňky byly namnoženy v LB mediu při teplotě 37 °C. Exprese proteinu AKR1C3 byla indukována pomocí 1 mM IPTG. Výsledná kultura byla stočena při 6000 g, 4 °C, po dobu 10 min a získaná peleta buněk byla resuspendována v lyzačním pufru BugBuster Protein Extraction Reagent. Overexprimovaný protein, obsažený v lyzátu buněk, byl purifikován pomocí afinitní chromatografie a následně uložen do draselno-fosfátového pufru pH 7,4 s 40% glycerolu (Dudová, 2011).

6.3 Purifikace pomocí afinitní chromatografie

Roztoky

- Promývací pufr – 60 mM Na-fosfátový pufr, 1,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol
- Eluční pufr – 150 mM NH_4OH, 1,1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol

Buněčný lyzát z geneticky modifikované *E. coli* s overexprimovaným enzymem byl nanesen na afinitní nosič s navázaným ligandem oracinem. Inkubace vzorku s nosičem probíhala po dobu jedné hodiny za neustálého míchání na rotátoru při 4 °C. Nosič byl následně několikrát promyt promývacím pufrem, čímž došlo k odstranění proteinů, které nemají afinitu k oracinu. Molekuly specificky interagující s afinitním nosičem byly eluovány 150 mM NH_4OH. Všechny frakce získané během izolace byly dále analyzovány pomocí SDS-PAGE a byla u nich stanovena redukční aktivita vůči oracinu (Škarydová a kol., 2013).

6.4 SDS – polyakrylamidová gelová elektroforéza

6.4.1 Ústav molekulární patologie v Hradci Králové

Na Ústavu molekulární patologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany (FVZ UO) byla provedena SDS-PAGE pomocí komerčně dodávaných kitů od firmy **Invitrogen.**

Příprava vzorku

Biologický materiál

- enzym AKR1C3 o koncentraci 2,04 mg/ml

Roztoky

- 0,1 M sodno-fosfátový pufr, pH 7,4 - 0,1 M Na_2HPO_4
- vzorkový pufr – NuPAGE® LDS vzorkový pufr
- 500 mM DTT

Modelový enzym AKR1C3 byl naředěn dvojkovou koncentrační řadou v rozsahu 1000-31,3 ng pomocí sodno-fosfátového pufru (Tab. 3). K připraveným vzorkům bylo přidáno podle doporučení výrobce potřebné množství NuPAGE® LDS vzorkového pufru a 500 mM DTT. Následně byly vzorky v termomixeru inkubovány 10 min při 70 °C.

Tab. 3: Ředění enzymu AKR1C3 sodno-fosfátovým pufrem.

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6
Množství (ng)	1000	500	250	125	62,5	31,3

Vlastní elektroforéza

Roztoky:

- 20x koncentrovaný NuPAGE® MOPS SDS elektrodový pufr
- vnější elektrodový pufr - 20x koncentrovaný NuPAGE® MOPS SDS elektrodový pufr s vodou v poměru 1:19
- vnitřní elektrodový pufr - elektrodový pufr s antioxidantem v poměru 400:1
- NuPAGE® Antioxidant

Vlastní elektroforéza byla provedena s komerčně dodávaným gelem **NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Protein Gel.** Gel byl usazen do elektroforetické cely a vložen do elektroforetické vany. Vnitřní prostor elektroforetické cely byl doplněn vnitřním elektrodovým pufrem tak, aby vnitřní sklo bylo celé ponořené v pufru. Do jamek byly přidány vzorky připravené v předchozím kroku. Do vnější vany byl nalit vnější elektrodový pufr. Cela byla přiklopena víkem a připojena ke zdroji konstantního napětí (200 V) po dobu minimálně 1 hodiny. Když čelo pohybující se fáze dosáhlo konce gelu, zdroj elektrického napětí byl odpojen. Gel byl vyjmut z cely a připraven k barvení.

Barvení gelu

Coomassie Brilliant Blue G250

K barvení byl použit barvící kit **Novex® Colloidal Blue Staining Kit**. Postupovalo se podle přiloženého pracovního protokolu.

Roztoky:

- fixační roztok – 10% (v/v) kyselina octová, 50% (v/v) methanol, dH_2O
- barvící roztok – 20% (v/v) methanol, roztok A, roztok B

Gel byl pomocí klínku uvolněn z rámečku a vložen do uzavíratelné nádoby s fixačním roztokem. Fixace probíhala 10 minut na laboratorní kývačce. Fixační roztok byl nahrazen barvícím roztokem A s methanolem. Po dalších deseti minutách byl přidán barvící roztok B. Barvení probíhalo po dobu 12 hodin na kývačce. Další den byl barvící roztok odebrán a gel byl promýván destilovanou vodou do odbarvení.

6.4.2 Katedra biochemických věd v Hradci Králové

Na Katedře biochemických věd, Farmaceutické fakulty, Univerzity Karlovy (FAF UK) byly provedeny SDS-PAGE s ručně připravenými gely.

Příprava vzorku

Biologický materiál

- enzym AKR1C3 o koncentraci 2,04 mg/ml

Roztoky

- 0,1 M sodno-fosfátový pufr, pH 7,4 - 0,1 M Na_2HPO_4
- vzorkový pufr - 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 18% (w/v) glycerol, 10% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) bromfenolová modř, 3% (w/v) 2-mercaptoethanol

Série vzorků enzymu AKR1C3 byla připravena dvojkovou koncentrační řadou v rozsahu 1000-2,0 ng pomocí sodno-fosfátového pufru (Tab. 4). Vzorky byly dále smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 4:1 a zahřáty na 95 °C v termomixeru po dobu 3 minut.

Tab. 4: Ředění enzymu AKR1C3 sodno-fosfátovým pufrem.

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Množství (ng)	1000	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0

Příprava gelu

Roztoky

- 30% Akrylamid (AA) + 0,8% Bisakrylamid (bis-AA)
- 1,5 M Tris-HCl pufr, pH 8,8
- 0,5 M Tris-HCl pufr, pH 6,8
- 10% (w/v) SDS
- TEMED
- 10% APS
- isobutanol nasycený vodou

Připravené gely byly o tloušťce 0,75 mm.

Skla pro přípravu gelu byla přiložena k sobě a spojena sponami. Vzniklý rámeček byl umístěn na podložku zalévacího rámu a přichycen pomocí kolíčků ke stojanu. V dalším kroku byl připraven roztok na separační gel, viz tabulka 5. Roztok byl promíchán a ihned pipetován mezi skla do výšky asi tří čtvrtin skla. Nalitý gel byl opatrně převrstven 300 µl nasyceného isobutanolu. Polymerace probíhala minimálně 45 minut. Po proběhlé polymeraci byl z rámečku isobutanol slit a separační gel byl převrstven 4% zaostřovacím gelem až k okraji kratšího skla. Následně byl mezi skla zasunut hřeben až po drážky. Polymerace horního gelu probíhala minimálně 1,5 hodiny. Po polymeraci byl z gelu odstraněn hřeben a jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Skla byla uvolněna za spon a gel byl připraven na elektroforézu.

Tabulka 5: Složení směsi pro přípravu gelu.

Procentní gel	**Separační gel** 12,5%		**Zaostřovací gel** 4%	
Roztoky	H_2O	3,2 ml	H_2O	3,125 ml
	1,5 M Tris- HCl, pH 8,8	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,15 ml
	10% SDS	0,1 ml	1 % SDS	0,05 ml
	30% AA + 0,8% bis-AA	4,2 ml	30% AA + 0,8% bis-AA	0,5 ml
	Iniciace polymerace		**Iniciace polymerace**	
	10% APS	100 µl	10% APS	100 µl
	TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

Vlastní elektroforéza

Roztoky

- 5x koncentrovaný elektrodový pufr, pH 8,3 - 960 mM glycin, 124 mM Tris-HCl, 0,5% (w/v) SDS
- elektrodový pufr - 5x koncentrovaný elektrodový pufr s vodou v poměru 1:4

Do elektroforetické cely byla zasazena skla s gelem tak, aby kratší skla byla orientována dovnitř. Na led byla umístěna elektroforetická vana a do ní se vložila cela s gely. Do prostoru mezi skly byl nalit elektrodový pufr po okraj. Do každé z jamek byl nanesen vzorek. Zbylý elektrodový pufr byl dolit do elektroforetické vany. Cela byla přiklopena víčkem a připojena ke zdroji konstantního napětí. Po dobu 10 – 15 minut bylo nastaveno 100 V pro zaostřovací gel, následně bylo napětí zvýšeno na 150 V pro separační gel a to po dobu minimálně 1 hodiny. Zdroj byl odpojen, až čelo pohybující se fáze dosáhlo konce gelu. Poté byl gel vytažen z elektroforetické cely.

Barvení gelů

Coomassie Brilliant Blue G 250

Roztoky

- Fixační roztok – 10% (v/v) kyselina octová, 40% (v/v) methanol, dH_2O
- Barvící roztok CBBG – 10% (v/v) H_3PO_4, 10% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$, 20% (v/v) methanol, 0,12% (w/v) Coomassie G 250, dH_2O

Skla s gelem byla otevřena pomocí klínku. Z gelu byl odstraněn zaostřovací gel a separační gel byl přenesen do uzavíratelné nádoby s fixačním roztokem. Fixace probíhala 30 minut na laboratorní kývačce. Poté byl gel 3 – 6 x po 10 minutách promýván destilovanou vodou a barven roztokem koloidního CBBG přes noc.

