

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lada Juránková

OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO PROTEOMICKÉ  
VYŠETŘENÍ MOČI V DIAGNOSTICE ONEMOCNĚNÍ  
LEDVIN

Optimization of urinary sample preparation for proteomic  
analysis in kidney disease diagnosis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Přikryl, Ph.D.

Praha 2017

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 17. května 2017

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15 31662A a z projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 371/2017 Ministerstva školství ČR. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Přikrylovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky, které mi pomohly zpracovat tuto diplomovou práci. Děkuji také RNDr. Janě Frýdlové, Ph.D. za cenné rady.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Karlu Harantovi a Mgr. Pavlu Talackovi z Laboratoře hmotnostní spektrometrie, Biocev, UK, kde byla provedena MS analýza.

Díky patří i mé rodině za podporu během mého studia.

## Abstrakt

Tato práce se zabývá optimalizací přípravy vzorků moči před jejich proteomickou analýzou kapalinovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Ačkoliv se proteomická analýza moči provádí řadu let mnoha zavedenými postupy, je často neefektivní z důvodu nízké koncentrace proteinů v moči, kolísání pH a přítomnosti solí, pigmentů a dalších složek moči. Je proto i nadále potřebné vyvíjet nové efektivnější metody přípravy vzorků moči.

Hlavním přínosem této práce je optimalizace metody pro efektivní zakoncentrování proteinů ze vzorku moči využívající paramagnetické mikročástice s vázanými karboxylovými skupinami na povrchu a principu HILIC chromatografie. Tento inovativní postup byl porovnán s rutinní metodou využívající centrifugační filtry (FASP) a s metodou izolace proteinů na celulóзовých magnetických částicích aktivovaných divinylsulfonem.

Metodou využívající paramagnetické mikročástice s vázanými karboxylovými skupinami na povrchu se podařilo pomocí LC-MS/MS identifikovat 856 proteinů z pouhého 0,5 mL moče zdravých dárců. Tato metoda poskytovala srovnatelné výsledky jako standardní metoda FASP v několikanásobně kratší době a s nižšími náklady na analýzu.

## Klíčová slova

paramagnetické mikročástice, proteomika, příprava vzorků, moč, FASP, HILIC

## Abstract

This work is focused on urinary sample preparation before their proteomic analysis by liquid chromatography with mass spectrometric detection. Urinary proteomics is in many cases inefficient due to low urine protein concentration, variations in pH and the presence of high amount of salts, pigments, and other metabolites. These components can interfere with proteomic protocol and with subsequent mass spectrometric analysis. Therefore, there is the need to develop new effective sample preparation method.

The main benefit of this work is the optimization of the method for the effective preconcentration of proteins from urine samples using carboxylate-modified paramagnetic microparticles and the principles of HILIC chromatography. This innovative process was compared with a routine method using centrifugal filters (FASP) and the method based on proteins isolation by divinyl sulfone activated cellulose magnetic particles.

Using carboxylate paramagnetic microparticles, a total of 856 proteins was identified from only 0,5 mL of healthy human urine by LC-MS/MS. This optimized protocol provided comparable results to the standard FASP method in a much shorter time and with a lower cost per analysis.

## Keywords

paramagnetic microparticles, proteomics, sample preparation, urine, FASP, HILIC

## Obsah

1. ÚVOD .....	10
1.1. Cíl diplomové práce .....	11
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
2.1. Proteomika .....	12
2.1.1. Proteomika v diagnostice onemocnění ledvin .....	12
2.2. Metody zpracování vzorků moči .....	14
2.2.1. Precipitace proteinů organickými rozpouštědly .....	14
2.2.2. Ultracentrifugace .....	15
2.2.3. Ultrafiltrace .....	15
2.2.4. Dialýza spojená s lyofilizací .....	15
2.3. Izolace proteinů na magnetických částicích .....	16
2.4. Proteomická analýza s využitím paramagnetických částic a HILIC interakce .....	17
2.4.1. Princip mechanismu HILIC chromatografie .....	18
2.4.2. Paramagnetické mikročástice SpeedBeads s hydrofilním povrchem .....	19
2.5. Magnetické částice Perloza MG200 aktivované divinylsulfonem .....	20
2.6. FASP .....	22
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
3.1. Použité přístroje a zařízení .....	25
3.2. Použité chemikálie .....	25
3.3. Použité roztoky .....	26
3.4. Izolace proteinů na paramagnetických mikročásticích SpeedBeads .....	27
3.4.1. Příprava vzorků .....	27
3.4.2. Obecný postup izolace proteinů na paramagnetických mikročásticích SpeedBeads .....	27
3.4.3. Jednorozměrná SDS-PAGE .....	28
3.4.4. Optimalizace vlivu pH na adsorpci proteinů na paramagnetické mikročástice .....	30
3.4.5. Optimalizace vlivu přídavku acetonitrilu na adsorpci proteinů na paramagnetické mikročástice .....	31
3.4.6. Optimalizace inkubačního času .....	32
3.4.7. Kapacita paramagnetických mikročástic .....	32

3.4.8.	Stanovení koncentrace peptidů pomocí BCA.....	32
3.4.9.	Příprava vzorků izolovaných proteinů na paramagnetických mikročasticích SpeedBeads pro analýzu LC-MS/MS .....	33
3.5.	Postup přípravy vzorků metodou FASP .....	34
3.5.1.	Příprava filtrů.....	34
3.5.2.	Příprava vzorku moči.....	34
3.5.3.	Příprava vzorku koncentráту moči.....	35
3.6.	Postup izolace proteinů na magnetických časticích Perloza MG200 .....	36
3.7.	Přečištění peptidů na špičkách naplněných C18 fází.....	37
3.8.	LC-MS/MS analýza .....	37
3.9.	Zpracování dat .....	37
3.10.	Gene-ontology analýza .....	38
4.	VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE .....	39
4.1.	Izolace proteinů na paramagnetických mikročasticích SpeedBeads .....	40
4.1.1.	Vliv pH .....	40
4.1.2.	Vliv množství přídavku acetonitrilu na velikost adsorpce .....	44
4.1.3.	Optimalizace inkubačního času .....	48
4.1.4.	Shrnutí získaných optimalizovaných podmínek.....	52
4.1.5.	Porovnání metod a statistické zpracování .....	52
4.1.6.	Stanovení koncentrace peptidů metodou BCA a statistické zpracování ..	54
4.2.	LC-MS/MS analýza .....	56
5.	ZÁVĚR.....	68
6.	LITERATURA.....	70

## Seznam zkratek a symbolů

$\lambda$	vlnová délka
BCA	bicinchoninová kyselina
BIS	N',N'-methylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CKD	chronické onemocnění ledvin
CV	variační koeficient
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DVS-Perloza	metoda celulózových částic Perloza MG200 aktivovaných divinylsulfonem
ERLIC	hydrofilní interakční chromatografie s elektrostatickou repulzí
ESI	ionizace elektrosprejem
ESRD	konečné stádium renálního onemocnění
FASP	štěpení na membránovém centrifugačním filtru (filter aided sample preparation)
FDR	míra falešně pozitivních výsledků
GO	gene-ontology analýza
GRAVY	hydrofobicita (Grand Average of Hydropathicity)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
IgA	imunoglobulin A
LC-MS	kapilární chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	kapilární chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
$M_h$	molekulová hmotnost
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
PBS	fosfátový pufr
pI	izoelektrický bod
R	korelační koeficient
SB	metoda paramagnetických mikročástic SpeedBeads
SD	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný



SDS-PAGE	denaturující elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SP3	Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation
TEAB	uhličitan triethylamonný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TOF	analyzátor doby letu

# 1. ÚVOD

Chronická onemocnění ledvin (CKD) v současné době postihuje téměř 10 % populace a jejich výskyt se s věkem výrazně zvyšuje a pravděpodobně se v budoucnu zvýší v souladu se stárnutím obyvatelstva. Léčba konečného stadia renálního onemocnění (ESRD) s renální náhradou (dialýza nebo transplantace) je velmi nákladná a výsledek dialyzovaných pacientů zůstává velmi špatný a kvalita života dialyzovaných pacientů zůstává velmi neuspokojivá. Včasná diagnóza CKD je obtížná, protože CKD může zůstat asymptomatická až do vývoje asymptomatického ESRD. Včasná identifikace a léčba CKD je proto velmi důležitá.

Současně používané biomarkery aktivity nemoci u chronických onemocnění ledvin jsou často velmi nespecifické, s vysokou intra- a inter- individuální variabilitou. Nové biomarkery by měly umožnit lepší a včasnou diagnostiku ve stádiích předcházejících významnému poklesu funkce ledvin. Existuje potřeba identifikovat a potvrdit nové spolehlivé a specifické biomarkery, které by mohly být používány pro sledování pacientů bez nutnosti časté a opakované biopsie.

Moč lze považovat za ideální zdroj biomarkerů, které mohou sloužit k časnému odhalení onemocnění ledvin a popisu prognózy. Odběr vzorků moče je neinvazivní a moč se může sbírat opakovaně ve velkém množství. Současně je močový proteom relativně stabilní po dlouhou dobu.

Mezi nevýhody použití moči pro proteomické analýzy patří často nízká koncentrace proteinů, kolísání pH a také přítomnost solí, pigmentů, ury a dalších složek moči, které mohou interferovat při přípravě vzorků a následné analýze LC-MS.

V literatuře je publikováno několik metod pro odstranění kontaminantů z moči a její zkoncentrování a odsolení. Jako příklad lze uvést precipitaci proteinů za pomoci organických rozpouštědel, ultrafiltraci, ultracentrifugaci a dialýzu ve spojení s lyofilizací.

Bohužel má většina těchto metod řadu nevýhod. Patří mezi ně například nedostatečné odsolení vzorku a použití procedur, které jsou pracné a časově náročné, a které mohou vést k velkým ztrátám vzorku a následně i nedostatečné citlivosti proteomické analýzy.

V této práci byla snaha o eliminaci výše zmíněných nevýhod použitím metody s hydrofilními paramagnetickými mikročásticemi v módu HILIC chromatografie při přípravě vzorků moči před LC-MS analýzou.

## **1.1. Cíl diplomové práce**

Hlavním cílem této diplomové práce bylo optimalizovat podmínky pro izolaci proteinů z moči na hydrofilním povrchu paramagnetických mikročástic s vázanými karboxylovými skupinami.

Dále byla snaha o porovnání této metody s dalšími dvěma standardními metodami přípravy vzorků moči před LC-MS analýzou, kterou je metoda využívající centrifugační membránové filtry (FASP) a metoda izolace proteinů na celulóзовých magnetických částicích.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Proteomika

Proteomika je obor zabývající se systematickou analýzou proteinů z hlediska jejich identity, množství, funkce a protein-proteinových interakcí<sup>1</sup>. Díky proteomice lze popsat celkový proteom organismu a buněčné funkce na úrovni proteinů.

Během posledních let došlo k značnému rozvoji tohoto oboru, především díky rozvoji metod pro separaci bílkovin, jakou je například dvourozměrná gelová elektroforéza a rozvoji metod pro charakterizaci proteinů, jakou je hmotnostní spektrometrie<sup>2</sup>. Právě hmotnostní spektrometrie se stala nenahraditelnou metodou při studiu komplexních biologických vzorků. Za vývoj tzv. měkkých ionizačních technik, které jsou schopny ionizovat netěkavé makromolekuly bez jejich fragmentace, byla v roce 2002 udělena Nobelova cena. Mezi tyto techniky patří ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI)<sup>3</sup>.

Dalším přínosem pro proteomiku bylo zdokonalení kapalinové chromatografie. Spojením kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií lze analyzovat peptidy a proteiny s citlivostí až  $10^{-15}$  mol (cit. <sup>4</sup>).

Tyto metody lze využít k identifikaci proteinů v biologických materiálech jako je krev a moč a rovněž ke hledání specifických biomarkerů některých onemocnění.

Proteomické techniky umožňují studovat proteiny a jejich modifikace, které objasňují buněčné chování, jenž není možno objasnit ani za pomoci genové exprese<sup>5</sup>.

#### 2.1.1. Proteomika v diagnostice onemocnění ledvin

Proteomiku lze v nefrologii využít k identifikaci renálního proteomu, čímž lze lépe pochopit patogenezi onemocnění ledvin a objevit a identifikovat biomarkery akutních i chronických nemocí ledvin. Tyto biomarkery by mohly sloužit ke stanovení prognózy choroby a ke sledování odpovědi na léčbu<sup>6</sup>.

Většina renálních onemocnění probíhá až do konečných stádií nemoci s velmi nespecifickými symptomy. V nefrologii je proto snaha o vývoj včasné neinvazivní diagnózy a monitoringu onemocnění.

Ledviny jsou orgánem, který zprostředkovává spojení dvou, z hlediska zdrojů biomarkerů, důležitých biologických tekutin – krve a moči. Lze tedy zcela neinvazivně sledovat funkční změny v ledvinách porovnáváním příjmu a výdeje ledvin<sup>7</sup>.

Odpadní produkt plazmy je vylučován ledvinami do moči. Denně se v glomerulu filtruje 150-180 litrů plazmy, ze které je tvořena tzv. primární moč. Více než 99 % primární moče je zpětně vstřebáváno v tubulech nefronu a postupně se tak tvoří moč sekundární (cca 1-2 litry denně)<sup>8</sup>.

Moč lze z několika důvodů považovat za lepší zdroj biomarkerů než krev. Pokud si biomarker představíme jako odraz nějaké změny odehrávající se v lidském těle, pak tyto změny budou dříve vykompenzovány v krvi díky přísnějšímu zachování homeostázy, a proto zde budou hůře detekovatelné než v moči<sup>6</sup>.

Krev je dobrým zdrojem těch biomarkerů, které zde zůstávají dostatečně dlouho, aby mohly být včas odebrány. Patří sem biomarkery v podobě protilátek a proteiny s dlouhým poločasem. V případě, že není biomarker včas zachycen v krvi, mohl by být jeho pozůstatek zachycen v moči, žluči, potu či dechu. Vzorek je však potřeba odebírat neustále, a tak je z toho důvodu výhodné odebírat moč<sup>6</sup>.

Moč je filtrátem krve a obsahuje všechny rozpustné biomarkery, jakými jsou malé organické molekuly, mikroRNA a v neposlední řadě proteiny. Vylučovaná moč se skládá z vody, glukózy, soli a ostatních metabolitů, mezi které patří proteiny, které pochází z krve, nebo přímo ze samotné ledviny<sup>9</sup>. Lze předpokládat, že moč obsahuje informace nejen z ledvin, ale i z ostatních orgánů, které získává filtrací plazmy. U zdravého člověka tvoří 70 % renálního proteomu z ledvin a močového měchýře a 30 % představují proteiny filtrované glomeruly z krve. Analýza proteinů z moče by proto mohla poskytnout biomarkery nejen onemocnění vylučovací soustavy (chronické selhání ledvin, nefrotický syndrom, IgA nefropatie, diabetická nefropatie aj.), ale i dalších systémových nemocí<sup>8</sup>.

Mezi další výhody použití moči jako zdroje biomarkerů oproti krvi patří větší stabilita proteinů. Během odběru krve jsou aktivovány proteázy a dochází k proteolytické degradaci vzorku. Moč je oproti tomu možno skladovat až po dobu tří dnů při teplotě 4 °C nebo 6 hodin při pokojové teplotě<sup>10</sup>.

## 2.2. Metody zpracování vzorků moči

Moč je komplexní biologický vzorek obsahující vysoký obsah solí, nízkomolekulárních látek a metabolitů. Proteomická analýza proto může být obtížná. V posledních letech je snaha o vývoj vhodných metod pro přípravu vzorků moči, které by eliminovaly vliv výše zmíněných složek na analýzu.

Mezi další nevýhody analýzy bílkovin v moči patří často velmi nízká koncentrace proteinů.

Bylo vytvořeno mnoho metod, které jsou schopny vzorek moče zkoncentrovat a odstranit přítomné nízkomolekulární látky. Patří sem precipitace proteinů za pomoci organických rozpouštědel, ultracentrifugace, ultrafiltrace a dialýza ve spojení s lyofilizací<sup>11</sup>.

Avšak z důvodu variability fyzikálních a chemických vlastností proteinů je nepravděpodobné, že by se použitím jedné metody izolace proteinů podařilo identifikovat všechny proteinové komponenty vzorku<sup>12</sup>.

### 2.2.1. Precipitace proteinů organickými rozpouštědly

Precipitace za pomoci organických rozpouštědel je hojně využívaná proteomická metoda. Organické rozpouštědlo je schopno porušit hydratační obal molekul proteinů, čímž se proteiny shlukují a jejich srážení je velmi efektivní. Ve srovnání s ostatními metodami je precipitace proteinů časově méně náročná. Další výhodou je možnost použití většího objemu moči<sup>13</sup>.

Mezi používaná rozpouštědla se řadí např. aceton, acetonitril, kyselina trichloroctová, chloroform, ethanol, methanol a sulfid amonný (v koncentraci 10-90%) (cit. <sup>14</sup>).

Dle studie Khana et al.<sup>13</sup> je precipitace proteinů z moči nejefektivnější při použití acetonitrilu (při poměru moči k roztoku organického rozpouštědla 1:5). Při této metodě zaznamenal menší proteinové ztráty ve srovnání s ultrafiltrací a dialýzou.

Court. M. et al.<sup>15</sup> získal největší proteinový výtěžek při precipitaci pomocí 6% kyseliny trichloroctové.

Podle některých prací, je precipitace za použití organického rozpouštědla resp. acetonitrilu považována za vhodnou pro aplikaci na moč pacientů s proteinurií

nebo při použití většího objemu moči. Poskytuje tak větší množství proteinových skvrn při separaci dvourozměrnou elektroforézou, ale menší proteinový výtěžek ve srovnání s ostatními používanými metodami<sup>14</sup>.

### **2.2.2. Ultracentrifugace**

Analytická ultracentrifugace využívá sedimentace proteinů s velkou hustotou. Thongboonkerd et al.<sup>12</sup> použil tuto metodu pro izolaci proteinů z moče zdravých dárců. Rovněž k izolaci použil metodu srážení proteinů organickými rozpouštědly. Obě metody byly porovnány. Proteiny byly separovány pomocí dvoudimenzionální polyakrylamidové elektroforézy a identifikovány za pomoci MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Ultracentrifugací se podařilo izolovat více hydrofobních a membránových proteinů než při precipitaci acetonitrilem. Mezi největší nevýhody ultracentrifugace patří cena používaného materiálu. Dále jsou to velké ztráty acidických proteinů<sup>12</sup>.

### **2.2.3. Ultrafiltrace**

Tato metoda využívá ultrafiltrační membrány k odstranění malých molekul a zkoncentrování proteinů z moči podle jejich molekulové hmotnosti<sup>16</sup>. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.1., Court. M. et al.<sup>15</sup> zhodnotil ultrafiltraci jako méně účinnou metodu v porovnání s precipitací pomocí 6% trichloroctové kyseliny.

Ultrafiltrace je vhodná metoda pro izolaci proteinů s nižší molekulovou hmotností<sup>15</sup>. Její nevýhodou jsou nespecifické adsorpce peptidů a proteinů na materiál filtrační membrány.

### **2.2.4. Dialýza spojená s lyofilizací**

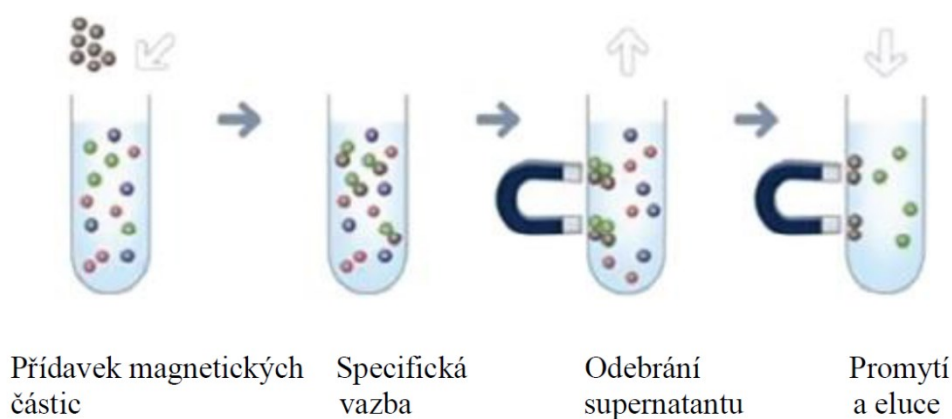
Dialýza ve spojení s lyofilizací představuje často používanou metodu pro přípravu proteinů v moči. Pomocí dialýzy lze odstranit všechny interferující molekuly. Následná lyofilizace (bez frakcionace) proteiny zkoncentruje<sup>17</sup>. Oproti tomu Thongboonkerd et al.<sup>14</sup> poukázal na fakt, že ačkoli dialýza s lyofilizací poskytuje velmi dobrý proteinový výtěžek, tak ve srovnání s ultracentrifugací, ultrafiltrací a precipitací

za pomoci organických rozpouštědel, poskytuje nejmenší množství proteinových skvrn při separaci dvourozměrnou elektroforézou.

### 2.3. Izolace proteinů na magnetických částicích

Magnetické nano- a mikročástice našly uplatnění v biologických oborech, medicíně a environmentální technologii. V poslední době je mnoho typů těchto částic i komerčně dostupných<sup>18</sup>. Magnetické nosiče jsou většinou složeny z materiálu s fero- či ferimagnetickou složkou (mezi používané materiály patří magnetické oxidy železa, magnetit či maghemit), která interaguje s vnějším magnetickým polem a složkou diamagnetickou, která interaguje s biologickými systémy<sup>19</sup>.

Princip separace na magnetických nosičích je jednoduchý (**Obr. 2.1**). Magnetické částice mající afinitu k izolované struktuře (např. proteinům) jsou smíchány se vzorkem obsahujícím cílové sloučeniny. Vzorkem může být buněčný lyzát, krev, moč a další. Následuje inkubace, kdy dochází k navázání cílových struktur na povrch magnetických částic. Pomocí magnetického separátoru lze pak jednoduše odebrat supernatant od komplexu magnetických částic s adsorbovanými sloučeninami. Po promytí částic a zbavení se kontaminantů mohou být izolované cílové struktury eluovány a dále využity<sup>20</sup>.



**Obr. 2.1** Princip separace na magnetických částicích. Převzato a upraveno z Albertoni et al.<sup>21</sup>



Magnetické separační techniky mají několik výhod ve srovnání se standardními metodami. Samotný proces separace se sestává z několika kroků. Všechny kroky včetně čištění lze provést v jedné zkumavce. Jde tedy o časově nenáročnou metodu. Ve srovnání s ostatními technikami je separace na magnetických nosičích levná metoda, jelikož není zapotřebí žádný chromatografický systém či použití filtrů<sup>20</sup>.

Na magnetických částicích je možno imobilizovat mnoho bioaktivních látek. Imobilizaci lze provést různými způsoby, přičemž nejčastější je tzv. kovalentní imobilizace. Nosič obsahuje funkční skupiny (NH<sub>2</sub>, COOH, CONH<sub>2</sub>, OH, SH), které jsou předem aktivovány vhodnými činidly<sup>19</sup>.

Volné peptidy a proteiny mohou být přímo izolovány z různých biologických materiálů. Membránové proteiny je nutno předem rozpustit ve vhodném detergentu<sup>22</sup>.

## **2.4. Proteomická analýza s využitím paramagnetických částic a HILIC interakce**

V posledních letech je v proteomických studiích snaha o zdokonalení analýzy MS. Jak již zde bylo zmíněno, největším přínosem bylo vyvinutí měkkých ionizačních technik v samotné hmotnostní spektrometrii. Dalším zdokonalením proteomické MS analýzy by mohlo být zjednodušení, optimalizace a miniaturizace metod příprav vzorku<sup>23</sup>.

Hughes et al.<sup>23</sup> vyvinul metodu, kterou lze specificky vázat proteiny a peptidy. Tato metoda je tvořena jednoduchým postupem, který probíhá pouze v jedné zkumavce. Principem je imobilizace proteinů a peptidů na paramagnetických částicích s hydrofilním povrchem s navázanými karboxylovými skupinami. Imobilizace je uskutečněna za pomoci přídavku organického činidla a mechanismu podobného hydrofilní interakční chromatografii (HILIC). Přídavek organického rozpouštědla do vodného roztoku s obsahem paramagnetických částic umožňuje zachycení proteinů a peptidů v solvatační vrstvě na hydrofilním povrchu částic.

Po navázání proteinů a peptidů na povrchu částic lze částice za pomoci magnetického separátoru promýt vhodnými roztoky. Dle Hughes et al.<sup>23</sup> se jeví jako nejefektivnější promývací roztoky 70% roztok ethanolu a 100% acetonitril. Tato metoda

se vyznačuje vysokou výtěžností a je kompatibilní s celou řadou běžně používaných proteomických činidel jako jsou detergenty, soli, rozpouštědla a redukční a alkylační činidla.

#### **2.4.1. Princip mechanismu HILIC chromatografie**

Specifické navázání proteinů a peptidů na povrch paramagnetických částic probíhá na stejném principu jako hydrofilní interakční chromatografie (HILIC).

HILIC je vysokoúčinný přístup v kapalinové chromatografii sloužící k separaci polárních sloučenin<sup>24</sup>. Termín HILIC byl poprvé použit Alpertem<sup>25</sup> v roce 1990.

HILIC může být využita k separaci molekul o malé molekulové hmotnosti, jako jsou peptidy a sacharidy se selektivitou srovnatelnou s jinými chromatografickými módy<sup>26</sup>.

HILIC využívá kombinace polární stacionární fáze a mobilní fáze obsahující víc než 60 % organického solventu mísitelného s vodou (nejčastěji acetonitril nebo aceton). Obsah vody v mobilní fázi je minimálně 3 %.

Mechanismem separace je hydrofilním dělení polárních sloučenin mezi mobilní fázi a vrstvu bohatou na obsah vody, která se utvoří na povrchu stacionární fáze. Na mechanismu se mimo hydrofilních interakcí podílí další interakce v závislosti na složení mobilní a stacionární fáze a povaze analytu. Patří sem především iontové interakce, dipol-dipol interakce a v neposlední řadě i vodíkové můstky a elektrostatické interakce, které hrají hlavní roli při zadržování peptidů a proteinů na stacionární fázi<sup>27</sup>.

V proteomice má HILIC univerzální využití při analýze proteinů a jejich modifikací. Zachycení hydrofilních sloučenin na povrchu stacionární fáze lze efektivně využívat především při analýze fosforylovaných a glykovaných peptidů<sup>28</sup>.

#### 2.4.2. Paramagnetické mikročástice SpeedBeads s hydrofilním povrchem

V této diplomové práci byly využity komerčně dostupné paramagnetické mikročástice Sera-Mag SpeedBead o průměru 1  $\mu\text{m}$ . Mikročástice mají hydrofilní povrch, na kterém jsou navázány karboxylové skupiny.

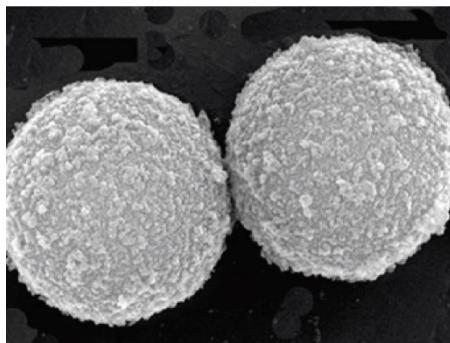
Karboxylové skupiny umožňují vazbu s analyzovanými bioaktivními molekulami a zároveň limitují nespecifické vázání dalších molekul. Struktura paramagnetických mikročástic je zobrazena v **Obr. 2.2**.

Mikročástice mají styrenové jádro a dvě vrstvy magnetitu (celkový obsah magnetitu je 60 %). Průměrná hustota částic je  $2.0 \text{ g/cm}^3$  (cit. <sup>29</sup>).



**Obr. 2.2** Struktura paramagnetických částic SpeedBeads. Převzato a upraveno z internetových stránek výrobce Thermo Scientific<sup>29</sup>.

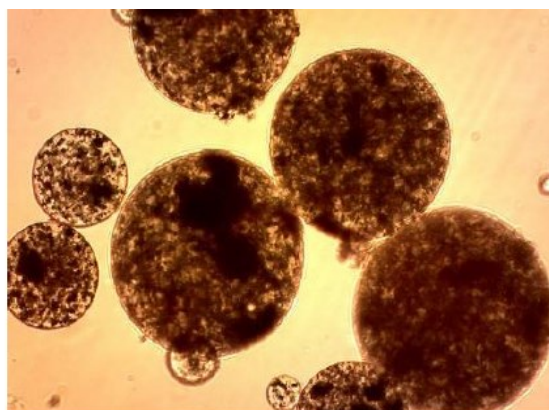
Potenciální využití těchto mikročástic (**Obr. 2.3**) je široké. Dají se aplikovat při přípravě vzorků, proteomických analýzách, izolaci nukleových kyselin a imunologických studiích.



**Obr. 2.3** Paramagnetické mikročástice SpeedBeads. Převzato z internetových stránek GE Healthcare Life Sciences<sup>30</sup>.