Druhý den byl gel promýván destilovanou vodou do úplného odbarvení pozadí (Candiano a kol., 2004).

Stříbro

Roztoky

- Fixační roztok – 30% (v/v) ethanol, 10%(v/v) kyselina octová, dH2O
- Barvící roztok
  - senzitizační roztok – 8 mM $Na_2S_2O_3$
  - stříbřící roztok – 12 mM $AgNO_3$
  - vývojka – 2% (w/v) ribosa, 100 mM kyselina boritá, 300 mM NaOH, 50 μM $Na_2S_2O_3$
  - stop roztok – 40 g/l Tris, 20 ml/l kyselina octová

Separační gel byl pomocí klínku vyjmut ze skel a vložen do uzavíratelné nádoby s fixačním roztokem. Fixace probíhala přes noc na laboratorní kývačce.

Druhý den byl gel opláchnut v destilované vodě (4 x 10 minut). Následovala senzitizace pomocí senzitizačního roztoku po dobu 1 minuty a 2 krátké oplachy v destilované vodě. Dále byl gel 30 minut stříbřen a rychle opláchnut v destilované vodě (5 – 10 sekund). Nakonec byla ke gelu přidána vývojka, která působila 30 – 60 minut. Reakce byla ukončena stop roztokem. (Chevallet a kol., 2008).

Gely byly vyfoceny pomocí přístroje GelDoc XR.

6.5 Enzymatické štěpení proteinu v gelu

Roztoky:

- odbarvovací roztok CBBG - 50 mM NH_4HCO_3 s 40% (v/v) ACN
- odbarvovací roztok Sweet Silver – 30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ + 100 mM $Na_2S_2O_3$ v poměru 1:1
- redukční činidlo - 10% (w/v) DTT v 50 mM NH_4HCO_3
- alkylační činidlo - 55 mM IAM v 50 mM NH_4HCO_3
- štěpící roztok trypsinu – 0,2 μg/μl trypsinu v dodaném pufru + 50 mM NH_4HCO_3 v poměru 1:9
- extrakční roztok 1 - 50 mM NH_4HCO_3, 60% (v/v) ACN, 1% (v/v) TFA
- extrakční roztok 2 - 50 mM NH_4HCO_3, 80% (v/v) ACN, 1% (v/v) TFA

- 50 mM NH_4HCO_3
- 100% ACN
- 100% TFA

Jednotlivé proteinové proužky byly skalpelem vyříznuty z polyakrylamidového gelu a přeneseny do nových mikrozkumavek. Proužky byly dále rozděleny na části o velikosti přibližně 1 mm^3 a odbarveny. Odbarvování proteinových kousků probíhalo při 30 °C za neustálého míchání v termomixeru pomocí příslušných odbarvovacích roztoků. Po úplném odbarvení byly vzorky dehydrovány přidáním 100% ACN 5 minut v termomixeru při teplotě 25 °C .

K dehydrovaným gelovým kouskům bylo přidáno 100 µl redukčního činidla. Redukce probíhala za neustálého míchání v termomixéru při 57 °C. Po 45 minutách bylo redukční činidlo odebráno a nahrazeno 100 µl alkylačního činidla. Reakce probíhala 25 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po odstranění alkylačního činidla byly gelové kousky 3 x 15 minut promyty 50 mM NH_4HCO_3 . Následně byly kousky gelu opět dehydrovány 100% ACN.

Na takto připravené vzorky bylo naneseno 10 µl štěpícího roztoku trypsinu. Do mikrozkumavek byl dále přidán 50 mM NH_4HCO_3 tak, aby byl gel během štěpení neustále v roztoku. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C za občasného třepání v termomixeru.

Druhý den byly vzniklé peptidy extrahovány třemi vytřepáními. Nejprve byl do každé zkumavky přidán 100%ACN a 100% TFA tak, aby jejich výsledná koncentrace činila 40 % ACN a 1 % (v/v) TFA. Po 15 minutách inkubace v termomixeru byl extrakt odebrán do nových mikrozkumavek. Následoval druhý (extrační roztok 1) a třetí (extrakční roztok 2) extrakční krok. Spojené výtřepky byly odpařeny do sucha ve vakuovém koncentrátoru..

6.6 Odsolení vzorků

- pufr A – 5% (v/v) ACN s 0,1% (v/v) TFA
- pufr B – 80% (v/v) ACN s 0,1% (v/v) TFA
- 100% (v/v) methanol

Odsolení vzorků, získaných v předchozím kroku, probíhalo na kolonkách Empore™ C18-SD SPE Cartridges. Jednotlivé vzorky byly rozpuštěny v 500 µl pufru A. Kolonky byly aktivovány 500 µl methanolu a následně promyty 500 µl pufru A. Na ně byly naneseny

vzorky a kolonky byly doplněny pufrem A až po okraj. Pro kvalitnější odsolení byly kolonky po odkapání ještě jednou naplněny pufrem A. V dalším kroku byly odsolené peptidy eluovány 300 µl pufru B. Eluáty byly sbírány do nových mikrozkumavek a poté odpařeny do sucha ve vakuovém koncentrátoru.

6.7 Příprava vzorku před MS analýzou

Roztoky:

- roztok A - 5% ACN s 0,1% TFA
- matrice – 5 mg/ml 4-hydroxy-α-kyan-skořicová kyselina v 50% ACN s 0,1% TFA

a) rozpuštění vzorku v roztoku A a matrici

Jednotlivé odpařené vzorky byly rozpuštěny ve 25 µl roztoku A, pečlivě protřepány ve třepačce, a poté smíchány s matricí v poměru 1:1.

b) rozpuštění vzorku v roztoku matrice

Jednotlivé odpařené vzorky byly rozpuštěny v 5 µl matice a pečlivě promíchány.

Na destičku bylo pipetováno 0,8 µl vzorku celkem na 3 pozice. Po zaschnutí vzorků byla destička připravena k MS analýze.

IV. VÝSLEDKOVÁ ČÁST

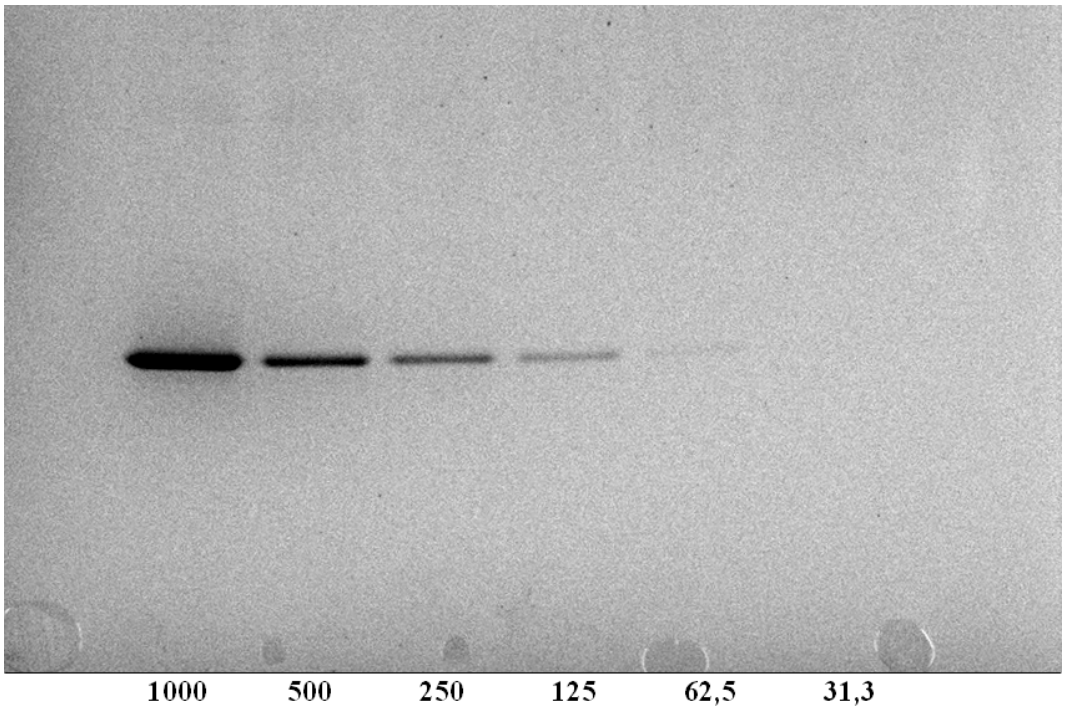
Celkem bylo provedeno devět SDS-PAGE, osm pro optimalizaci a zavedení metod a jedna k identifikaci vzorku získaného pomocí afinitní chromatografie. Získané peptidové vzory byly následně podrobeny fragmentaci v tandemovém režimu MALDI-TOF/TOF a identifikace proteinů z hmotnostních dat byla provedena v programu ProteinPilot.

7 Přítomnost kontaminujících látek ve vzorku a stanovení nejnižšího detekčního limitu

7.1 SDS-PAGE s komerčně dostupným gelem

SDS polyakrylamidová elektroforéza byla provedena na FVZ UO pomocí komerčních kitů od firmy Invitrogen (Obr. 12). Celkem bylo na gel naneseno 6 vzorků modelového enzymu AKR1C3 v rozmezí od 1000 do 31,3 ng (Tab. 3). Následně byla na pracovišti provedena detekce a enzymatické štěpení proteinu v gelu a vzorky byly analyzovány hmotnostním spektrometrem typu MALDI-TOF/TOF.