## **2.5. Magnetické částice Perloza MG200 aktivované divinylsulfonem**

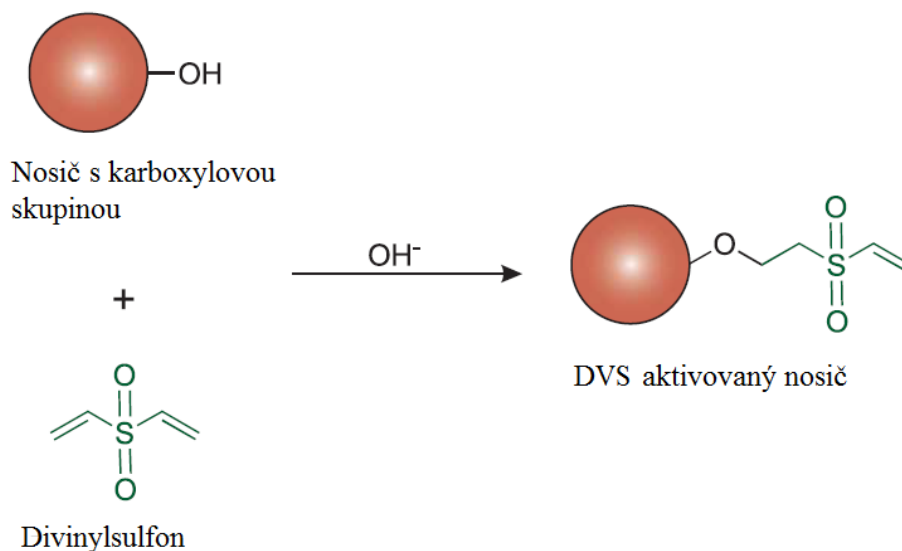
V této diplomové práci byly použity magnetické částice Perloza MG200 (**Obr. 2.4**), které jsou vyrobeny z perlové celulózy. Objem celulózové vrstvy je 13-16 mL g<sup>-1</sup>. Částice rovněž obsahují inertní magnetický materiál (obsah magnetické složky max. 30 % v sušině), díky kterému je možné separovat analyty na povrchu částic (viz. kapitola 2.3). Velikost částic je 30-50 μm. Částice byly před použitím aktivovány divinylsulfonem.



**Obr. 2.4** Magnetické celulózové částice Perloza MG200. Převzato z internetových stránek výrobce Perloza<sup>31</sup>.

Divinylsulfon je bifunkční sloučenina, kterou lze použít k aktivaci matric s hydroxylovými skupinami pro navázání širokého spektra afinitních ligandů<sup>32</sup>.

Navázání divinylsulfonu na nosič probíhá přes jednu dvojnou vazbu vinylu Michealovou adicí, přičemž druhý konec molekuly s vinylem na konci zůstává volný (**Obr. 2.5**). Výsledné vinylsulfonové reaktivní skupiny lze skladovat ve vodném roztoku<sup>32</sup>.



**Obr. 2.5** Aktivace divinylsulfonem. Převzato a upraveno z Glazer et al.<sup>32</sup>

Nosiče aktivované divinylsulfonem mohou být použity k navázání ligandů obsahujících nukleofilní thiolové, amino nebo hydroxylové skupiny. Vysoce aktivované nosiče mohou vázat proteiny v koncentraci až 30-50 mg mL<sup>-1</sup> v závislosti na reaktivitě proteinů<sup>32</sup>.

Ligandy obsahující thiolovou skupinu patří mezi nejvíce reaktivní. Jsou schopny vázat se na vinylsulfonové skupiny divinylsulfonu při pH 6 až 8 za tvorby stabilní thioetherové vazby. Analyty obsahující aminové skupiny mohou být rovněž imobilizovány na povrchu aktivovaného nosiče ve vyšším pH v rozmezí 8 až 10. Ligandy obsahující hydroxylovou skupinu jako jsou sacharidy, polysacharidy a glykany, se váží na povrch aktivovaných nosičů při pH vyšším než 10 za tvorby etherové vazby<sup>32</sup>.

Aktivace divinylsulfonem je účinná taktéž při stabilizaci enzymů díky kovalentní vazbě. Santos et al.<sup>33</sup> využil divinylsulfon k aktivaci agarosových částic, kdy se divinylsulfon váže křížově na agarosu. Pozoroval vysokou stabilitu aktivovaných částic, a to i při skladování při 36 °C po dobu dvou měsíců. Rovněž při 24 hodinové inkubaci při pH v rozmezí 4,0-10,5 při 25 °C.

V afinitní chromatografii má aktivace divinylsulfonem široké uplatnění. Gely aktivované divinylsulfonem jsou reaktivnější než ty, které jsou aktivovány epoxy skupinami. Reakce proto probíhají rychleji<sup>34</sup>. Současně vykazují materiály aktivované divinylsulfonem vysoký stupeň stability a vydrží v aktivované formě dlouhou dobu.

Kopylov et al.<sup>35</sup> teoreticky popsal a prakticky testoval, že koncentrační detekční limit proteinů může být až o tři řády nižší, pokud se zkoncentrují na CNBr-aktivovaných Sepharose částicích nespecifickou kovalentní ireverzibilní vazbou ze zředěné matrice vzorku.

Zdravá moč je nativně zředěná matrice a koncentrace jsou zde o tři řády nižší než u vzorků krevního séra. Proto byla snaha o spojení výhod imobilizace proteinů na divinylsulfonem aktivovaných magnetických částicích a výhody principu obohacení proteinů ireverzibilní kovalentní vazbou ze zředěných vzorků.

## 2.6. FASP

FASP (Filter Aided Sample Preparation) je metoda využívající centrifugační filtry (**Obr. 2.6**), na kterých dochází k separaci peptidů od vysokomolekulárních látek. Tato metoda je v proteomice v poslední době hojně používána.



**Obr. 2.6** Filtr 50k. Převzato z internetových stránek výrobce Sartorius<sup>36</sup>.

Metoda kombinuje techniky štěpení vzorku v gelu a v roztoku pro následnou proteomickou analýzu hmotnostní spektrometrií<sup>37</sup>.

Při technice štěpení v gelu je nejprve k proteinům přidán vhodný detergent, následuje separace proteinů pomocí SDS-PAGE, přičemž lze získané polyakrylamidové gely obarvené stříbrem enzymaticky štěpit a výsledné peptidy lze analyzovat a sekvenovat pomocí hmotnostní spektrometrie<sup>38</sup>. Mezi výhody této techniky patří robustnost vůči nečistotám ve vzorku, které mohou interferovat při samotném štěpení. Nevýhodou je problémová automatizace této metody<sup>37</sup>.

Štěpení v roztoku nevyžaduje použití detergentu. Namísto toho je použito chaotropní činidlo jakým je urea nebo thiourea a enzymatické štěpení probíhá za denaturujících podmínek. Rozpouštění však bývá často nekompletní, a proto může štěpení ovlivňovat přítomnost nečistot ve vzorku<sup>37</sup>.

Detergent v podobě SDS je velmi vhodným činidlem při rozpouštění buněk a tkání. Přesto je jeho nevhodná při následné MS analýze. I v malé koncentraci může díky jeho snadné ionizaci a velkému nadbytku oproti přítomným peptidům, značně interferovat v analýze MS, proto je snaha o jeho celkové odstranění ze vzorku<sup>37</sup>. K odstranění detergentů z membránových proteinů lze při štěpení v roztoku využít 8 mol L<sup>-1</sup> roztok ury<sup>39</sup>.

S využitím těchto poznatků vyvinul Wisniewski et al.<sup>37</sup> metodu FASP. V této metodě je nejprve vzorek rozpuštěn v 4% SDS a poté jsou zadrženy a zakoncentrovány na membráně filtru pomocí ultrafiltračního zařízení. Filtrační jednotka tak plní funkce odstraňování detergentu, výměnu pufru, chemickou modifikaci a štěpení proteinů. Tato metoda se sestává ze čtyř důležitých kroků. Prvním krokem je odstranění interferujících molekul o malé hmotnosti. Dalším krokem je karbamidomethylace thiolů. Následuje enzymatické štěpení proteinů a nakonec eluce peptidů<sup>37</sup>.

Důležitou vlastností membrány filtru je schopnost zadržovat vysokomolekulární látky jako jsou proteiny a DNA a naopak propouštět látky o menších molekulových hmotnostech, jakými jsou nečistoty při promývání, či následně štěpené peptidy. Je proto klíčové vybrat filtr s definovanou velikostí pórů. Výše uvedené metodě byly testovány filtry o relativní molekulové hmotnosti do 3 000 Da (3k filtr) a 10 000 Da (10k filtr)<sup>37</sup>.

Yu, Y. B. et al.<sup>40</sup> modifikoval metodu FASP pro použití na 96jamkové destičce s filtry. Metodu nazvali 96FASP. Z roztoku moči obsahující celkové množství ~ 10 µg proteinů se podařilo spojením metody 96FASP s LC-MS identifikovat průměrně 700-900 proteinů. Tuto metodu aplikovali i na pelety močových lyzátů, které mají úzkou spjitost s infekcí močových cest. Nakonec se v průměru podařilo během pěti experimentů identifikovat 1 700 (±398) proteinů<sup>40</sup>.

Rovněž Erde et al.<sup>41</sup> zdokonalil metodu FASP přidáním vhodných alternativních reagentů. Například namísto pufru s obsahem urey použil 0,2% roztok deoxycholové kyseliny. Tento přídavek zvýšil účinnost štěpení trypsinem. Použití 5% roztoku TWEEN-20 pro pasivaci aktivních míst na membráně filtru snížilo peptidové ztráty až o 300 %. Metodu nazval eFASP (enhanced FASP)<sup>41</sup>.



## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Použité přístroje a zařízení

analytické váhy XT 120 A (Precisa, Švýcarsko)

váhy BL 510 (Sartorius, Německo)

milli-Q systém (Millipore Corporation, USA)

magnetický separátor (Bruker Daltonics, Německo)

elektroforetická komora Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD, USA)

Vortex Mixer MixMate (Eppendorf, Německo)

inkubátor INB (Mettler, Německo)

termoblok AccuBlock™ (Labnet International, Inc., USA)

spektrofotometr Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Multiskan MCC Type 355 Microplate reader (Thermo Fisher Scientific, USA)

vakuová odparka Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo)

centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)

Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Německo)

Vivacon 500 centrifugační ultra filtry, 30 000 MWCO HY (Sartorius, Německo)

filtr Amicon Ultra-15 (10 kDa) (Millipore, ČR)

scanner Epson Perfection V800 (Epson, ČR)

špičky naplněné C18 fází (Agilent Technologies, USA)

indikátorové pH papírky (Sigma-Aldrich, ČR)

### 3.2. Použité chemikálie

lidská moč zdravých dárců (1.LF UK, ČR)

celulózové magnetické částice Perloza MG200, 30-50  $\mu\text{m}$  (PERLOZA s.r.o., ČR)

paramagnetické mikročástice Sera-Mag SpeedBeads Carboxylate-Modified Magnetic Particles, polystyrenové jádro 1  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, USA)

ethanol (Penta, ČR)

acetonitril (Merck, ČR)

deoxycholát sodný (Amresco, USA)  
fosfátový pufr (Amresco, USA)  
glycin (Sigma-Aldrich, ČR)  
Tween 20 (Amresco, USA)  
kyselina mravenčí (Merck, ČR)  
chlorid sodný (Penta, ČR)  
2-propanol (Roth, Německo)  
trifluoroctová kyselina (Fluka, ČR)  
merkptoethanol (Fluka, ČR)  
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) (Sigma-Aldrich, ČR)  
ethanolamin (Sigma-Aldrich, ČR)  
urea (Sigma-Aldrich, ČR)  
bilirubin (Roth, Německo)  
dithiotreitol (Sigma-Aldrich, ČR)  
hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, ČR)  
Precision Plus Protein Dual Standards (BIO-RAD, USA)  
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) (BIO-RAD, USA)  
Tris-base (Amresco, USA)  
dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, ČR)  
TEAB (uhličitan triethylamonný) (Fluka, ČR)  
Trypsin Gold, MS grade (Promega, USA)  
barva Imperial Protein Stain (Thermo Fisher Scientific, USA)  
akrylamid (Sigma-Aldrich, ČR)  
N,N'-methylenbis(akrylamid) (Sigma-Aldrich, ČR)

### **3.3. Použité roztoky**

elektrodový pufr: (10x) pH 8,3 (0,250 mol L<sup>-1</sup> Tris-base, 1,918 mol L<sup>-1</sup> glycin, 1% w/v SDS)

vzorkový pufr 4 × koncentrovaný: (4% w/v SDS, 0,126 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 20% v/v glycerol, 10% v/v merkptoethanol, 0,006% v/v bromfenolová modř)

### **3.4. Izolace proteinů na paramagnetických mikročasticích SpeedBeads**

#### **3.4.1. Příprava vzorků**

Při všech experimentech byla jako vzorek použita lidská moč zdravých dárců. Moč byla centrifugována  $3\,000 \times g$  po dobu 30 min při  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant moče byl odebrán do nové zkumavky a moč byla následně uchovávána při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Před každou analýzou byla moč (1 mL) rozmrazena při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a její pH bylo upraveno přidávkem  $10\text{ }\mu\text{L}$   $1\text{ mol L}^{-1}$  HEPES pufru o pH 7,4. Poté byly proteiny v moči zredukovány přidávkem  $10\text{ }\mu\text{L}$  roztoku  $1\text{ mol L}^{-1}$  dithiothreitolu v  $0,05\text{ mol L}^{-1}$  HEPES pufru (výsledná koncentrace byla  $0,1\text{ mol L}^{-1}$ ). Redukce vzorku probíhala po dobu 30 min při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byla provedena alkylace zredukováných proteinů použitím  $20\text{ }\mu\text{L}$  roztoku  $1\text{ mol L}^{-1}$  iodacetamidu v  $0,05\text{ mol L}^{-1}$  HEPES pufru (výsledná koncentrace byla  $0,02\text{ mol L}^{-1}$ ). Alkylace probíhala ve tmě po dobu 45 min za laboratorní teploty.

#### **3.4.2. Obecný postup izolace proteinů na paramagnetických mikročasticích SpeedBeads**

Příprava vzorku na izolaci proteinů na paramagnetických mikročasticích byla provedena modifikovanou metodou podle Hughese et al.<sup>23</sup>.

Pro optimalizaci podmínek izolace proteinů byly použity komerčně dostupné paramagnetické mikročastice SpeedBeads s hydrofilním povrchem s navázanými karboxylovými skupinami.

Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci  $10\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$  usazených částic, který byl uchováván při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Všechny experimenty byly prováděny v mikrozkuvkách LoBind o objemu 2 mL.

Pro optimalizaci podmínek izolace proteinů bylo zvoleno  $50\text{ }\mu\text{g}$  mikročastic (tj.  $5\text{ }\mu\text{L}$  ze zásobního roztoku o koncentraci  $10\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$ ) a  $500\text{ }\mu\text{L}$  moče ( $\sim 15\text{ }\mu\text{g}$  proteinů, stanoveno Bradfordovou metodou) v  $0,05\text{ mol L}^{-1}$  HEPES pufru o pH 7,4.

Do mikrozkušavky bylo nejprve pipetováno 5  $\mu\text{L}$  mikročástic ze zásobního roztoku. Částice byly následně za pomoci magnetického separátoru dvakrát promyty 500  $\mu\text{L}$  deionizované vody. K promytým paramagnetickým mikročásticím bylo přidáno 1000  $\mu\text{L}$  reakčního roztoku, obsahující acetonitril (v konečném množství 10-70 %) a 500  $\mu\text{L}$  vzorku moči. Reakční roztok byl okyselen za pomoci kyseliny mravenčí, nebo kyseliny trifluoroctové (v rozmezí pH 1-5).