U žádného vzorku nebyly prokázány kontaminující látky. Nejnižší detekční limit enzymu AKR1C3 pro správnou identifikaci pomocí MS bylo 125 ng.

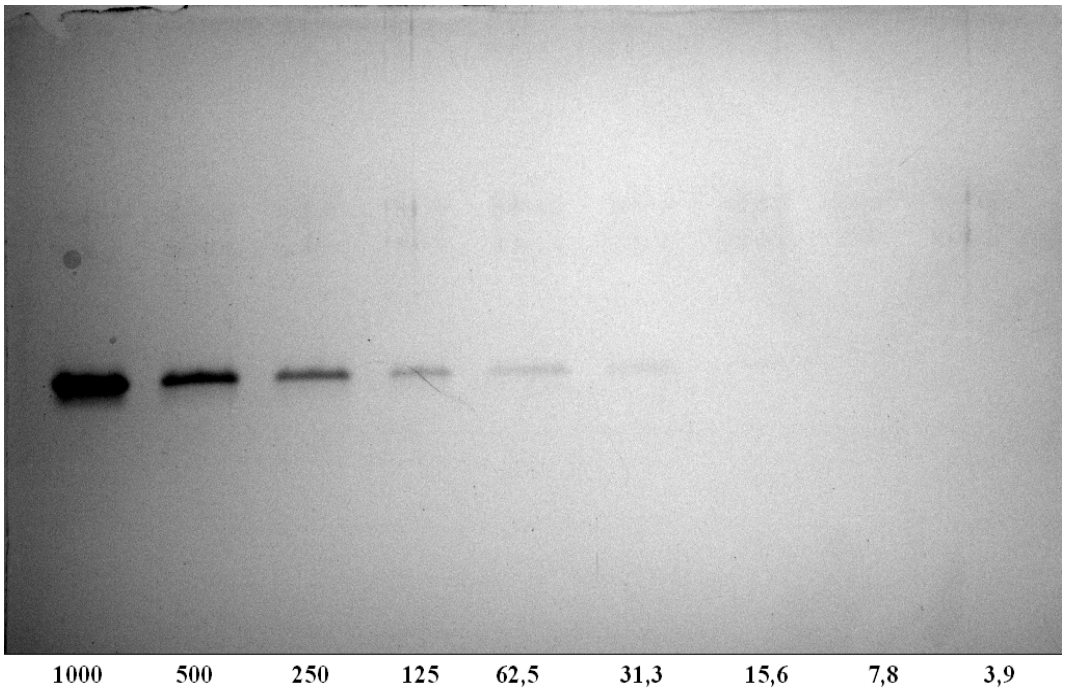


Obr. 12: Gel obarvený Coomassie Brilliant Blue 250. Množství modelového enzymů AKR1C3 se pohybovalo v rozmezí od 1000 ng do 31,3 ng.

7.2 SDS-PAGE s ručně připraveným gelem

Na FAF UK byl připraven gel dle tabulky 5 (viz s. 52). Dbalo se na dodržení zásad práce v MS čistotě (viz 6.1). Na gel bylo naneseno celkem 9 vzorků modelového enzymu AKR1C3 v rozmezích od 1000 do 3,9 ng (Obr. 13). Elektroforéza a detekce proteinů v gelu (CBB-G250) proběhla ve studentské laboratoři FAF UK, ale enzymatické štěpení proteinu v gelu a příprava vzorku k MS analýze byla provedená na FVZ UO.

Následná analýza vzorků neprokázala přítomnost kontaminujících látek. Nejnižší detekční limit enzymu AKR1C3 stanovený MS byl 125 ng.

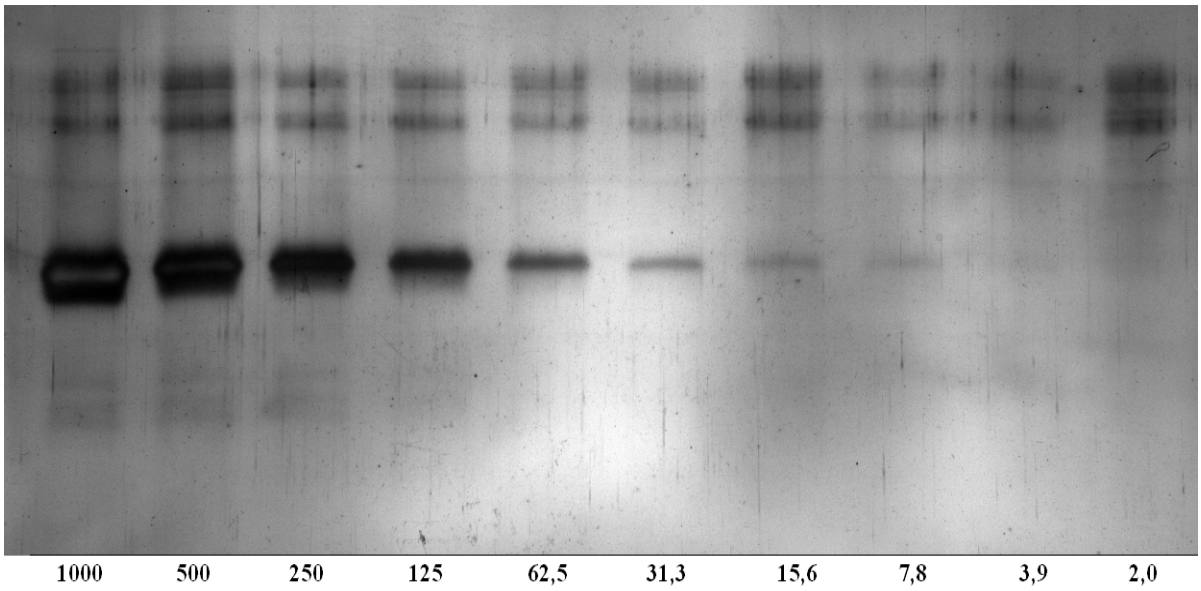


Obr. 13: Gel obarvený Coomassie Brilliant Blue 250. Množství modelového enzymu AKR1C3 se pohybovalo v rozmezí od 1000 ng do 3,9 ng.

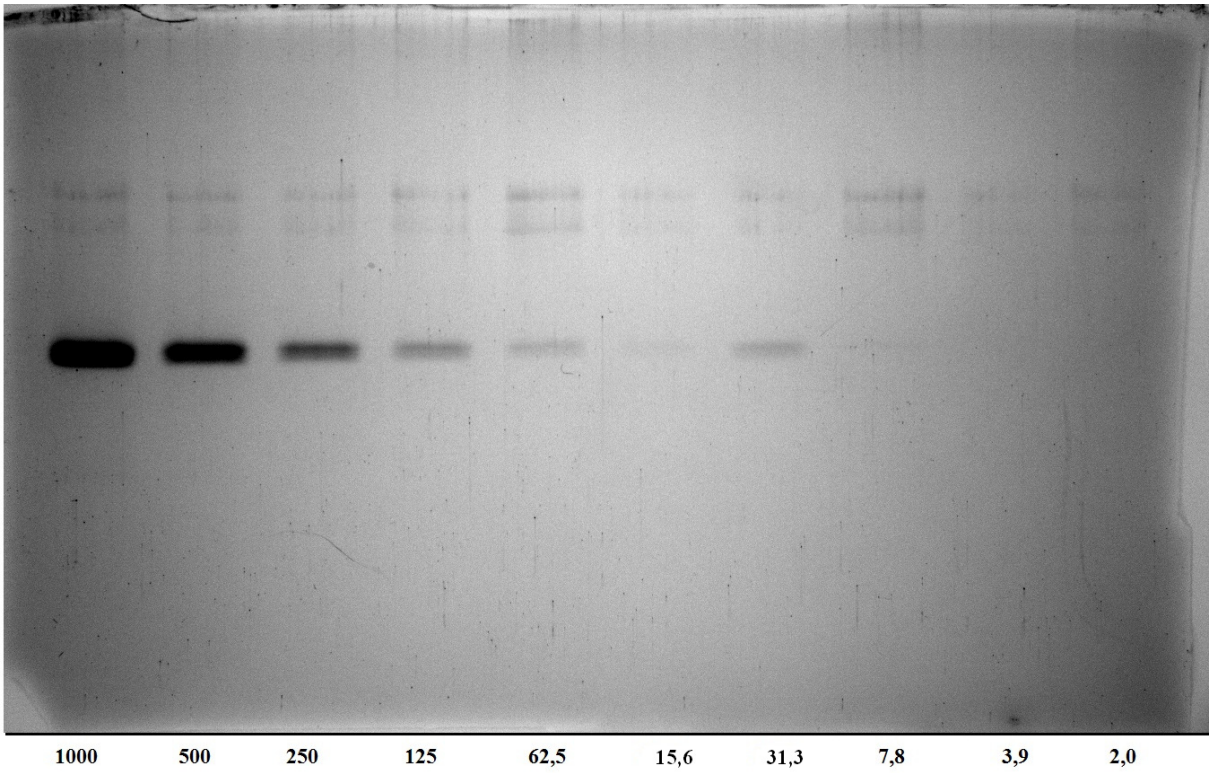
7.3 Potvrzení nepřítomnosti kontaminujících látek ve vzorku

Celkem byly provedeny tři experimenty. Vzhledem k podobnosti detekovaných proteinů v gelech z SDS PAGE budou uvedeny obrázky jen jednoho experimentu.