Suspenze paramagnetických mikročástic a reakčního roztoku byla inkubována za stálého třepání (800 rpm) při laboratorní teplotě po dobu 18 min. Po umístění mikrozkušavek na magnetický separátor, probíhala inkubace další 2 min, během nichž se paramagnetické mikročástice separovaly ze suspenze zachycením na stěně mikrozkušavky pomocí magnetu.

Poté byl reakční roztok odebrán a paramagnetické mikročástice s adsorbovanými proteiny byly dále promyty dvakrát 1000  $\mu\text{L}$  70% ethanolu po dobu 30 s z důvodu odstranění solí a pigmentů. Nakonec byly mikročástice dehydratovány 400  $\mu\text{L}$  100% acetonitrilu po dobu 10 s.

Pro následnou SDS-PAGE byly adsorbované proteiny na paramagnetických mikročásticích eluovány 20  $\mu\text{L}$  4 $\times$  koncentrovaného vzorkového pufru (4% m/v SDS, 0,126M Tris-HCl, 20% v/v glycerol, 10% v/v merkaptoethanol, 0,006% v/v bromfenolová modř).

### **3.4.3. Jednorozměrná SDS-PAGE**

#### **Příprava vzorků**

K eluátu proteinů (20  $\mu\text{L}$ ) v 4 $\times$  koncentrovaném vzorkovém pufru byly přidány 2  $\mu\text{L}$  2-merkaptoethanolu. Po promíchání byly vzorky 10 min inkubovány při 95  $^{\circ}\text{C}$  a poté centrifugovány 90 s při 13,2 rpm. Následně byl roztok vzorku odebrán od mikročástic pomocí magnetického separátoru a nanesen na elektroforézu (22  $\mu\text{L}$  vzorku/jamka).

#### **Příprava gelu**

Pro elektroforézu byl zvolen T10% C3,4% separační polyakrylamidový gel a T4% C3,4% zaostřovací gel (**Tab. 3.1**). Nejprve byla sestavena aparatura pro přípravu

gelu podle výrobce (BioRad). Mezi skla bylo pipetováno 4,6 mL separačního gelu, který byl převrstven 250  $\mu$ L 2-propanolu. Separační gel polymerizoval 45 min při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí gelu byl odstraněn 2-propanol. Následně byl pipetován zaostřovací gel po okraj kratšího skla a ihned byl umístěn hřebínek pro tvorbu jamek. Zaostřovací gel polymerizoval po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Poté z něj byl vysunut hřebínek a jamky byly propláchnuty elektroforetickým pufrem.

**Tab. 3.1** Příprava zaostřovacího a separačního gelu pro SDS-PAGE

	Zaostřovací gel	Separační gel
50% akrylamid/N,N'-metylenbis (akrylamid) (29:1)	250 $\mu$ L	1,250 mL
1M Tris-HCl, pH 8,8	-	2,350 mL
0,375M Tris-HCl, pH 6,8	1,050 mL	-
10% SDS	31,25 $\mu$ L	62,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	1,575 mL	2,450 mL
10% persíran amonný	250 $\mu$ L	156 $\mu$ L
TEMED	1,25 $\mu$ L	1,56 $\mu$ L

Gely byly poté opláchnuty destilovanou vodou a umístěny do Mini-PROTEAN Tetra Cell. Jako elektrodový pufř byl použit 10 $\times$  Tris-Glycine-SDS pH 8,3. Elektrodový pufř byl nalit mezi gely po horní okraj delšího skla a do 1/3 elektroforetické komory.

### **Elektroforetická separace**

Na gel byly nanášeny 3  $\mu$ L standardu Precision Plus Protein Standard (BIO-RAD, USA) o známých molekulových hmotnostech a do jednotlivých jamek vzorky. Poté byla komora uzavřena víkem s elektrodami, které byly napojeny na zdroj.

Pro elektroforetickou separaci bylo zvoleno konstantní napětí 125 V. Separace proteinů byla ukončena, když bromfenolová modř značící čelo elektroforézy dosáhlo konce gelu. Gely byly vyjmuty ze skel a opláchnuty destilovanou vodou. Po odříznutí zaostřovacího gelu byly proteiny detekovány barvou - Imperial Protein Stain. Během barvení byl gel pomalu míchán. Nejprve byl gel promyt třikrát 5 min ve 20 mL

deionizované vody a poté inkubován v 15 mL barvy Imperial Protein Stain/gel po dobu 2 h. Nakonec byl gel odbarven opakovaným promytím deionizovanou vodou. Následně byl gel naskenován pomocí scanneru Epson Perfection V800 a denzitometricky vyhodnocen pomocí programu Image Studio Lite Ver 5.2 od firmy Licor.

#### 3.4.4. Optimalizace vlivu pH na adsorpci proteinů na paramagnetické mikročástice

Optimalizace pH byla provedena testováním vlivu různého množství přídavku kyseliny k reakčnímu roztoku na adsorpci proteinů na paramagnetické mikročástice. Reakční roztok byl okyselen pomocí přídavku kyseliny mravenčí, nebo přídavku kyseliny trifluoroctové. Optimalizace byla provedena dle postupu v kapitole 3.4.2. Bylo použito konstantní množství mikročástic 50  $\mu\text{g}$  a 500  $\mu\text{L}$  vzorku moči. Složení reakčního roztoku, včetně pH suspenze paramagnetických mikročástic, vzorku moče a reakčního roztoku, popisuje **Tab. 3.2**.

Vzorky byly po přípravě (viz. kapitola 3.4.3.) separovány pomocí SDS-PAGE.

**Tab. 3.2** Složení reakčního roztoku pro optimalizaci vlivu pH

	Vzorek moči ( $\mu\text{L}$ )	Acetonitril (%)	$\text{CF}_3\text{COOH}$ ( $\mu\text{L}$ )	$\text{HCOOH}$ ( $\mu\text{L}$ )	pH
Metoda s přídavkem	500	50	-	0,5	4,5
HCOOH	500	50	-	1,5	3,5
	500	50	-	2,5	3
	500	50	-	3,5	3
	500	50	-	4,5	3
	500	50	-	5,5	2,5
	500	50	-	6,5	2,5
Metoda s přídavkem	500	10	4	-	3,5
$\text{CF}_3\text{COOH}$	500	10	5	-	3,5
	500	10	6	-	3
	500	10	7	-	2,5
	500	10	8	-	2
	500	10	9	-	1,5
	500	10	10	-	1
	500	10	11	-	1

### 3.4.5. Optimalizace vlivu přídavku acetonitrilu na adsorpci proteinů na paramagnetické mikročástice

Byl zkoumán vliv obsahu acetonitrilu v reakčním roztoku na adsorpci proteinů na paramagnetické mikročástice. Použité množství acetonitrilu bylo v konečném objemu 0-70 %. Vliv množství acetonitrilu byl zkoumán jak při použití přídavku kyseliny mravenčí, tak při přídavku kyseliny trifluoroctové. Optimalizace byla provedena dle postupu v kapitole 3.4.2. Bylo použito konstantní množství mikročástic 50 µg a 500 µL vzorku moči. Složení reakčního roztoku je uvedeno v **Tab. 3.3**.

Vzorky byly po přípravě (viz. kapitola 3.4.3.) separovány pomocí SDS-PAGE.

**Tab. 3.3** Složení reakčního roztoku pro optimalizaci vlivu přídavku acetonitrilu

	Vzorek moči (µL)	Acetonitril (%)	CF <sub>3</sub> COOH (µL)	HCOOH (µL)
Metoda	500	0	-	2,5
s přídavkem	500	10	-	2,5
HCOOH	500	20	-	2,5
	500	30	-	2,5
	500	40	-	2,5
	500	50	-	2,5
	500	60	-	2,5
	500	70	-	2,5
Metoda	500	0	7	-
s přídavkem	500	10	7	-
CF <sub>3</sub> COOH	500	20	7	-
	500	30	7	-
	500	40	7	-
	500	50	7	-
	500	60	7	-
	500	70	7	-

### 3.4.6. Optimalizace inkubačního času

Optimalizace byla provedena dle postupu v kapitole 3.4.2. Suspenze reakčního roztoku (10% acetonitrilu, 7  $\mu\text{L}$  kyseliny trifluoroctové) s paramagnetickými mikročásticemi (50  $\mu\text{g}$ ) a vzorkem moči (500  $\mu\text{L}$ ) byla inkubována po dobu 5, 10, 15, 20 a 30 minut. Poté byly vzorky připraveny dle postupu v kapitole 3.4.3 a separovány pomocí SDS-PAGE.

### 3.4.7. Kapacita paramagnetických mikročástic

Byla testována proteinová kapacita paramagnetických mikročástic. Při zjišťování kapacity bylo postupováno dle obecného postupu v kapitole 3.4.2. Namísto vzorku moči byl použit fosfátový roztok o pH 7,4.

Nejprve byl připraven roztok standardu BSA o koncentraci 50  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . Z takto připraveného roztoku bylo pipetováno množství standardu 0,5-80  $\mu\text{L}$  (resp. 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000  $\mu\text{g}$  BSA) do mikrozkušavek a doplněno do 500  $\mu\text{L}$  fosfátovým roztokem o pH 7,4. Takto připravené roztoky standardu (o objemu 500  $\mu\text{L}$ ) byly přidány ke konstantnímu množství acetonitrilu (50 %) a kyseliny mravenčí (2,5  $\mu\text{L}$ ).

Stejným způsobem bylo postupováno při zjišťování proteinové kapacity u metody s přidavkem trifluoroctové kyseliny (7  $\mu\text{L}$  kyseliny trifluoroctové, 10 % acetonitrilu).

Po izolaci proteinů na paramagnetických mikročásticích byly proteiny eluovány ve 20  $\mu\text{L}$  4 $\times$  koncentrovaného vzorkového pufru a dále dle postupu v kapitole 3.4.3 elektroforeticky separovány.

### 3.4.8. Stanovení koncentrace peptidů pomocí BCA

Vzorky připravené podle **Tab. 3.4** byly enzymaticky štěpeny vždy přidavkem 0,3  $\mu\text{g}$  trypsinu ve 100  $\mu\text{L}$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 10. Inkubace probíhala 16 h při teplotě 37  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byl roztok odebrán od paramagnetických mikročástic do nové mikrozkušavky. Mikročástice byly promyty 50  $\mu\text{L}$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 10. Odebraný roztok byl poté přidán k roztoku peptidů. Takto připravený vzorek peptidů o



celkovém objemu 150  $\mu\text{L}$  byl zcela odpařen a resuspendován v 60  $\mu\text{L}$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 10.

**Tab. 3.4** Příprava vzorků pro stanovení peptidů

Počet vzorků	Vzorek moči ( $\mu\text{L}$ )	Acetonitril (%)	$\text{CF}_3\text{COOH}$ ( $\mu\text{L}$ )	$\text{HCOOH}$ ( $\mu\text{L}$ )
5	500	50	-	2,5
5	500	10	7	-

Po přípravě vzorků bylo přikročeno ke stanovení koncentrace peptidů pomocí metody BCA (bicinchoninová kyselina), za použití Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay Kit (Thermo Scientific). Na 96-jamkovou destičku bylo nanášeno 20  $\mu\text{L}$  vzorku nebo standardu BSA o známé koncentraci (15,6-500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 180  $\mu\text{L}$  reakčního roztoku, předem připraveného smícháním roztoků A,B a C v poměru 50 : 48 : 2 („Colorimetric Peptide Assay Reagent A, B, C“, Thermo Scientific, USA). Mikrotitrační destička byla 1 min třepána a inkubována 15 min při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Absorbance byla změřena při 492 nm. Stanovení bylo prováděno v tripletech.

#### 3.4.9. Příprava vzorků izolovaných proteinů na paramagnetických mikročasticích SpeedBeads pro analýzu LC-MS/MS

Vzorky proteinů připravené za optimálních podmínek metodou s přidavkem kyseliny mravenčí a metodou s přidavkem kyseliny trifluoroctové (**Tab. 3.5**) byly štěpeny přidáním 0,3  $\mu\text{g}$  trypsinu v 100  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru o pH 8,5 a inkubovány 16 h při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Suspenze paramagnetických částic a směsi peptidů byla opět dána na magnetický separátor a získané peptidy byly odebrány do nové mikrozkušavky. K mikročasticím bylo přidáno 50  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru o pH 8,5 a po promíchání a sonikaci po dobu 30 s byl roztok pufru odebrán a přidán ke směsi peptidů. Promytí mikročastic bylo takto opakováno s 50  $\mu\text{L}$  100% acetonitrilu a roztok byl od částic opět odebrán do mikrozkušavky s peptidy. Takto připravený vzorek (celkový objem 200  $\mu\text{L}$ ) byl zcela odpařen při 60  $^{\circ}\text{C}$  a následně resuspendován v 25  $\mu\text{L}$  0,5% kyseliny trifluoroctové.

**Tab. 3.5** Příprava vzorků pro analýzu LC-MS/MS

	Vzorek moči ( $\mu\text{L}$ )	Acetonitril (%)	$\text{CF}_3\text{COOH}$ ( $\mu\text{L}$ )	$\text{HCOOH}$ ( $\mu\text{L}$ )
Metoda s $\text{HCOOH}$	500	50	-	2,5
Metoda s $\text{CF}_3\text{COOH}$	500	10	7	-

### 3.5. Postup přípravy vzorků metodou FASP

Příprava vzorků pro štěpení na centrifugačním membránovém filtru (Filter Aided Sample Preparation, FASP) byla provedena modifikovanou metodou Yu, Y. B. et al.<sup>40</sup>.

#### 3.5.1. Příprava filtrů

Byly použity centrifugační ultra filtry Vivacon 500, 30 000 MWCO HY. Na membránu filtru upevněného ve sběrné mikrozkušavce byl nejprve nanesen 0,5 mL roztoku 5% roztoku Tween-20 z důvodu pasivace aktivních míst materiálu filtru pro snížení nespecifické sorpce proteinů resp. peptidů (16 h, laboratorní teplota). Poté byla celá filtrační jednotka opakovaně opláchnuta destilovanou vodou. Na filtr bylo pipetováno 0,5 mL deionizované vody a poté byl centrifugován 5 min při 12,2 rpm. Centrifugace při všech dalších experimentech byly provedeny při stejných otáčkách. Odpad ze sběrné zkumavky byl odebrán. Tento krok byl znovu opakován. Poté bylo na filtr pipetováno 100  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5 a centrifugace opět probíhala po dobu 5 min. Odpad ze sběrné zkumavky byl znovu odstraněn.