Na FAF UK proběhla celá metodika dle zásad pro práci v MS čistotě (viz 6.1). Na připravené gely (Tab. 5) byly naneseny vzorky modelového enzymu AKR1C3 v rozmezích od 1000 do 2 ng (Tab. 4). SDS-PAGE elektroforéza, detekce CBB-G250 i stříbření (Obr. 14, Obr. 15) a enzymatické stěpení proteinu v gelu byly provedeny také na FAF UK.



Obr. 14: Gel obarvený stříbřením. Množství modelového enzymu AKR1C3 se pohybovalo v rozmezí od 1000 ng do 2 ng.



Obr. 15: Gel obarvený Coomassie Brilliant Blue G250. Množství modelového enzymu AKR1C3 se pohybovalo v rozmezí od 1000 ng do 2 ng.

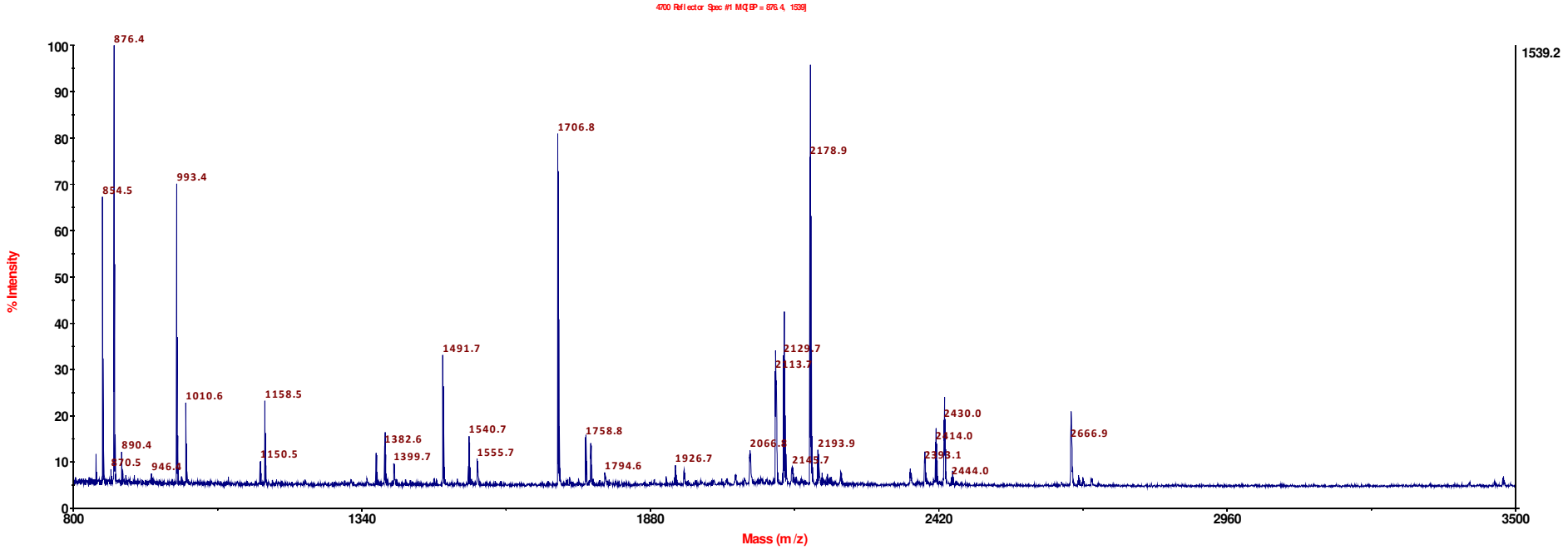
Provedené MS analýzy u dvou experimentů nepotvrdily přítomnost kontaminujících látek ve vzorcích, na obrázku 16 je uvedené spektrum z posledního expetimentu. U jednoho experimentu se vyskytly ve spektru keratiny (Obr. 17).

7.4 Vliv barvení CBB-G250 a stříbra na detekci proteinů pomocí MS

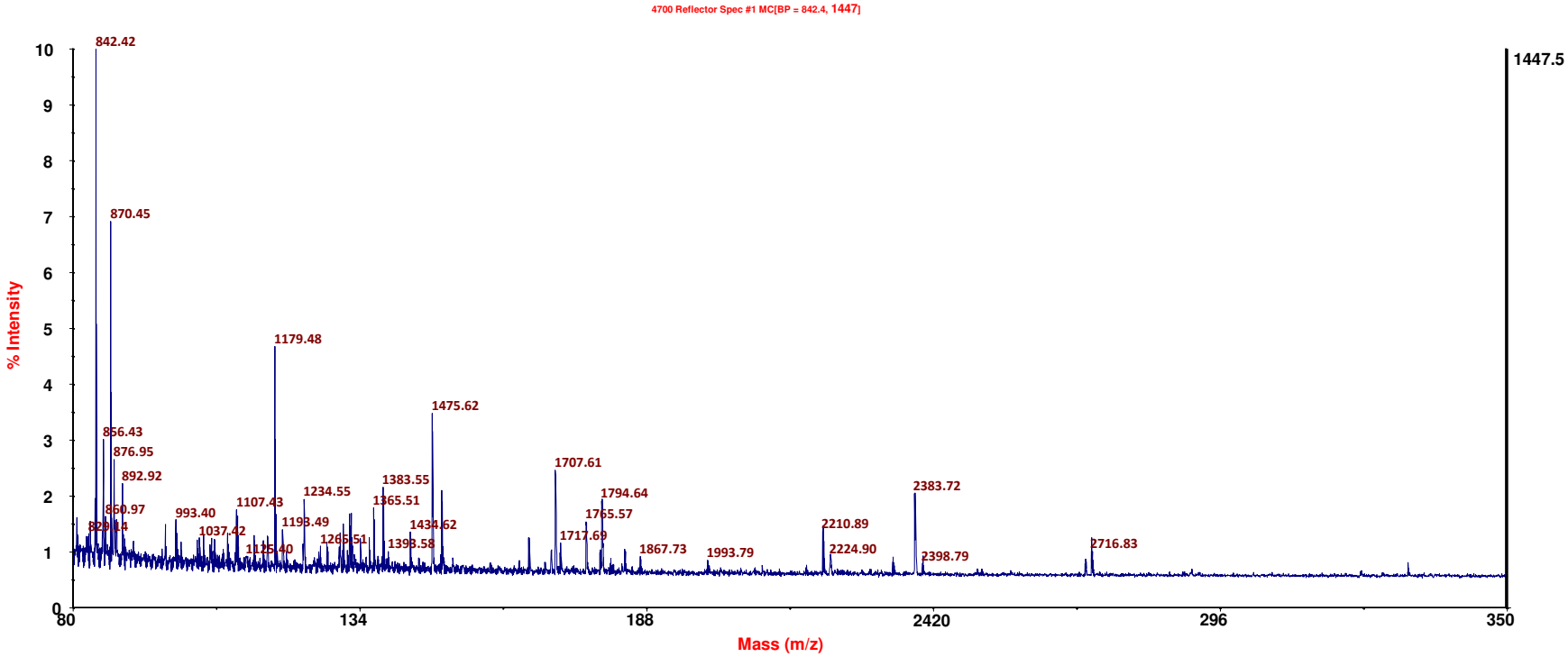
K porovnání citlivosti barvení byly použity gely z SDS PAGE , které byly připraveny na FAF UK (Obr. 14 a Obr. 15).

V prvním experimentu byla MS analýza provedena u vzorků, které byly naředěny jak v roztoku matrice, tak i v 5% ACN s 0,1% TFA. Data získaná z hmotnostní analýzy ukázala, že barvením CBB-G250 se dosáhlo detekčního limitu 250 ng/band. U stříbření se dosáhlo detekčního limitu 500 ng/band.

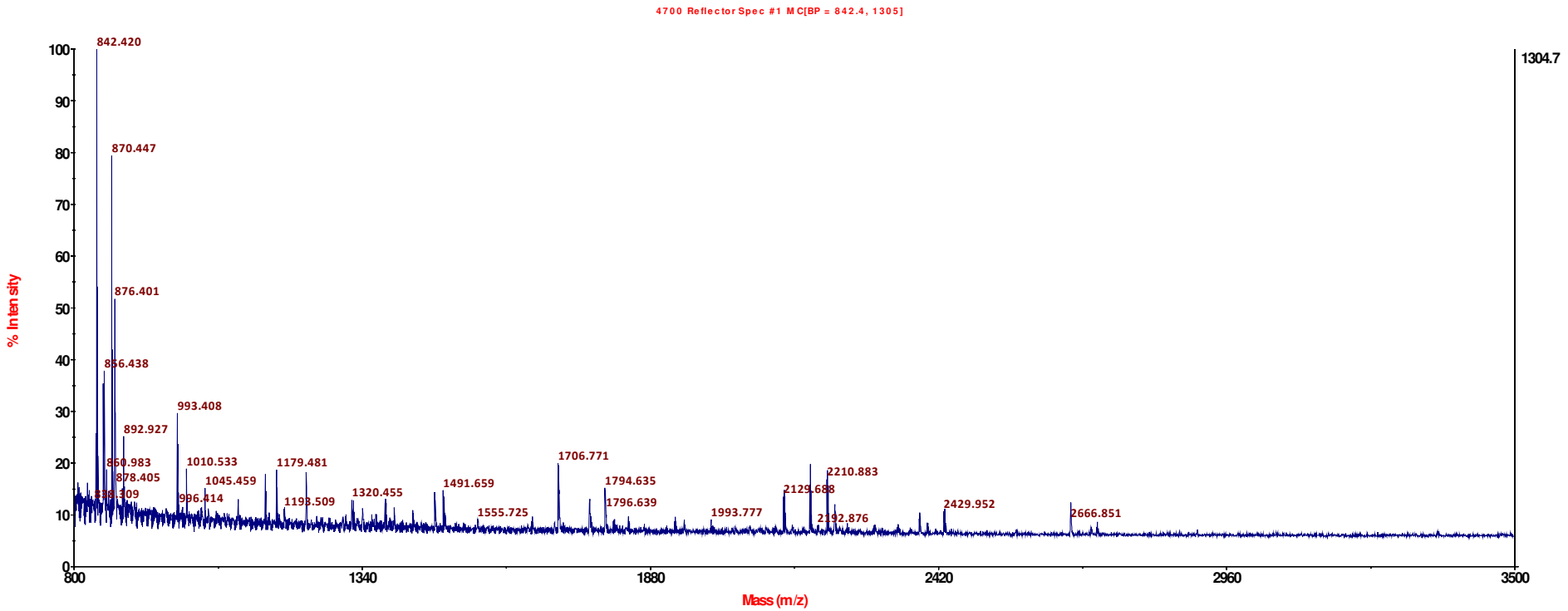
V druhém experimentu byly tytéž vzorky rozpuštěny jen v roztoku matrice (Obr. 18). Z výsledků MS analýzy byl prokázán detekční limit 15,6 ng/band u CBB G250 a 250 ng/band u stříbření.