#### 3.5.2. Příprava vzorku moči

Nativní vzorek moči o objemu 500  $\mu\text{L}$  byl nejprve redukován přídavkem 5  $\mu\text{L}$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  dithiothreitolu v 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5. Redukce proteinů v moči probíhala 30 min při 37 °C. Poté byla provedena alkylace zredukovaných proteinů použitím 10  $\mu\text{L}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  iodacetamidu v 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5. Alkylace probíhala ve tmě po dobu 45 min za laboratorní teploty. Takto připravený vzorek byl pipetován na membránu filtrační jednotky Vivacon 500, 30 000 MWCO HY a

centrifugován 15 min. Odpad ze sběrné zkumavky byl vždy odstraněn. Poté bylo na filtr pipetováno 200  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5. Následovala centrifugace 15 min. Tento krok byl proveden celkem třikrát. Na filtr bylo poté naneseno 0,3  $\mu\text{g}$  trypsinu v 100  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5. Enzymatické štěpení proteinů probíhalo 16 h při teplotě 37  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byl filtr přenesen do nových mikrozkuvek LoBind. Následovala centrifugace 15 min. Poté bylo na filtr přidáno 200  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5. Následovala centrifugace opět 15 min. Tento krok byl znovu zopakován. Konečný roztok peptidů ve sběrné mikrozkuvce o objemu 300  $\mu\text{L}$  byl zcela odpařen a poté resuspendován v 25  $\mu\text{L}$  0,1% kyseliny trifluoroctové.

### **3.5.3. Příprava vzorku koncentráту moči**

Pro přípravu koncentráту moči byl použit filtr Amicon Ultra 15 (10 kDa) Merk Millipore. Filtr byl opět pasivován v 5% roztoku Tween-20 (16 h, laboratorní teplota). Poté byl filtr opakovaně promyt deionizovanou vodou. Poté bylo na filtr naneseno 15 mL nativní moče. Následovala centrifugace při 4 000  $\times$  g po dobu 20 min. Moč tak byla zkoncentrována na 400  $\mu\text{L}$ , tj. 37,5 $\times$ .

Nativní vzorek moči o objemu 500  $\mu\text{L}$  byl nejprve redukován přidavkem 5  $\mu\text{L}$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  dithiothreitolu v 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pH 8,5. Redukce proteinů v moči probíhala 30 min při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byla provedena alkylace zredukovaných proteinů použitím 10  $\mu\text{L}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  iodacetamidu v 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pH 8,5. Alkylace probíhala ve tmě po dobu 45 min za laboratorní teploty. Takto připravený vzorek byl nanesen na centrifugační membránový filtr Vivacon 500, 30 000 MWCO HY. Následovala centrifugace 15 min při 12,2 rpm. Odpad ze sběrné zkumavky byl vždy odstraněn. Poté bylo na filtr pipetováno 200  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5. Následovala centrifugace 15 min. Tento krok byl proveden celkem třikrát. Na filtr bylo poté naneseno 0,6  $\mu\text{g}$  trypsinu v 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5. Enzymatické štěpení proteinů probíhalo 16 h při teplotě 37  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byl postup identický jako při přípravě vzorku moči v kapitole 3.5.2.

### 3.6. Postup izolace proteinů na magnetických částicích Perloza MG200

Zásobní roztok komerčně dostupných částic Perloza MG200 aktivovaných divinylsulfonem byl nejprve dvakrát zředěn. Z takto připraveného 50% roztoku usazených částic bylo pipetováno 100  $\mu\text{L}$  do mikrozkušavek LoBind o objemu 2 mL.

Jako vzorek bylo použito 500  $\mu\text{L}$  moči v 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5. Moč byla redukována přidavkem 5  $\mu\text{L}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  dithiothretolu v 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5 (30 min, 37 °C) a alkylována přidavkem 10  $\mu\text{L}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  iodacetamidu v 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5 (45 min, laboratorní teplota, ve tmě).

Částice byly za pomoci magnetického separátoru třikrát promyty 1,5 mL destilované vody. Poté byly dvakrát promyty 1,5 mL 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pufru pH 10. K promytým částicím bylo pipetováno 500  $\mu\text{L}$  vzorku moči, 375  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pufru pH 10 a 625  $\mu\text{L}$  deionizované vody. Následovala inkubace 2 h při laboratorní teplotě za stálého třepání. Poté byl pomocí magnetického separátoru odstraněn roztok od magnetických částic. K částicím bylo přidáno 1 mL roztoku ethanolaminu. Inkubace probíhala za stálého třepání 1 h. Následně byly magnetické částice dvakrát promyty 1 mL 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pufru pH 10. Poté byly promyty dvakrát 1 mL 1 mol  $\text{L}^{-1}$  chloridu sodného. Nakonec byly promyty třikrát 1 mL deionizované vody. Následovalo enzymatické štěpení přidavkem 0,6  $\mu\text{g}$  trypsinu v 100  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  TEAB pufru pH 8,5 po dobu 16 h při teplotě 37 °C. Směs peptidů byla poté odebrána do nové mikrozkušavky.

K magnetickým částicím bylo přidáno 50  $\mu\text{L}$  100mM TEAB pufru o pH 8,5. Suspenze byla krátce promíchána a sonikována v lázni po dobu 30 s. Roztok pufru byl poté odebrán od částic pomocí magnetického separátoru a přidán ke směsi peptidů. Promytí částic bylo opakováno s 50  $\mu\text{L}$  100% acetonitrilu a roztok byl od částic opět odebrán do mikrozkušavky s peptidy. Takto připravený vzorek (celkový objem 200  $\mu\text{L}$ ) byl zcela odpařen při 60 °C a následně resuspendován v 25  $\mu\text{L}$  0,5% kyseliny trifluoroctové.

### 3.7. Přečištění peptidů na špičkách naplněných C18 fází

Všechny připravené vzorky peptidů pro následnou analýzu LC-MS/MS byly předem přečištěny pomocí 100 $\mu$ L špiček OMIX naplněných C18 fází o kapacitě 79  $\mu$ g (Agilent Technologies).

#### Použité roztoky:

A – 50% acetonitril

B - 0,1% kyselina trifluoroctová

C - 0,1% kyselina trifluoroctová obsahující 75% acetonitril

**Postup:** Špička byla vždy promyta 2  $\times$  100  $\mu$ L roztoku A a 2  $\times$  100  $\mu$ L roztoku B. Poté bylo 10  $\times$  nasáto 100  $\mu$ L vzorku a poté byla špička promyta 3  $\times$  100  $\mu$ L roztoku B. Nakonec byla provedena eluce peptidů 50  $\mu$ L roztoku C.

Přečištěné peptidy byly odpařeny do sucha a uchovány při -80 °C. Před analýzou LC-MS/MS byly vzorky resuspendovány ve 20  $\mu$ L 2% acetonitrilu s obsahem 0,1% kyseliny trifluoroctové.

### 3.8. LC-MS/MS analýza

Analýza LC-MS/MS byla provedena Mgr. K. Harantem a Mgr. P. Talackem v Laboratoři Hmotnostní spektrometrie, Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci.

Byla použita LC-MS kolona EASY-Spray, 50 cm x 75  $\mu$ m ID, PepMap. Nástřik každého vzorku na kolonu byl 6  $\mu$ L. Byl použit hmotnostní spektrometr MS Orbitrap Fusion (Thermo) s ionizací elektrosprejem.

### 3.9. Zpracování dat

Všechna data byla analyzována a kvantifikována pomocí softwaru MaxQuant (verze 1.5.3.8) (cit. <sup>42</sup>). Míra falešně pozitivních výsledků (FDR) byla nastavena na 1 % jak pro proteiny, tak pro peptidy a byla specifikována minimální délku sedmi aminokyselin. Vyhledávací nástroj Andromeda byl použit pro vyhledávání

MS/MS spekter proti databázi UniProtKB Homo sapiens (verze 03–2017, 20 183 proteinových sekvencí) (cit. <sup>43</sup>). Enzymová specifita byla nastavena jako C-koncová pro arginin a lysin, s možným štěpením před prolinem a maximálně dvě chybná štěpení. Dále byla nastavena karbamidomethylace cysteinu jako fixní modifikace a N-koncová acetylace proteinů a oxidace methioninu jako variabilní modifikace.

### **3.10. Gene-ontology analýza**

Byla provedena GO analýza detekovaných proteinů. Seznamy proteinů identifikovaných v jednotlivých proteomických frakcích byly analyzovány pomocí aplikace FunRich<sup>44</sup>. Proteiny obsažené v jednotlivých frakcích byly porovnány proti databázím známých lidských genů a proteinů: Gene Ontology database<sup>45</sup>, HPRD<sup>46</sup>, Entrez Gene<sup>47</sup> a UniProt<sup>43</sup>. Identifikovaným proteinům byly přiřazeny termíny spojené s buněčnou komponentou („Cellular component“) a bylo provedeno porovnání zastoupení termínů mezi jednotlivými prekoncentračními metodami.

## 4. VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

Obtížnost proteomické analýzy moči spočívá ve vysoké variabilitě jejího složení, v relativně nízké koncentraci přítomných proteinů nebo peptidů a obsahu mnoha látek, které nejsou kompatibilní s proteomickou a hmotnostně spektrometrickou analýzou. Jsou to především organické metabolity a soli jako je na prvním místě urea, chlorid sodný, chlorid draselný, kyselina močová, kreatinin, šťavelany, fosfáty a urobilin, který dává moči typické žluté zabarvení. V praxi se často k přečištění proteinových vzorků používá jednoduchá a rychlá metoda precipitace organickým rozpouštědlem. V případě moči, je ale tato metoda nevhodná z důvodu vysolovacího efektu, kdy přítomné soli vypadnou z roztoku současně s proteiny jako například při precipitaci acetonem nebo ethanolem. U vzorku moči s vysokou osmolaritou a s vysokým obsahem žlutého pigmentu, anebo u moči pacienta s proteinurií, která je kontaminována především albuminem, zůstává proteinová peleta permanentně zbarvena. A jedině postupy založené na izolaci proteinů pomocí paramagnetických mikro- či nanočástic jsou schopné poskytnout čistý vzorek vysoké kvality.

V této diplomové práci byla snaha poprvé demonstrovat možnost použití metody „*Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation*“ (SP3) podle Hughes et al.<sup>23</sup> na vzorcích moči zdravých dárců s nízkou koncentrací proteinů. Proteiny mohou být zachyceny a zkoncentrovány na povrchu hydrofilních paramagnetických mikročástic s navázanými karboxylovými skupinami mechanismem podobným hydrofilní interakční chromatografii. Přidání organického rozpouštědla do vodného roztoku obsahujícího paramagnetické částice podporuje zachycování proteinů a peptidů v solvatační vrstvě na hydrofilním povrchu mikročástic. Tato interakce může být upravena modulací pH roztoku, kde kyselý roztok podporuje vazbu v módu hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) a bazické podmínky jsou podobné jako u hydrofilní interakční chromatografie s elektrostatickou repulzí (ERLIC) s odpuzováním záporně nabitých karboxylových skupin na povrchu mikročástic.

Optimalizovaná metoda SP3 pro obohacení proteinů z moči zdravých dárců byla na závěr porovnána se dvěma principiálně odlišnými metodami pomocí LC-MS/MS. Byla porovnána s dnes již standardní proteomickou metodou FASP, založenou na

filtraci přes nanomembránu a s postupem založeným na tvorbě kovalentní vazby s divinylsulfonem aktivovanými paramagnetickými mikročásticemi Perloza MG200.

#### **4.1. Izolace proteinů na paramagnetických mikročásticích SpeedBeads**

Metoda SP3 byla aplikována při zkoncentrování proteinů ze vzorků zdravé moči před proteomickou analýzou a jednotlivé podmínky izolace byly optimalizovány. Byl studován vliv pH a druhu přidané kyseliny a vliv přidaného množství organického rozpouštědla resp. acetonitrilu na velikost adsorpce proteinů na hydrofilní povrch mikročástic. Dále byla optimalizována doba inkubace paramagnetických mikročástic se vzorkem a byla zkoumána jejich proteinová kapacita. Optimální podmínky pro izolaci proteinů na paramagnetických mikročásticích SpeedBeads byly vybrány na základě optického a denzitometrického vyhodnocení gelů po SDS-PAGE. K denzitometrickému vyhodnocení byl použit program Image Studio Lite Ver 5.2 od firmy Licor a byla vyhodnocována pouze intenzita proužku u 67 kDa odpovídající molekulové hmotnosti lidského albuminu.

##### **4.1.1. Vliv pH**

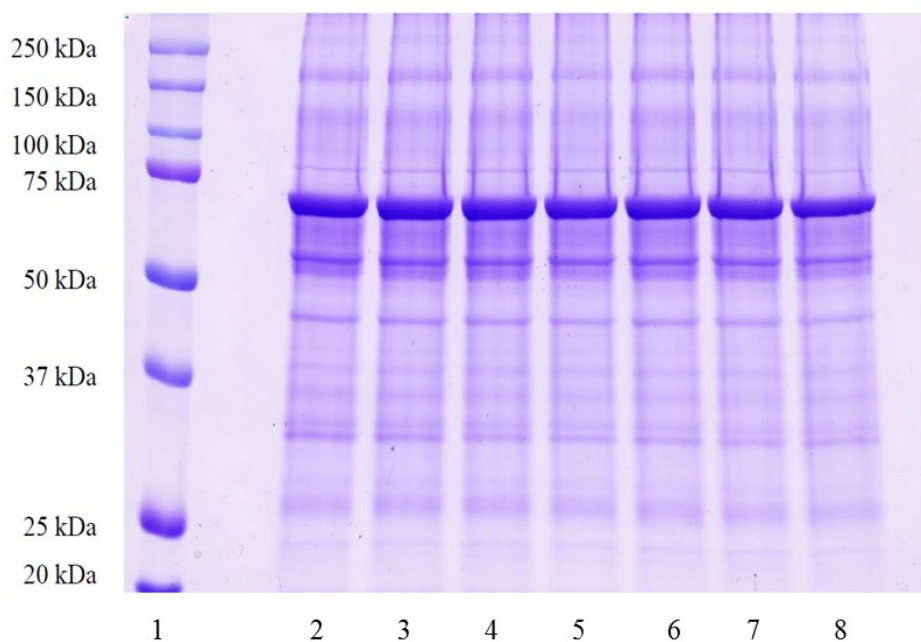
Primárními interakcemi, které působí při HILIC by měly být polární interakce mezi stacionární fází a solutem. Hlavní hnací silou v této metodě jsou hydrofilní proton donor-akceptorové (vodíkové můstky) a dipól-dipól interakce s povrchem stacionární fáze, tak i s kapalinou adsorbovanou na povrchu v difúzní vrstvě. U slabých zásad a kyselin se mohou uplatnit také iontově výměnné interakce. Vhodnou úpravou pH lze potlačit ionizaci funkčních skupin na povrchu stacionární fáze a také ionizaci postranních řetězců aminokyselin peptidů a proteinů.

V tomto případě byla ionizace karboxylových skupin na paramagnetických mikročásticích SpeedBeads potlačena přidavkem kyseliny mravenčí nebo kyseliny trifluoroctové v přítomnosti acetonitrilu.