Obr. 16: Hmotnostní spektrum. Vzorek s množstvím proteinu 1000 ng/band získaný z gelu obarveném CBB-G250 byl rozpuštěny přímo v matrici. Protein byl identifikován jako enzym AKR1C3.



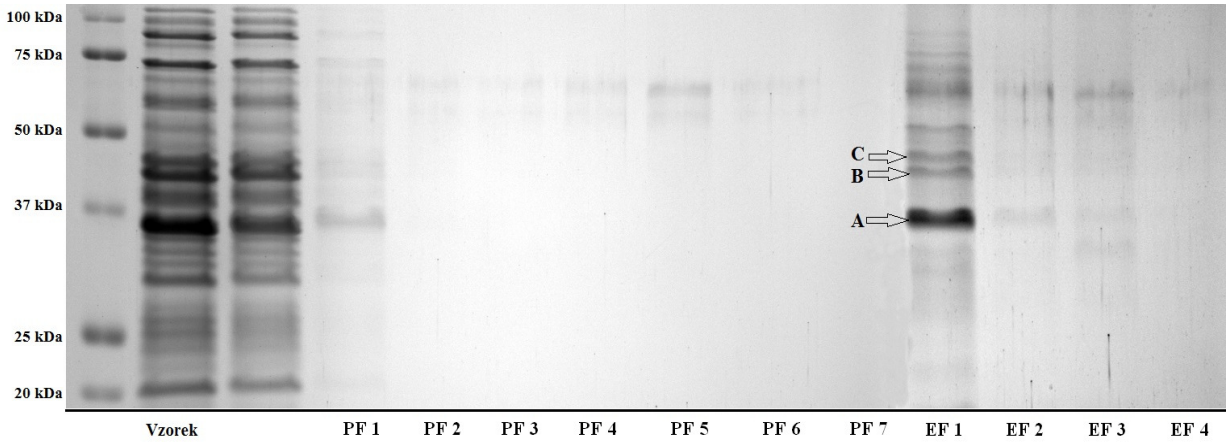
Obr. 17: Hmotnostní spektrum. Vzorek s množstvím proteinu 7,8 ng/band získaný z gelu obarveném CBB-G250 byl rozpuštěny přímo v matrici. Ve spektru identifikováno malé množství keratinu typu I (K1C10).



Obr. 18: Hmotnostní spektrum. Vzorek s množstvím proteinu 15,6 ng/band získaný z gelu obarveném CBB-G250 byl rozpuštěny přímo v matrici. Protein byl identifikován jako enzym AKR1C3.

8 Identifikace purifikovaných biotransformačních enzymů

Zavedený pracovní postup byl následně aplikován na vzorky získané afinitní chromatografií. Po proběhlé SDS-PAGE byly k MS analýze vybrány 3 proteinové proužky s molekulovou hmotností v oblasti ~ 37–40 kDa (Obr. 19). Proužek s označením **A** byl identifikován jako enzym AKR1C3 a proužky s označením **B** a **C** byly identifikovány jako elongační faktory TU 1 a TU 2 z *E. coli*.



Obr. 16: Gel obarvený Coomassie Brillitant Blue G250. Proteinový proužek A je identifikován jako AKR1C3. Proteinové proužky B a C jsou elongační faktory TU 1 a TU 2. PF znamená frakce promývací a EF frakce eluční.

V. DISKUZE

Separační metody a hmotnostní spektrometrie umožňuje rychlou a přesnou identifikaci proteinů a to i takových, které se špatně izolují z biologických tkání nebo jsou vzácné. Díky spolehlivosti je k separaci proteinů často vyžívána jednorozměrná SDS-PAGE. Tato elektroforéza umožňuje separaci proteinů v širokém rozmezí molekulové hmotnosti mezi 5 a 250 kDa, proto je vhodná k separaci méně komplexních směsí, např. purifikovaných membránových proteinů (Moebius a kol., 2005; Almén a kol., 2009).

Hmotnostní spektrometretrie představuje velmi citlivou a univerzální metodu pro identifikaci proteinů. Existuje ale mnoho chemických sloučenin i proteinů, které hmotnostní analýzu ruší a díky kterým jsou získaná data zkreslena či znehodnocena. Kontaminanty mohou být látky přidané do vzorku buď záměrně při jeho přípravě nebo nechtěně. K nechtěné kontaminaci keratiny dochází přenosem od samotného člověka, případně funkčním procesem laboratorního přístroje, např. z používaných olejů nebo plastických hmot a v neposlední řadě i chodem laboratoře jako celku.V každém případě jsou tyto nežádoucí látky hmotnostním spektrometrem následně detekovány. Pokud jsou kontaminanty ve vysoké koncentraci, dochází k překrytí proteinů zájmu. Získaná irelevantní data jsou k identifikaci proteinu nepoužitelná, tím vznikají ztráty nejen časové ale i finanční (Hodge a kol., 2013).

O problémech s kontaminací vzorků se zabývá řada publikací, např. Hodge (2013) popisuje jak kontaminanty zavedené do vzorku ovlivňují analýzu proteinů pomocí HPLC-MS/MS, ale i jakým způsobem jejich negativní vliv na analýzu a získaná data snížit. Publikace také uvádí, že naprosté odstranění kontaminujících látek ze vzorků je velmi obtížné. Xu (2011) se v publikaci vyjadřuje o lidských keratinech, které dokáží znemožnit analýzu proteinů v nízkých koncentracích v oblasti bottom-up proteomiky. Keller (2008) zase sestavil souhrn hlavních látek, které mohou rušit MS analýzu a znehodnocovat data. Do jednoto textu shrnul dostupné informace o hlášených kontaminujících látkách proteinové i neproteinové povahy, jenž se v laboratořích vyskytly a zapsal řadu nově pozorovaných a identifikovaných interferencí (Keller a kol., 2008; Xu a kol., 2011; Hodge a kol., 2013).

Na Katedře biochemických věd (FAF UK) probíhá výzkum zaměřený na izolaci, purifikaci a identifikaci nových membránových enzymů, karbonylreduktas účastnících se metabolismu xenobiotik. Při jednotlivých experimentech se laboratoř často potýkala se silně zkontaminovanými vzorky, které znemožnily identifikaci získaného proteinu. Zdrojem

kontaminace byly hlavně keratiny, které se do vzorku dostaly zřejmě během jeho přípravy k MS analýze.

Hlavní snahou této práce bylo nalezení a vypracování pracovního postupu minimalizujícího riziko kontaminace vzorků pro následnou identifikaci proteinu zájmu. Ve studentské laboratoři na Katedře biochemických věd (FAF UK) byly učiněny kroky ke snížení rizika kontaminace keratiny (viz 6.1). Zásadní bylo zamezit či minimalizovat dlouhodobou expozici pracujícího člověka s gelem při jeho vlastní přípravě nebo při práci se vzorky. V tomto případě bylo riziko kontaminace vysoké, neboť člověk je hlavním zdrojem keratinů. Z toho důvodu bylo zavedeno nutné použití čistých vinylových nebo nitrilových rukavic. Se vzorky se pracovalo na vzdálenost paží. Tím se minimalizovalo riziko napadání keratinů do vzorků z vlasů. Dalším problémem k řešení byla příprava roztoků a jejich uskladnění. Pro přípravu roztoků byla vždy použitá čerstvá destilovaná voda a nádoby s chemikáliemi byly otevřené jen na nezbytně nutnou dobu, aby se zamezilo riziku kontaminace z okolního prostředí laboratoře. Připravené roztoky byly přefiltrovány k odstranění hrubých nečistot, řádně označeny jako „čisté, určené pro MS“ a uloženy v oddělené části laboratoře. Laboratorní sklo vymezené přímo pro práci v MS bylo před každým použitím pečlivě umyto čistícím prostředkem na nádobí, opláchnuto v destilované vodě a poté lihomethanolem, aby se předešlo kontaminaci vzorků z tohoto zdroje.