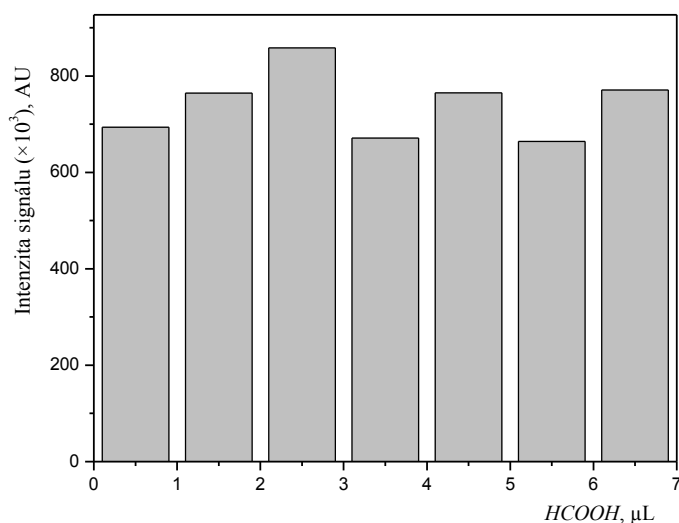


### Metoda s přidavkem kyseliny mravenčí

Na **Obr. 4.1** je zobrazen naskenovaný gel po SDS-PAGE a obarvený roztokem coomassie brilliant blue R-250. Optickým zhodnocením celkových intenzit zbarvení jednotlivých separačních drah gelu lze vysledovat, že zde nejsou velké rozdíly mezi různými přidavky kyseliny. Lze pozorovat nepatrně intenzivnější zbarvení u prvních tří drah. Nevýrazné změny jsou pravděpodobně způsobeny pufracním účinkem HEPES pufru, kterým se na počátku upravuje pH moči, aby se standardizovalo její variabilní pH a rozpustnost močových proteinů. Rozsah pH se pak, po přidavku 0,5 až 6,5  $\mu\text{L}$  kyseliny mravenčí, mění pouze v úzkém rozmezí 3,5 až 2,5 pH (viz **Tab 3.2**). Po denzitometrické analýze (**Obr. 4.2**) byla vyhodnocena nejvyšší intenzita signálu u přidavku 2,5  $\mu\text{L}$  kyseliny mravenčí k reakčnímu roztoku (pH 3,0), což korespondovalo s originálním protokolem dle Hughese<sup>23</sup>. Nicméně rozdíly jsou nevýznamné na hranici chyby měření.



**Obr 4.1** Separace SDS-PAGE proteinů z moče adsorbovaných na 50  $\mu\text{g}$  částic SpeedBeads. Vliv přidavku kyseliny mravenčí (0 - 6,5  $\mu\text{L}$ ) k reakčnímu roztoku (moč 500  $\mu\text{L}$ , acetonitril 50 % v/v). Dráhy: 1 – standard; 2 – 0,5  $\mu\text{L}$  HCOOH; 3 – 1,5  $\mu\text{L}$  HCOOH; 4 – 2,5  $\mu\text{L}$  HCOOH; 5 – 3,5  $\mu\text{L}$  HCOOH; 6 – 4,5  $\mu\text{L}$  HCOOH; 7 - 5,5  $\mu\text{L}$  HCOOH; 8 – 6,5  $\mu\text{L}$  HCOOH; (10% gel, barveno „Imperial Protein Stain“).



**Obr 4.2** Graf závislosti intenzity signálu močového albuminu na přidaném množství kyseliny mravenčí k reakčnímu roztoku s mikročásticemi SpeedBeads po denzitometrickém vyhodnocení gelu po SDS-PAGE (**Obr. 4.1**).

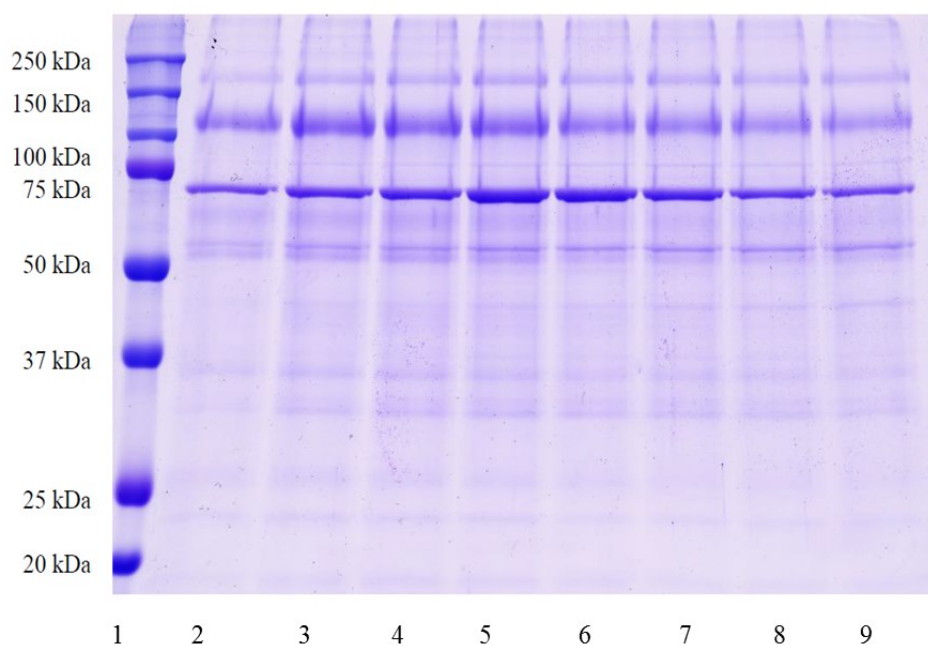
#### Metoda s přidavkem kyseliny trifluoroctové

Na **Obr. 4.3** je zobrazen obarvený gel po SDS-PAGE, kde byly separovány vzorky s různým přidavkem kyseliny trifluoroctové k reakčnímu roztoku v rozmezí objemů 4 až 11  $\mu\text{L}$  a rozmezí pH 3,5 až 1,0. Po denzitometrickém vyhodnocení byl vynesena graf závislosti intenzity signálu na množství přidavku kyseliny trifluoroctové k reakčnímu roztoku (**Obr. 4.4**). Zde byly již rozdíly významné a jako optimální byl vyhodnocen přidavek 7  $\mu\text{L}$  trifluoroctové kyseliny.

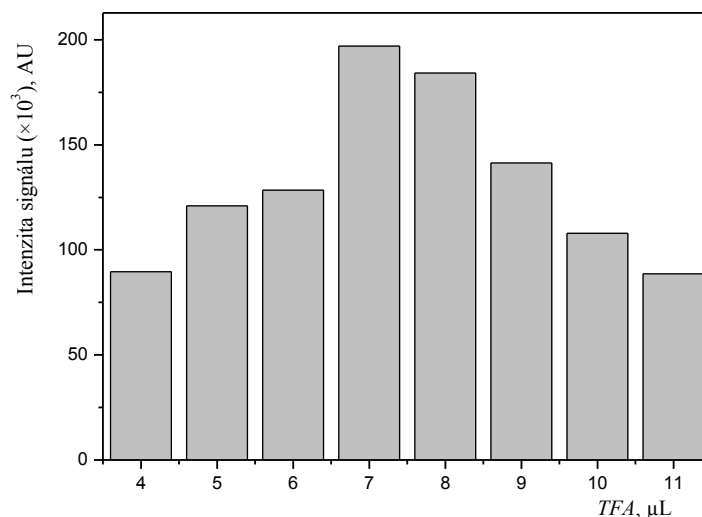
Hodnota pH reakčního roztoku s optimálním přidavkem, změřená pomocí indikačních pH papírků, byla 2,5. Z grafu (**Obr. 4.4**) je patrné, že adsorpce proteinů na paramagnetické mikročástice je nejvyšší u této hodnoty pH. Intenzita signálu klesá v obou směrech od optimálně zvolného přidavku kyseliny trifluoroctové.

Jako alternativa ke kyselině mravenčí byla zvolena kyselina trifluoroctová proto, že v předběžných experimentech, kde bylo testováno  $\text{pH} > 4$  s koncentrací acetonitrilu větší než 40 % (v/v), docházelo k velké precipitaci nativních globulárních proteinů z moči. Pro potlačení tohoto nežádoucího jevu byla použita kyselina trifluoroctová,

která jako iontově-párové činidlo, neutralizuje proteinový náboj a snižuje tak pravděpodobnost agregace proteinů a jejich vypadávání z roztoku.



**Obr. 4.3** Separace SDS-PAGE proteinů z moče adsorbovaných na 50 µg částic SpeedBeads. Vliv množství přídavku kyseliny trifluoroctové (4 - 11 µL) k reakčnímu roztoku (moč 500 µL, acetonitril 10 % v/v). Dráhy: 1 – standard; 2 – 4 µL CF<sub>3</sub>COOH; 3 - 5 µL CF<sub>3</sub>COOH; 4 – 6 µL CF<sub>3</sub>COOH; 5 – 7 µL CF<sub>3</sub>COOH; 6 – 8 µL CF<sub>3</sub>COOH; 7 – 9 µL CF<sub>3</sub>COOH; 8 - 10 µL CF<sub>3</sub>COOH; 9 – 11 µL CF<sub>3</sub>COOH; (10% gel, barveno „Imperial Protein Stain“).



**Obr. 4.4** Graf závislosti intenzity signálu močového albuminu na přidaném množství kyseliny trifluoroctové k reakčnímu roztoku s mikročásticemi SpeedBeads po denzitometrickém vyhodnocení gelu po SDS-PAGE (**Obr. 4.3**).

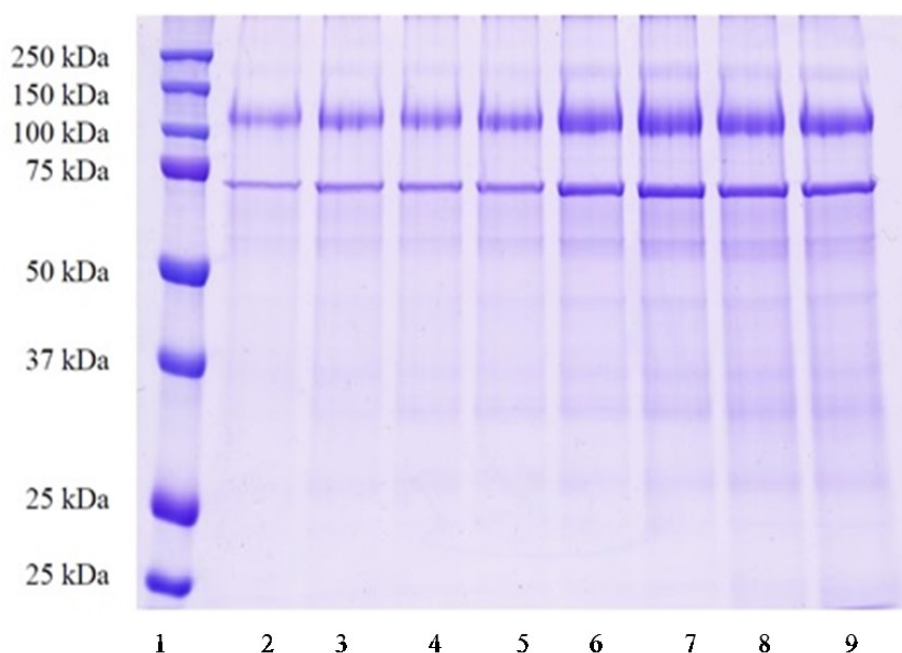
#### 4.1.2. Vliv množství přídavku acetonitrilu na velikost adsorpce

V HILIC módu je nejpoužívanějším organickým rozpouštědlem acetonitril, který díky své chemické struktuře nevytváří vodíkové vazby a tudíž nedochází ke kompetici rozpouštědla a vody na povrchu stacionární fáze jako je tomu například u methanolu a ostatních alkoholů, které jsou v HILIC módu používány velmi vzácně. Za optimalizovaných podmínek pH reakčního roztoku vzorku, pomocí kyseliny mravenčí nebo trifluoroctové, byl zkoumán vliv množství přidaného acetonitrilu v rozmezí od 0 do 70 % (v/v) v „mobilní fázi“ na velikost sorpce proteinů.

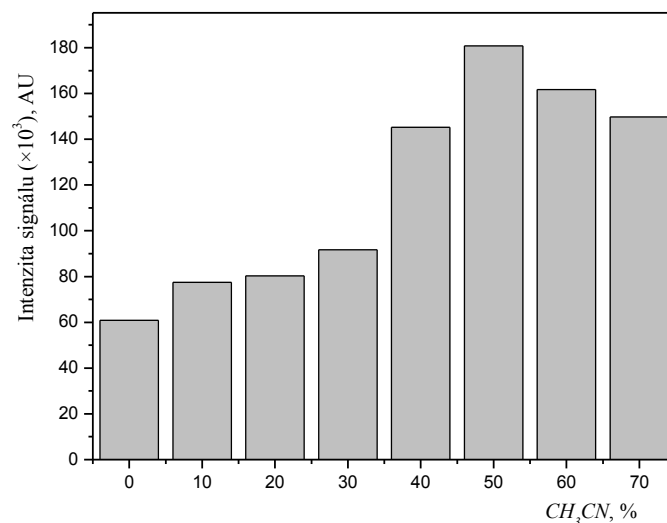
#### Metoda s přídavkem kyseliny mravenčí

Vliv přídavku různého množství acetonitrilu k reakčnímu roztoku je znázorněn na **Obr. 4.5** a **Obr. 4.6.**, pH reakčního roztoku vzorku moči bylo vždy upraveno přídavkem kyseliny mravenčí na hodnotu pH 3,0. Polyakrylamidový gel po SDS-PAGE a obarvený roztokem coomassie brilliant blue R-250 byl naskenován (**Obr. 4.5**) a denzitometricky vyhodnocen (**Obr. 4.6**).

Opticky lze sledovat trend rostoucí adsorpce proteinů na hydrofilní povrch stacionární fáze mikročástic v závislosti na rostoucí koncentraci organické složky v roztoku. Toto chování je v souladu s teoretickými předpoklady HILIC chromatografie. Na základě denzitometrické analýzy gelu bylo stanoveno, že 50% (v/v) koncentrace acetonitrilu v roztoku vzorku je optimální pro maximální zkoncentrování proteinů z moči, stejně jako u originálního protokolu<sup>23</sup>. Tato hodnota byla zvolena i přesto, že dalším zvýšením organické složky by mohlo být dosaženo vyššího výtěžku (viz **Obr. 4.5**) je zde však riziko výše zmíněné precipitace proteinů a solí a následné nereprodukovatelnosti výsledků.



**Obr. 4.5** Separace SDS-PAGE proteinů z moče adsorbovaných na 50 µg částic SpeedBeads. Vliv přidaného množství acetonitrilu (0-70% v/v) k reakčnímu roztoku o pH 3,0 (500 µL, 2,5 µL kyseliny mravenčí). Dráhy: 1 – standard; 2 – 0% acetonitril; 3 - 10% acetonitril; 4 – 20% acetonitril; 5 – 30% acetonitril; 6 – 40% acetonitril; 7 - 50% acetonitril; 8 – 60% acetonitril; 9 – 70% acetonitril; (10% gel, barveno „Imperial Protein Stain“).