Na Ústavu molekulární patologie (FVZ UO) byl už dříve zaveden pracovní postup k minimalizaci kontaminace vzorků. K separaci proteinů SDS-PAGE se v laboratoři používají komerčně vyrobené kity včetně předpřipraveného gelu i barviv k vizualizaci od firmy Invitrogen. Proto byla první separace, enzymatické štěpení v gelu a příprava modelového proteinu k MS analýze provedena na tomto pracovišti. Naředěný modelový enzym AKR1C3 (Tab. 3) byl separován pomocí SDS-PAGE za použití komerčního gelu NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Protein gel. Gel byl posléze vizualizován koloidním CBB-250 pomocí barvícího kitu Novex® Colloidal Blue Staining Kit. Vyříznuté proteinové proužky byly pomocí trypsinu naštěpeny na peptidy a odsoleny na kolonkách Empore™ C18-SD SPE Cartridges. Před vlastní MS analýzou byly vysušené vzorky s peptidovými fragmenty rozpuštěny v 25 µl roztoku 5% ACN s 0,1% TFA a smíchány s matricí v poměru 1:1. Následná MS analýza identifikovala ve vzorcích modelový protein AKR1C3 bez přítomné kontaminace.

Na Katedře biochemických věd (FAF UK) byla v druhém experimentu provedena SDS-PAGE modelového enzymu AKR1C3. Vzorky modelového enzymu byly připraveny dvojkovou koncentrační řadou v rozmezí 1000 až 3,9 ng (Tab. 4). Elektroforetické gely byly

vyrobeny ručně podle tabulky 5 (s. 52) za dodržení zásad práce přípravy vzorku pro MS analýzu (viz 6.1). Po proběhlé elektroforéze byl enzym vizualizován pomocí CBB-250 (Obr. 12) podle Candiana (2004). Enzymatické štěpení proteinu v gelu a příprava vzorku k MS analýze se ale uskutečnila na pracovišti FVZ UO, aby se vyloučila případná kontaminace vzorku během enzymatického štěpení. Ze získaných dat bylo zřejmé, že ve studentské laboratoři při podržení zásad práce v MS čistotě byl připraven gel bez kontaminace keratiny.

Ve třetím experimentu bylo nutné vyloučit, zda vzorky nemohou být kontaminovány při enzymatickém štěpení proteinů v gelu. Proto byly provedeny na Katedře biochemických věd (FAF UK) dvě SDS-PAGE s modelovým enzymem AKR1C3. Vzorky modelového enzymu byly připraveny dvojkovou koncentrační řadou (Tab. 4) ve dvojitém provedení. Gely k elektroforéze byly vyrobeny ručně (Tab. 5) a opět se dodržovalo zásad práce přípravy vzorku pro MS analýzu (viz 6.1). Připravené koncentrační řady vzorků byly podrobeny SDS-PAGE a následně byly gely vizualizovány. První gel byl obarven podle barvícího protokolu Candiana (2004) a druhý gel stříbrem podle Chevalleta (2008). Postup enzymatického štěpení proteinů v gelu a odsolení byly také provedeny v této laboratoři. Získaná data z MS analýzy ukázala, že ke kontaminaci vzorků nedošlo. Z výše prezentovaných výsledků MS analýz se prokázalo, že na Katedře biochemických věd je možné připravit čisté gely a provést celý postup digesce proteinů v gelu bez výrazné kontaminace.

Celý postup přípravy gelů k SDS-PAGE, vizualizace, enzymatické štěpení proteinů v gelu a příprava vzorků k MS analýze byl proveden na pracovišti Katedry biochemických věd (FAF UK) ve třech opakování, aby se potvrdila správnost získaných výsledků z předchozích analýz. Pouze v jednom experimentu se objevily ve vzorcích kontaminace (Obr. 17). Z dalších výsledků MS analýz bylo patrné, že při striktním dodržení zásad práce v MS čistotě, nebyly vzorky ničím kontaminovány a z analýz byla získaná kvalitní data pro následnou identifikaci modelového proteinu AKR1C3.

Zavedený postup byl poté aplikován k identifikaci rekombinantního enzymu získaného z *E. coli* a purifikovaného afinitní chromatografií. V průběhu celého pracovního procesu se dbalo na dodržení zásad práce přípravy vzorku pro MS analýzu (viz 6.1), aby se minimalizovalo riziko kontaminace vzorků. Získané vzorky byly elektroforeticky rozděleny na ručně připraveném polyakrylamidovém gelu (Tab. 5). Po proběhlé SDS-PAGE byl gel vizualizován barvením CBB-250 (Candiano a kol., 2008) a poté byly vyříznuty tři proteinové proužky s molekulovou hmotností v oblasti 37–40 kDa (Obr. 19). Získané vzorky byly následně štěpeny v gelu trypsinem na peptidy a odsoleny na kolonkách Empore^{TM} C18-SD SPE Cartridges. Před MS analýzou byly vysušené vzorky rozpuštěny v 25 μl roztoku 5%

ACN s 0,1% TFA a smíchány s matricí v poměru 1:1. Po proběhlé analýze byla získaná data pomocí vyhledávacího programu porovnávána s daty v databázích. Proteinové proužky byly identifikovány jako enzym AKR1C3 (proužek A) a elongační faktory TU1 a TU2 (proužek B a C) z *E. coli*.

Tato práce se také zabývala vlivem jednotlivých používaných barvících postupů (CBB-G250, stříbra) na detekci proteinů a stanovením nejnižšího limitu detekce metody u modelového enzymu AKR1C3. Barvení pomocí organických barviv je stále populární pro jejich snadné použití, jednoduché protokoly a vysoké citlivosti, i když nelze popřít, že citlivost stříbra je až 100x vyšší. Většinou se přednostňuje spíše barvení CBB-G250 hlavně díky dobré reprodukovatelnosti a jasnému pozadí gelu. Barvením proteinů v gelu CBB-G250 lze běžně dosáhnout citlivosti okolo 30 ng na proteinový proužek. Dle protokolu Candiana (2004) lze dosáhnout citlivosti barvení dokonce 1 ng. Barvení pomocí CBB-G250 stále podléhá modifikacím, aby se zvýšila jeho citlivost (Candiano a kol., 2004). Například Wang (2007) modifikoval CBB-G250 protokol v kroku fixace a tím zvýšil citlivost barvení o 0,1-0,125 % (Wang a kol., 2007). Je jen otázkou, zda takové modifikace má pro praxi zásadní význam.

Stříbření vyniká již výše zmíněnou vysokou citlivostí, jednoduchostí a dobrou dostupností metody. Nicméně je toto barvení sužováno špatnou kompatibilitu s MS. Tento problém je často spojen s přítomností aldehydů v pracovním protokolu. Je zřejmé, že fixace aldehydy (formaldehyd) výrazně zlepšuje samotnou fixaci proteinů v gelu i citlivost barvení, ale zároveň vylučuje další použití obarvených proteinů, v tomto případě identifikaci proteinů pomocí MS. Je proto důležité rozhodnout mezi kvalitou barvení proteinů v gelu a výnosem proteinů získaným v dalším zpracování vzorku, např. štěpení proteinů v gelu, neboť kroky které upřednostňují kvalitu detekce proteinů zároveň snižují detekční limit MS. Díky různým modifikacím tohoto barvení je v dnešní době stříbření v alkalické oblasti zatím nejlepší detekční metodou, která je kompatibilní s MS. Příkladem může být barvící protokol podle Chevalleta (2008), jenž nahrazuje formaldehyd za redukující cukr. Sekvence pokrytí je ale často nižší, což výrazně snižuje zájem o tuto metodu barvení. Dalším aspektem je fakt, že barvení stříbrem silně interferuje s MS u proteinů získaných z elektroforetických gelů. Tyto interference mohou být sníženy odbarvovacím procesem před štěpením proteinů enzymy. Protokol poskytující minimum artefaktů, jenž by ovlivnily MS analýzu, byl napsán Gharahdaghim (1999) (Chevallet a kol., 2006a; Chevallet a kol., 2006b).

Limit detekce metody byl zjišťován v průběhu experimentů, které byly uskutečněny pro zjištění nepřítomností kontaminantů ve vzorku. Limit detekce modelového enzymu AKR1C3

z prvního experimentu, kde bylo použito v průběhu pracovního procesu komerčních kitů od firmy Invitrogen dosahovala 125 ng/band. V druhém experimentu byly použity vlastní ručně připravené gely a barvení GBB-G250 a nejnižší detekční limit byl pro modelový enzym stejný (125 ng/band). Ve třetím experimentu (viz 7.3) byly limity detekce určeny u obou proběhlých SDS-PAGE. U pracovního postupu, kde byly gely obarveny stříbrem se dosáhlo nejnižšího detekčního limitu 500 ng a u gelu obarveném CBB-G250 byl 250 ng/band. Vyšší koncentrace modelového enzymu AKR1C3, která byla detekovaná u gelu barveném CBB-G250, oproti prvnímu a druhému experimentu mohla být způsobená vyššími ztrátami enzymu v krocích před MS analýzou. Výše ztrát se může pohybovat mezi 15-50 % a to v závislostech na vlastnostech proteinů (Grandvogl a kol., 2007). Ke ztrátě peptidu nebo proteinu mohlo dojít během odbarvování gelů, v důsledku nedostatečného zisku peptidů při štěpení trypsinem či neúplné extrakci peptidů.

Na pracovišti Katedry biochemických věd FAF UK byl proveden ještě jeden experiment. Vedla k němu úvaha, zda by se dal přípravou vzorku před MS analýzou snížit detekční limit metody. Na obrázku 16 a 18 je znázorněno, jak ovlivňuje množství enzymu ve vzorku získané hmotnostní spektrum. K experimentu byly použity uchované vzorky ze třetího experimentu (viz. 7.3). Před MS analýzou byly tyto vzorky rozpuštěny pouze v 5 µl matice. Limit detekce se snížil u barvení stříbrem na 250 ng/band a u CBB-250 na 15,6 ng/band. Experiment byl opakován k potvrzení původního výsledku. Z provedených experimentů bylo zřejmé, že rozpuštění vzorku pouze v matrici zlepšuje detekční limit metody u stříbření i u barvení CBB-G250. Celý tento pracovní postup je nutné důkladně otestovat i na dalších enzymech. V případě pozitivních výsledků může být tento postup přípravy vzorků užitečný pro identifikaci nových biotransformačních enzymů přítomných v malém množství.

VI. ZÁVĚR

Tato práce byla věnovaná zavedením pracovního postupu k minimalizaci rizika kontaminace vzorků během jejich přípravy k hmotnostní analýze. Výsledky analýz ukázaly, že se podařilo zavést postup separace proteinů i digesce proteinů v gelu bez přítomnosti kontaminujících látek. Tento postup byl následně úspěšně aplikován k identifikaci enzymu AKR1C3 získaného afinitní chromatografií. Zavedený postup může být využit při identifikaci dalších izolovaných biotransformačních enzymů redukujících karbonylové sloučeniny.

Práce se také zabývala vlivem používaných barvících postupů CBB-G250 a stříbření na detekci proteinů a stanovením nejnižšího limitu detekce modelového enzymu AKR1C3. Limit detekce modelového enzymu byl stanoven na 500 ng/band v případě barvení stříbrem a barvením CBB-G250 se dosáhlo detekčního limitu 250 ng/band. Získané hodnoty nebyly ale postačující, proto se přistoupilo ke změně v postupu přípravy vzorků k MS analýze. Vzorky modelového enzymu AKR1C3 byly připraveny rozpuštěním jen v 5 μl matice. Touto změnou se podařilo snížit limit detekce u barvení stříbrem na 250 ng/band a u CBB-G250 na 15,6 ng/band.

VII. SEZNAM ZKRATEK

1-DE	jednorozněrná elektroforéza
2-DE	dvourozměrná elektroforéza
AC	afinitní chromatografie
AKR	aldo-ketoreduktasa
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
ESI	ionizace elektrosprejem
FAF UK	Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany
IAA	kyselina jodoctová
IAM	jodacetamid
ICAT	izotopově kodované afinitní značky
IEF	izoelektrická fokusace
IR	infračervené
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MeSH	2-mercaptoethanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MudPIT	vícerozměrná proteinová identifikace proteinů
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PAGE	polyakrylamidová elektroforéza
PMF	peptide mass fingerprinting - peptidové mapování
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	N, N, N´, N´tetramethylethylendiamin
TOF	průletový hmotnostní analyzátor
UV	ultrafialové

VIII. POUŽITÉ ZDROJE

Affinity chromatography: principles and methods [online]. 2002. Uppsala: Amersham Biosciences AB, ©2002. 159 s. [cit. 2014-01-23]. Dostupné z: <http://xray.bmc.uu.se/Courses/MPC/literature_files/affinity_chromatography.pdf>.

ALBERTS, B. a kol. 2005. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero. 630 s. ISBN 80-902906-2-0.

ALMÉN, M.S. a kol. 2009. Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC biology* [online]. 2009, vol. **7**, iss. 50 [cit. 2013-11-05]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1741-7007-7-50.pdf>.

ASENJO, J. A. a ANDREWS, B.A. 2008. Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions. *Journal of molecular recognition*. 2008, vol. 22, iss. 2, s. 65-76. ISSN 0952-3499.

BARSKI, O.A., TIPPARAJU, S.M. a BHATNAGAR, A. 2008. The Aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug metabolism reviews*. 2008, vol.40, iss. 4, s. 553-624. ISSN 0360-2532.

BIRINGER R. 2002. *Protocol for a keratin-free environment* [online]. Thermo electron corporation [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: <http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_21631.pdf>.

BREUKER, K. a kol. 2008. Top-down identification and characterization of biomolecules by mass spektrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2008, vol. 19, iss. 8, s. 1045–1053. ISSN 1044-0305.

CAÑAS B. a kol. 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in functional genomics and proteomics*. 2006, vol. 4, iss. 4, s. 295-320. ISSN 1473-9550.

PARKER, C.E., WARREN, M.R. a MOCANU, V. 2010. Mass spectometry for proteomics. In ALZATE, O. *Neuroproteomics* [online]. Boca Raton (Florida): CRC Press [cit. 2013-11-05]. ISBN 978-1-4200-7625-7. Dosstupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56018/>.

CANDIANO, G. a kol. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004, vol. 25, iss. 9, 1327-33. ISSN 0173-0835.

COLLINSOVÁ, M. a JIRÁČEK, J. 2004. Současný vývoj v proteomice. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, č. 12, s. 1112-1118. ISSN 0009-2770.

Commassie. 2013. In *Wikipedie: otevřená encyklopedie* [online]. St. Petesburg (Florida): Wikimedia Foundation, 2001- , strana naposledy edit. 2013-07-29 [cit. 2014-01-29]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Coomassie>.

ČEŠKOVÁ P. a kol. 2006. Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace. *Chemické listy*. 2006, roč. 100, č. 11, s. 974-979. ISSN 0009-2770.

DUDOVÁ, R. 2011. *Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1C3.* Hradec Králové, 2011. 97 s. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Electrophoresis of proteins - SDS-PAGE [online]. [2014]. ExpertsMind: online tutoring company [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://www.expertsmind.com/topic/electrophoresis-of-proteins/sds-page-94215.aspx>.

Exprese rekombinantních proteiů [online]. 2014. Praha: Biologické centrum Akademie věd České republiky, ©2014 [cit. 2014-04-08]. Dostupné z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Exprese-rekombinantnich-proteinu-teoreticky-zaklad.pdf>.

FRIEDECKÝ, B. a LEMR, K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, roč. 20, č. 3, s. 152-157. ISSN 1210-7921.

GAUCI, V.J., WRIGHT, E.P. a COORSSEN, J.R. 2011. Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. *Journal of chemical biology.* 2011, vol. 4, iss. 1, s. 3-29. ISSN 1864-6158.

GHARAHDAGHI F. a kol. 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*. 1999, vol. 20, iss. 3, s. 601-605. ISSN 0173-0835.

GRANDVOGL, B., PLÖSHER, M. a EICHACKER L.A. 2007. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2007, vol. 389, iss. 4, s. 991-1002. ISSN 1618-2642.

GRAVES P.R. a HAYSTEAD T.A. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and molecular biology reviews.* 2002, vol. 66, iss. 1, s. 39-63. ISSN 1092-2172.

GYGI, S.P. a kol. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of* America. 2000, vol. 97, iss. 17, s. 9390–9395. ISSN 0027-8424.

HALE, J.E. a kol. 2004. A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and spectral mass analysis. *Analytical biochemistry.* 2004, vol. 333, iss. 1, s. 174-181. ISSN 0003-2697.

HAVLIŠ, J. a kol. 2005. Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku. *Chemické listy.* 2005, roč. 99, č. 12, s. 896-905. ISSN 0009-2770.

HAYWORTH, D. 2014. *Overview of protein electrophoresis* [online]. Rockford: Thermo Fischer Scientific, ©2014 [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/method/overview-electrophoresis>.

HEDHAMMAR, M., KARLSTRÖM, A.E. a HOBER, S. [2010]. *Chromatographic methods for protein purification* [online]. Stockholm: Royal Institute of Technology, [2010] [cit. 2014-04-08]. Dostupné z: < http://ebookbrowsee.net/chrommethods-pdf-d16138754>.

HOFFMANN, E. de a STROOBANT, V. 2007. *Mass spectrometry: principles and applications.* 3rd ed. Chichester: Wiley. ISBN 978-0-470-03310-4.

HODGE, K. a kol. 2013. Cleaning up the masses: exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS. *Journal of proteomics.* 2013, vol. 88, iss. 100, s. 92-103. ISSN 1874-3919.

HOFFMANN, F. a MASER, E. 2007. Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug metabolism reviews*. 2007, vol. 39, iss. 1, s. 87–144. ISSN 0360-2532.

HUSTOFT, H.K. a kol. 2012. A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics. In LEUNG, H.-Ch.E. (ed). *Integrative Proteomics* [online]. Rijeka (Croatia): Intech [cit. 2014-02-27]. ISBN 978-953-51-0070-6. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/integrative-proteomics/a-critical-review-of-trypsin-digestion-for-lc-ms-based-proteomics>.

CHEN, W.D. a ZHANG, Y. 2012. Regulation of aldo-keto reductases in human diseases. *Frontiers in pharmacology* [online]. 2012, vol. 3, article 35, 6 s. ISSN 1663-9812. Dostupné

z: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/knihovna/Plocha/P%C5%99%C3%ADloha/fphar-03-00035.pdf>.

CHEVALLET, M. a kol. 2006a. Improved mass spectrometry compatibility is afforded by ammoniacal silver staining. *Proteomics*. 2006, vol. 6, iss. 8, s. 2350-4. ISSN 1615-9853.

CHEVALLET M. a kol. 2008. Sweet silver: a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry. *Proteomics*. 2008, vol. 8, iss. 23-24, s. 4853-61. ISSN 1615-9853.