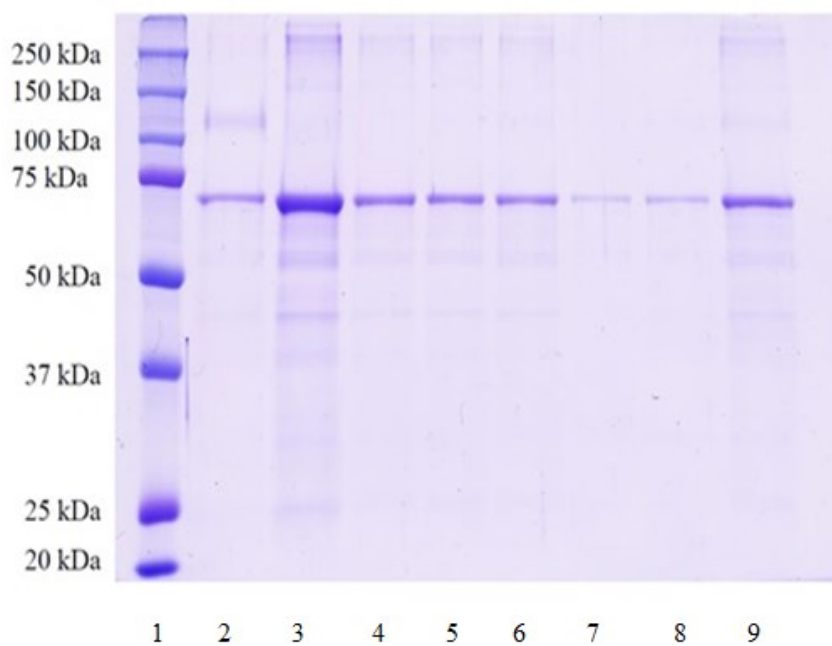


**Obr. 4.6:** Graf závislosti intenzity signálu močového albuminu na přidaném množství acetonitrilu k reakčnímu roztoku s mikročásticemi SpeedBeads po denzitometrickém vyhodnocení gelu po SDS-PAGE (**Obr. 4.5**).

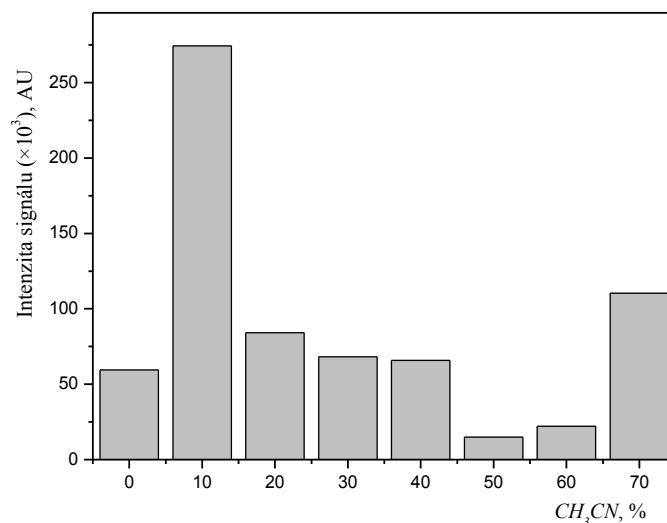
#### **Metoda s přidavkem kyseliny trifluoroctové**

Při použití různého množství přídavku acetonitrilu (0 - 70 % v/v) k reakčnímu roztoku, který byl okyselen 7  $\mu$ L kyseliny trifluoroctové na pH 2,5, byla viditelně nejvyšší adsorpce proteinů již u přídavku 10 % acetonitrilu (**Obr. 4.7**), což potvrdilo i denzitometrické vyhodnocení (**Obr. 4.8**).

Rychlý nárůst adsorpce na hydrofilním povrchu částic s následným poklesem s rostoucí koncentrací acetonitrilu, lze pravděpodobně vysvětlit přítomností iontově-párového činidla trifluoroctové kyseliny v roztoku. Trifluoracetátový anion interaguje s pozitivně nabitými  $-\text{NH}_3^+$  skupinami peptidů a proteinů, neutralizuje jejich náboj a snižuje jejich hydrofilní vlastnosti. V silně kyselém prostředí jsou všechny karboxylové skupiny protonizovány a iontové interakce jsou potlačeny na minimum. S rostoucím množstvím acetonitrilu v reakční směsi stoupá její nepolárnost a více nepolární neutralizované peptidy a proteiny zůstávají zadržovány v „mobilní fázi“.



**Obr. 4.7** Separace SDS-PAGE proteinů z moče adsorbovaných na 50  $\mu\text{g}$  částic Speed Beads-(COOH). Vliv přidavku množství acetonitrilu (0-70% v/v) k reakčnímu roztoku o pH 2,5 (moč 500  $\mu\text{L}$ , kyselina trifluoroctová 7  $\mu\text{L}$ ). Dráhy: 1 – standard: 2 - 0% acetonitril; 3 – 10% acetonitril; 4 – 20% acetonitril; 5 – 30% acetonitril; 6 - 40% acetonitril; 7 – 50% acetonitril; 8 – 60% acetonitril; 9 – 70% acetonitril; (10% gel, barveno „Imperial Protein Stain“).



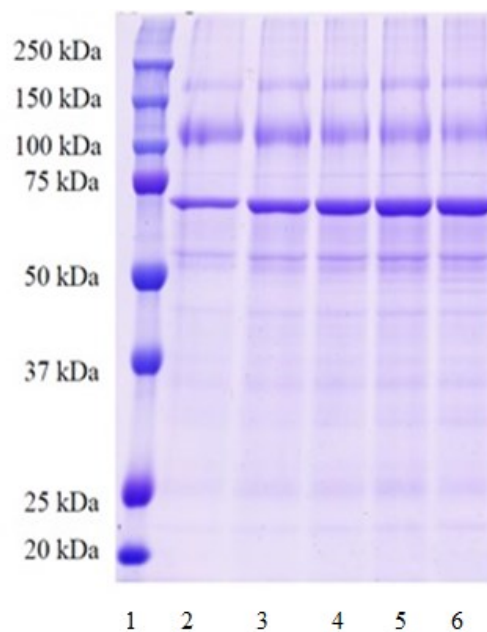
**Obr. 4.8** Graf závislosti intenzity signálu močového albuminu na přidaném množství acetonitrilu k reakčnímu roztoku s mikročásticemi SpeedBeads po denzitometrickém vyhodnocení gelu po SDS-PAGE (**Obr. 4.7**).

#### 4.1.3. Optimalizace inkubačního času

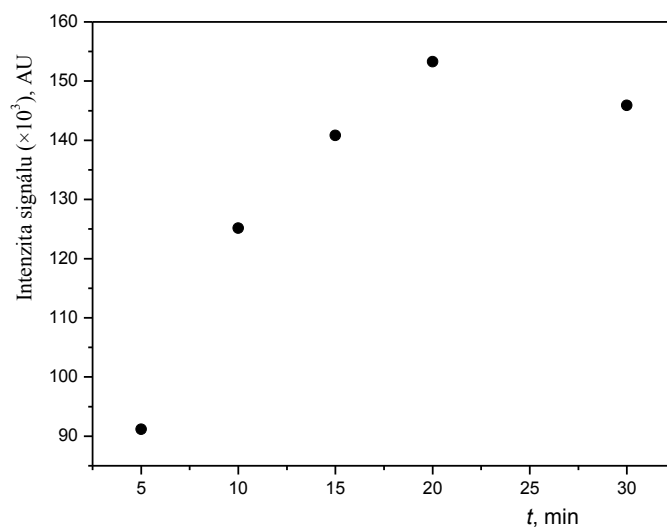
Byl zkoumán vliv doby inkubace (5, 10, 15, 20 a 30 min) suspenze paramagnetických mikročástic s reakčním roztokem na velikost adsorpce proteinů (**Obr. 4.9**). V tomto případě byla použita metoda s přidavkem kyseliny trifluoroctové do reakční směsi o výsledném pH 2,5 (7  $\mu$ L kyseliny trifluoroctové, 10 % acetonitrilu). Po denzitometrickém vyhodnocení gelu (**Obr. 4.10**) po SDS-PAGE byl jako optimální čas inkubace zvoleno 20 min. U metody s přidavkem kyseliny mravenčí byl výsledek obdobný.

Na **Obr. 4.9** můžeme pozorovat, že po dvaceti minutách inkubace se již celkové množství zakoncentrované mikročásticemi výrazně neměnilo. V porovnání s originálním protokolem dle Hughese et al.<sup>23</sup> se tedy optimální doba interakce proteinového vzorku moči s hydrofilními částicemi SpeedBeads prodloužila na dvojnásobek.





**Obr 4.9** Separace SDS-PAGE proteinů z moče adsorbovaných na 50  $\mu\text{g}$  částic Speed Beads-(COOH). Vliv změny inkubačního času (5-30 min). Složení reakčního roztoku: 500  $\mu\text{L}$  moče, 50 % acetontrilu a 7  $\mu\text{L}$  kyseliny trifluorooctové; pH 2,5. Dráhy: 1 - standard: 2 – 5 min; 3 – 10 min; 4 – 15 min; 5 – 20 min; 6 – 30 min; (10% gel, barveno „Imperial Protein Stain“).

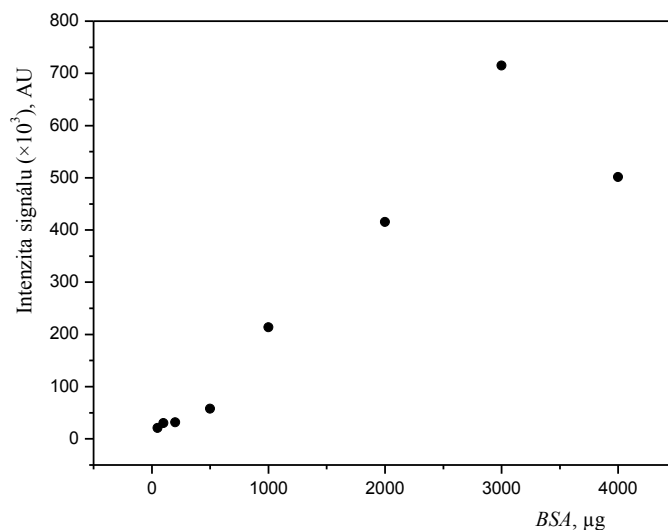


**Obr 4.10** Graf závislosti intenzity signálu močového albuminu na době inkubace s mikročásticemi SpeedBeads po denzitometrickém vyhodnocení gelu po SDS-PAGE (**Obr. 4.9**).

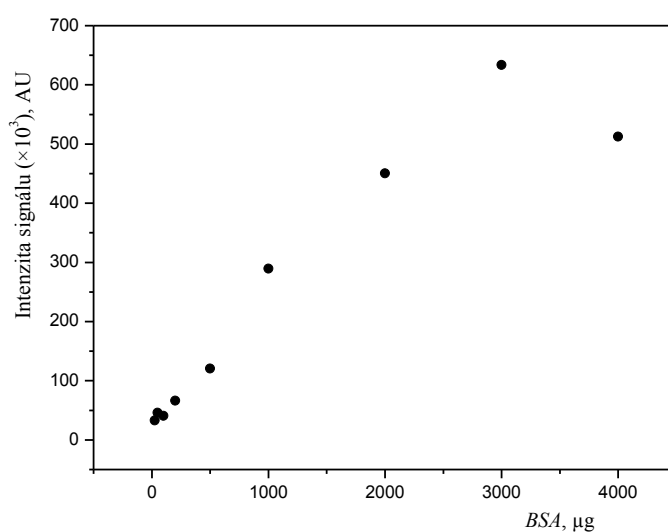
## Kapacita částic

Dále byla stanovena proteinová kapacita komerčních hydrofilních mikročastic Sera-Mag SpeedBeads pro metody s přidavkem kyseliny mravenčí (**Obr. 4.11**) a s přidavkem kyseliny trifluoroctové (**Obr. 4.12**). S konstantním množstvím 50  $\mu\text{g}$  mikročastic byly postupně inkubovány vzorky moči s přidavkem 25 – 4 000  $\mu\text{g}$  BSA za optimalizovaných podmínek. Nejvyšší intenzita proteinových proužků byla naměřena v obou případech při přidavku 3 000  $\mu\text{g}$  standardu BSA do 500  $\mu\text{L}$  zdravé moči.

Dle těchto zjištění, je tedy proteinová kapacita studovaných paramagnetických mikročastic, za podmínek optimalizovaných pro izolaci ze vzorku moči, přibližně rovna 60  $\mu\text{g}$  proteinů na 1  $\mu\text{g}$  částic. V originální práci dle Hughese<sup>23</sup> byla proteinová kapacita odhadnuta na hodnotu 100  $\mu\text{g}$  proteinů na 1  $\mu\text{g}$  částic při podmínkách optimalizovaných pro izolaci proteinů z lyzátů embryí drozofil. Tato kapacita je dostačená i pro přípravu vzorků moči pacientů s onemocněním ledvin, které jsou často doprovázené proteinurií. Moč těchto pacientů pak může obsahovat proteiny o koncentraci 0,1 až 5  $\text{g L}^{-1}$  i více. Výhodou této metody je tedy velká proteinová kapacita použitých mikročastic, která je až o dva řády vyšší než u jiných typů magnetických nosičů používaných v proteomické analýze (typicky 0,01 – 0,5  $\mu\text{g}$  proteinů na 1  $\mu\text{g}$  částic).



**Obr 4.11** Graf závislosti intenzity signálu BSA na jeho přidaném množství v rozsahu 25 – 4000 µg k reakčnímu roztoku s mikročásticemi SpeedBeads a kyselinou mravenčí po denzitometrickém vyhodnocení gelu po SDS-PAGE. Složení reakčního roztoku: 500 µL moče, 50 % (v/v) acetonitrilu a 2,5 µL kyseliny mravenčí; pH 3,0.



**Obr 4.12** Graf závislosti intenzity signálu BSA na jeho přidaném množství v rozsahu 25 - 4000 µg k reakčnímu roztoku s mikročásticemi SpeedBeads a kyselinou trifluoroctovou po denzitometrickém vyhodnocení gelu po SDS-PAGE. Složení reakčního roztoku: 500 µL moče, 10 % acetonitrilu a 7 µL kyseliny trifluoroctové; pH 2,5.

#### 4.1.4. Shrnutí získaných optimalizovaných podmínek

V **Tab. 4.1** jsou shrnuty zjištěné optimalizované podmínky pro zkoncentrování proteinů z moči. U metody s přidavkem kyseliny mravenčí byl optimální přidavek 50 % (v/v) acetonitrilu a 2,5  $\mu\text{L}$  kyseliny mravenčí s výsledným pH roztoku pH 3,0. U metody s přidavkem kyseliny trifluoroctové to bylo 10 % (v/v) acetonitrilu a 7  $\mu\text{L}$  kyseliny trifluoroctové s výsledným pH roztoku pH 2,5.