CHEVALLET, M., LUCHE, S. a RABILLOUD, T. 2006b. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols*. 2006, vol. 1, iss. 4, s. 1852–1858. ISSN 1754-2189.

CHMELÍK, J. 2005. Proteomický průvodce. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, č. 12, s. 883-885. ISSN 0009-2770.

KARAS, M. a kol. 1995. Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI-TOF mass spektrometry. *Anaytical chemistry.* 1995, vol. 67, iss. 3, s. 675-679. ISSN 0003-2700.

KÁŠ, J., KODÍČEK, M. a VALENTOVÁ, O. 2006. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 258 s. ISBN 80-7080-586-2.

KELLEHER, N.L. 2004 Top-down proteomics. *Anaytical chmistry.* 2004, vol. 76, iss. 11, s. 196A–203A. ISSN 0003-2700.

KELLER, B.O. a kol. 2008. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2008, vol. 627, iss. 1, s. 71–81. ISSN 0003-2670.

Keratin. 2014. In *Wikipedie: otevřená encyklopedie* [online]. St. Petesburg (Florida): Wikimedia Foundation, 2001- , strana naposledy edit. 2014-01-04 [cit. 2014-03-18]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Keratin.

KINTER M., Sherman N.E. (2000) *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry.* Willey-interscience, New York, USA, p.320. ISBN: 978-0-471-32249-8.

KOVÁŘOVÁ, H. Proteomika v postgenomové době. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, č. 12, s. 886-889. ISSN 0009-2770.

KRÁLOVÁ, B. a kol. 2008. *Bioanalytické metody*. 3. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 254 s. ISBN 978-807080-449-0.

LEE, J. a kol. 2011. High resolution time-of-flight mass analysis of the entire range of intact singly-charged proteins. *Analytical chemistry*. 2011, vol. 83, iss. 24, s. 9406-12. ISSN 0003-2700.

MACKINTOSH, J.A. a kol. 2003. A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2003, vol. 3, iss. 12, s. 2273-2288. ISSN 1615-9853.

MALÁTKOVÁ, P., MASER, E. a WSÓL, V. 2010. Human carbonyl reductases. *Current drug metabolism*. 2010, roč. 11, č. 8, s. 639-58. ISSN 1389-2002.

MARINA, A. a kol. 1999. High-sensitivity analysis and sequencing of peptides and proteins by quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*. 1999, vol. 34, iss. 1, s. 17–27. ISSN 1076-5174.

MERGULHÃO, F.J., SUMMERS, D.K. a MONTEIRO, G.A. 2005. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology advances*. 2005, vol. 23, iss. 3, s. 177-202. ISSN 0734-9750.

MILLER, I., CRAWFORD, J. a GIANAZZA, E. 2006. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics*. 2006, vol. 6, iss. 20, s. 5385-408. ISSN 1615-9853.

MOEBIUS J. a kol. 2005. The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins. *Molecular & cellular proteomics*. 2005, vol. 4, iss. 1, s. 1754-1761. ISSN 1535-9476.

MONTI, M. a kol. 2005. Functional proteomics. *Clinica chimica acta*. 2005, vol. 357, iss. 2, s. 140–150. ISSN 0009-8981.

MORADIAN, A. a kol. 2014. The top-down, middle-down, and bottom-up mass spectrometry approaches for characterization of histone variants and their post-translational modifications. *Proteomics*. 2014, vol. 14, iss. 4-5, s. 489–497. ISSN 1615-9853.

A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily [online]. [2014]. Philadelphia: Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, [cit. 2014-0318]. Dostupné z: <http://www.med.upenn.edu/akr/nomenclature.shtml>.

ONG, S. a kol. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics*. 2002, vol. 1, iss. 5, s. 376-386. ISSN 1535-9476.

PANDEY, A. a MANN, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000, vol. 405, iss. 6788, s. 837-846. ISSN 0028-0836.

PEČ, P. 2008. *Laboratorní cvičení z biochemie.* 3. dopl. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 99 s. ISBN 978-80-244-2138-4.

PETRÁK, J. 2012. *Proteomika – historie a současnost* [online]. Praha [cit. 2014-02-10]. Dostupné z: http://patofyziologie.lf1.cuni.cz/file/69/uvod_do_studia_2012_web.pdf

PLOWMAN, J.E. 2003. The effect of oxidation or alkylation on the separation of wool keratin proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2003, vol. 3, iss. 6, s. 942-950. ISSN 1615-9853.

Polyacrylamide gel electrophoresis. 2014. In *Wikipedi:, the free encyclopedia* [online]. St. Petesburg (Florida): Wikimedia Foundation, 2001- , last modif. on 5 March 2014 [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide_gel_electrophoresis>.

Protein digestion handout [online]. [2014]. Systems Biology Training: educating scientists in omics technologies. Denver (Colorado): National Jewish Health [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://metabolomicstraining.org/Documents/digest_handout.pdf>.

Protein purification strategies [online]. 2014. Uppsala: GE healthcare bio-sciences AB, ©2014 [cit. 2014-04-09]. Dostupné z: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/cs/GELifeSciences/applications/protein-purification-strategies/>.

RIGHETTI, P.G. 2004. Bioanalysis: its past, present, and some future. *Electrophoresis*. 2004, vol. 25, iss. 14, s. 2111–2127. ISSN 0173-0835.

ŘEHULKA, P., ŘEHULKOVÁ, H. a CHMELÍK J. 2007. Měření proteomických dat hmotnostní spektrometrií a jejich bioinformatická interpretace. *Chemické listy*. 2007, roč. 101, č. 4, s. 279-286. ISSN 0009-2770.

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE) [online]. 2009. Brno: Masarykova univerzita. Cheminfo - server chemické sekce: C7300 Metody chemického výzkumu - laboratorní cvičení, poslední aktual. 2009-12-17 [cit. 2014-04-01]. Dostupné z: <http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/EF/SDSPAGE%20kolecko.pdf>.

SEIBERT, V. a kol. 2004. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research. *Pathology, research and practice*. 2004, vol. 200, iss. 2, s. 83–94. ISSN 0344-0338.

SIMPSON, R.J. 2003. *Proteins and proteomics: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, ©2003. 926 s. ISBN 0-87969-554-4.

SKÁLOVÁ, L. a BOUŠOVÁ, I. 2011. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik.* Praha: Karolinum. 162 s. ISBN 978-80-246-1917-0.

SMITH, S.M. 2011. Strategies for the purification of membrane proteins. In WALLS, D. a LOUGHRAN, S.T. (eds.) *Protein chromatography: methods and protocols*. New York: Humana Press. 527 s. ISBN 978-1-60761-912-3. Chapter 29, s. 485-496.

Structural proteomics. 2014. In *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida): Wikimedia Foundation, 2001- , last modif. on 1 March 2014 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Proteomics>.

STULÍK, J. a kol. 2008. *Vybrané kapitoly z molekulární patologie: skripta pro studenty DSP Molekulární patologie*. [Hradec Králové]: Univerzita obrany. 144 s. ISBN 978-80-7231-329-7.

TOMANCOVÁ, A. a kol. 2009. Proteomická analýza nádorových buněk. *Klinická onkologie*. 2009, roč. 22, č. 5, s. 210-217. ISSN 0862-495X.

VAŇKOVÁ, H. 1999. Peptidové mapy. *Chemické listy*. 1999, roč. 93, č. 2, s. 120-127. ISSN 0009-2770.

VAŘILOVÁ, T. 2005. Stacionární fáze v afinitní chromatografii. *Chemické listy*. 2005, roč. 99, č. 8, s. 570-577. ISSN 0009-2770.

VIDOVÁ, V., LEMR, K. a HAVLÍČEK, V. 2008. Současné trendy hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*. 2008, roč. 102, č. 11, s. 957-959. ISSN 1213-7103.

VRZAL, R. 2011. *Interakce xenobiotik s jadernými receptory řídícími expresi biotransformačních enzymů* [online]. Olomouc, 2011. Habilitační práce na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Dostupné z: <http://www.prf.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Vrzal_Radim/Vrzal_R_HabilitacniPrace.pdf>.

WANG, X., LI, X., LI, Y. 2007. A modified Comassie Brilliant Blue staining metods at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnology letters.* 2007, vol. 29, iss. 10, s. 1599-1603. ISSN 0141-5492.

WILKINS, M.R. a kol. 1998. Two-dimensional gel electrophores is for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis*. 1998, vol. 19, iss. 8-9), s. 1501-1505. ISSN 0173-0835.

WILM, M. 2011. Principles of electrospray ionization. *Molecular & cellular proteomics*. 2011, vol. 10, iss. 7, s. M111.009407. ISSN 1535-9476.

WESTERMEIER, R. a MAROUGA, R. 2005. Protein detection metods in proteomics research. *Bioscience reports.* 2005, vol.25, iss. 1-2, s. 19-32. ISSN 0144-8463.

WESTERMEIER, R., NAVEN, T. a HÖPKER, H.-R. 2008. *Proteomics in practice: a guide to successful experimental design.* 2nd, completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH. 482 s. ISBN 978-3-527-31941-1.

XU, B. a kol. 2011. Usage of electrostatic eliminator reduces human keratin contamination significantly in gel-based proteomics analysis. *Journal of proteomics.* 2011, vol. 74, iss. 7, s. 1022-1029. ISSN 1874-3919.

ZHANG, Y. a kol. 2013. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews.* 2013, vol. 113, iss. 4, s. 2343-2394. ISSN 0009-2665.