**Tab. 4.1** Získané optimalizované podmínky izolace proteinů na paramagnetických částicích SpeedBeads

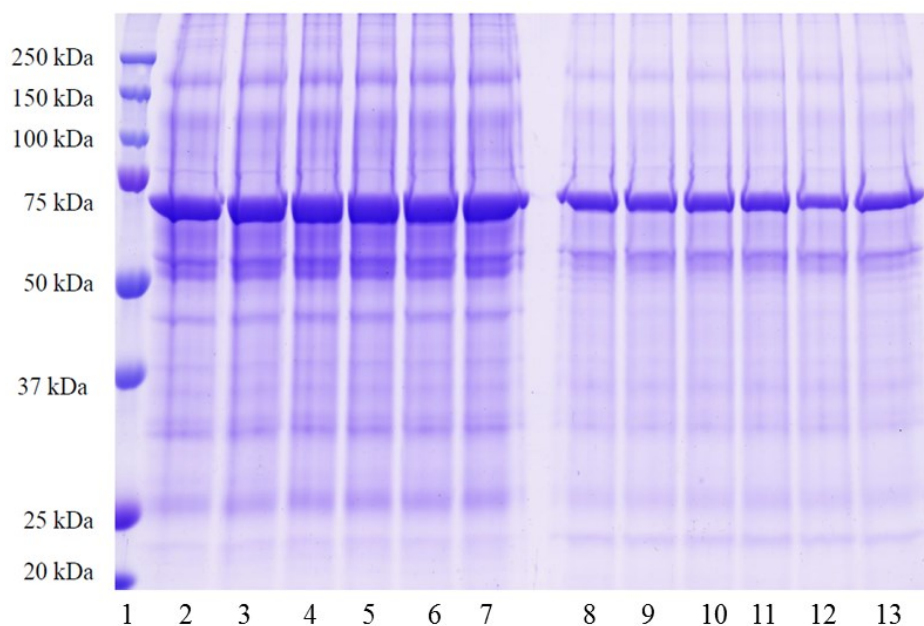
	Metoda s přidavkem HCOOH	Metoda s přidavkem CF <sub>3</sub> COOH
Množství mikročastic SpeedBeads ( $\mu\text{g}$ )	50	50
Objem vzorku moči ( $\mu\text{L}$ )	500	500
Objem reakčního roztoku (mL)	1	1
Koncentrace acetonitrilu (% v/v)	50	10
Objem CF <sub>3</sub> COOH ( $\mu\text{L}$ )	-	7
Objem HCOOH ( $\mu\text{L}$ )	2,5	-
pH	3,0	2,5
Čas inkubace (min)	20	20

#### 4.1.5. Porovnání metod a statistické zpracování

Pro porovnání metod bylo použito šest vzorků od každé metody, připravených za optimálních podmínek (**Obr. 4.13**). Vzorky byly následně separovány pomocí SDS-PAGE. Poté byl gel denzitometricky vyhodnocen. Naměřené hodnoty pro metodu s přidavkem kyseliny mravenčí i kyseliny trifluoroctové jsou uvedeny v **Tab 4.2** včetně statistických dat. Metoda s přidavkem kyseliny mravenčí poskytovala proteinové proužky o výrazně vyšší, téměř dvojnásobné intenzitě, a proto byla vyhodnocena jako ideální pro přípravu vzorků moči před proteomickou analýzou.

Pro statistické zpracování dat byl nejprve určen medián  $\tilde{x}$ . Směrodatná odchylka byla vypočtena z rozpětí ( $R = x_{\max} - x_{\min}$ ) jako  $s_r = k_n \cdot R$ . Kdy  $k_n$  je tabelovaný koeficient ( $n =$  počet měření). Mez opakovatelnosti byla určena vynásobením směrodatné odchylky tabelovaným koeficientem  $K_n$ . Variační koeficient metody CV byl získán jako podíl směrodatné odchylky SD a mediánu. Koeficient spolehlivosti  $\alpha = 0,05$ .

Hodnoty směrodatné odchylky a variačního koeficientu ukazují vysokou míru opakovatelnosti této metody.



**Obr. 4.13** Separace SDS-PAGE proteinů z moče adsorbovaných na 50  $\mu\text{g}$  částic SpeedBeads. Dráhy: 1 – standard; 2-7 - metoda s přidavkem kyseliny mravenčí (2,5  $\mu\text{L}$  HCOOH, 50 % acetonitrilu) ; 8-13 metoda s přidavkem kyseliny trifluoroctové (7  $\mu\text{L}$  CF<sub>3</sub>COOH, 50 % acetonitril); (10% gel, barveno „Imperial Protein Stain“).

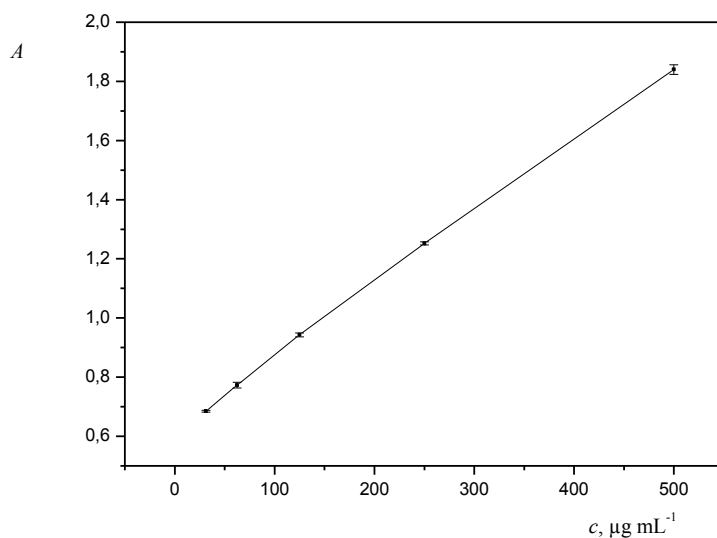
**Tab. 4.2** Denzitometrické vyhodnocení gelu po SDS-PAGE (**Obr. 4.13**) a opakovatelnost metody s přidavkem kyseliny mravenčí a kyseliny trifluoroctové.

Vzorek	Intenzita signálu $\times 10^3$ (AU)	
	HCOOH	CF <sub>3</sub> COOH
1	748,2	403,3
2	752,7	437,0
3	761,1	427,6
4	701,4	428,6
5	770,1	366,6
6	731,4	419,4
Median	750,4	423,5
Rozpětí	68,7	70,4
SD	27,1	27,8
CV (%)	3,6	6,6
Mez opakovatelnosti ( $\alpha = 0,05$ )	$\pm 27,4$	$\pm 28,1$

#### 4.1.6. Stanovení koncentrace peptidů metodou BCA a statistické zpracování

V dalším kroku byly zkoncentrované a přečištěné proteiny, stále adsorbované na povrchu mikročástic, štěpeny přidavkem roztoku trypsinu v TEAB pufru (viz **kap. 3.4.9.**). Tento krok je posledním nezbytným úkonem před LC-MS/MS analýzou, a proto byla ověřována jeho opakovatelnost. Z kalibrační křivky (**Obr. 4.14**) byla vypočtena koncentrace peptidů u vzorků připravených metodou využívající částice SpeedBeads. V **Tab. 4.3** jsou uvedeny koncentrace peptidů vypočtené z kalibrační závislosti a statistické údaje metody s přidavkem kyseliny mravenčí i přidavkem kyseliny trifluoroctové. Byl určen median  $\bar{x}$ , směrodatná odchylka SD, variační koeficient metody CV a mez opakovatelnosti. Koeficient spolehlivosti  $\alpha = 0,05$ .

Také zde hodnoty směrodatné odchylky a variačního koeficientu ukazují vysokou míru opakovatelnosti, především u preferované metody s přidavkem kyseliny mravenčí.



**Obr 4.14** Kalibrační závislost koncentrace peptidové směsi na absorbanci stanovené metodou BCA optimalizovanou pro měření peptidů,  $\lambda = 492 \text{ nm}$ ,  $R^2 = 0,9992$ .

**Tab. 4.3** Stanovení koncentrace peptidů v moči metodou BCA získané postupem SB (HCOOH) s přidavkem kyseliny mravenčí a postupem SB (CF<sub>3</sub>COOH) s přidavkem kyseliny trifluoroctové.

Vzorek	$c$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	HCOOH	CF <sub>3</sub> COOH
1	158,3	47,8
2	149,8	40,5
3	150,8	52,3
4	156,5	46,4
5	167,5	39,1
Median	156,5	46,4
Rozpětí	17,7	13,2
SD	7,6	5,7
CV (%)	4,9	12,2
Mez opakovatelnosti ( $\alpha = 0,05$ )	$\pm 9,0$	$\pm 6,7$

## 4.2. LC-MS/MS analýza

Moderní proteomika založená na LC-MS analýze analyzuje nejčastěji proteiny na úrovni peptidů přístupem nazývaným „shotgun“. Tento proteomický postup je založen na počátečním štěpení neseparované směsi bílkovin chemickou nebo enzymatickou metodou. Výsledkem je směs peptidů, které jsou následně separovány pomocí HPLC a potom sekvenovány tandemovou hmotnostní spektrometrií. Proto je důležitým a nezbytným krokem v pracovním postupu proteolytické štěpení. Tomuto kroku však musí ve většině případů předcházet extrakce proteinů z tkání, buněk nebo tělních tekutin, přečištění a zkoncentrování proteinového vzorku<sup>48</sup>.

Pro extrakci, rozpuštění a denaturaci proteinů se běžně používají detergenty jako SDS a chaotropní činidla, jako je močovina a thiomočovina. Takto připravené směsi proteinů se proteolyticky neštěpení přímo v roztoku, protože přítomnost detergentů a chaotropních činidel snižuje aktivitu proteolytického enzymu (např. trypsinu). Neúplné štěpení snižuje počet dostupných peptidových analytů pro LC-MS. Navíc stopové množství detergentů může způsobit významné potlačení signálu během LC-MS analýzy<sup>40</sup>.

Moč, jak již bylo zmíněno, obsahuje velké množství metabolitů, solí a chaotropních činidel a je tak nativním proteinovým extraktem, který musí být zkoncentrován a přečištěn.

K odstranění interferujících látek z proteinových směsí byla použita a studována řada technik<sup>49, 50</sup>. V současnosti se jako jednou z neúčinnějších metod přípravy vzorku jeví metoda přípravy vzorku pomocí centrifugačního filtru (FASP), která dosahuje vysokého pokrytí bílkovin při „shotgun“ proteomických analýzách. Všestranné vlastnosti metody FASP vedly k jejímu použití v mnoha proteomických projektech<sup>51-53</sup>.

Tato práce měla za cíl ukázat, že potenciálně další neméně účinnou metodou přípravy proteinových vzorků, před LC-MS proteomickou analýzou, může být technika využívající magnetické mikročástice. Konkrétně byly testovány hydrofilní paramagnetické mikročástice s vázanými karboxylovanými skupinami SpeedBeads s přídavkem kyseliny mravenčí nebo kyseliny trifluoroctové, v módu HILIC chromatografie. Tato metoda byla porovnána s metodou založenou na tvorbě kovalentní vazby proteinů s aktivovanými divinylsulfonovými skupinami na povrchu hydrofilních



paramagnetických mikročastic Perloza MG200 a také s výše zmíněnou metodou FASP. FASP postup byl proveden dvojím způsobem, přímou filtrací vzorku moče a filtrací koncentrátu moče, který byl nejprve získán zkoncentrováním 15 mL moče přes centrifugační filtr (viz kapitola 3.5.3.). Počáteční proteinová koncentrace v tomto vzorku by tedy měla být asi  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Všechny tyto postupy byly hodnoceny z hlediska peptidového výtěžku, počtu identifikovaných proteinů a peptidů a dalších proteomických parametrů (**Tab. 4.4 a 4.5**).

Nejvyšší počet identifikací peptidů i proteinů a nejvyšší celkovou sumu peptidových intenzit poskytovaly vzorky moči po obou procedurách FASP a po optimalizované metodě SB-HCOOH (mikročastice SpeedBeads s přidavkem kyseliny mravenčí). Ve vzorku po FASP-konc. (FASP koncentrátu moči) bylo identifikováno průměrně 8829 peptidů, 1382 proteinů a celková suma peptidových intenzit dosahovala hodnot  $4,1 \cdot 10^{12}$ . Metoda SB-HCOOH poskytovala průměrně 7706 peptidů, 856 proteinů a celkovou intenzitu peptidů jen o něco málo menší  $6,6 \cdot 10^{11}$ . Podobné hodnoty byly stanoveny u FASP postupu, tj. 6571 peptidů, 854 proteinů a  $6,8 \cdot 10^{11}$ . Lepší výsledky u postupu zpracovávající koncentrát moči jsou logické, jelikož bylo na centrifugační filtr dávkováno zhruba 7 krát větší množství proteinů (100  $\mu\text{g}$ ) než ve zbylých případech a do LC-MS systému pak bylo dávkováno více peptidového materiálu. Koncentrace peptidových směsí změřených po jednotlivých protokolech jsou uvedeny v **Tab 4.4**. Obdobné výsledky publikoval Adachi et al.<sup>54</sup> a Yu et al.<sup>40</sup>, kteří identifikovali 1543 resp. 1063 proteinů v moči zdravých dárců.

Uvážíme-li však, že u metod SB-HCOOH a FASP vycházíme pouze z 0,5 mL moče, kdy nemusíme do procesu izolace zařazovat další krok zvyšující náklady, jsou tyto výsledky více než uspokojivé. Porovnáme-li tyto dvě metody z pohledu průměrného pokrytí sekvence identifikovaných proteinů, tak metoda SB-HCOOH poskytuje vyšší pokrytí a to v průměru 19,3 % oproti 16,7 % u FASP. Také v průměrném počtu peptidů připadajících na jeden identifikovaný protein je SB-HCOOH protokol nejvýhodnější (viz **Tab. 4.5**). Zásadní výhodou postupu SB-HCOOH je, že příprava vzorku moči pro proteomickou analýzu celkem trvá maximálně 30 minut a je tak extrémně rychlá. FASP postup je časově náročnější a zabere přibližně 90 minut. Zároveň zde hrozí riziko protržení filtrační membrány a adsorpce proteinů a peptidů na její povrch.

**Tab. 4.4** LC-MS/MS analýza vzorků moči zdravých dárců připravených různými protokoly. Přibližná koncentrace peptidů v proteomických směsích stanovená měřením absorbance při  $\lambda=280$  nm a počet identifikovaných peptidů a proteinů získaných analýzou dat po LC-MS/MS (FDR 1 %).

Metoda	Koncentrace peptidů ( $A_{280\text{nm}}$ ) ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Množství identifikovaných peptidů	Množství identifikovaných proteinů
SB-HCOOH	0,81	7706	856
SB-CF <sub>3</sub> COOH	0,44	5118	597
DVS-Perloza	0,97*	3104	425
FASP	0,31	6571	854
FASP-konc	1,43	8829	1382

\* vysoké pozadí měření

**Tab. 4.5** LC-MS/MS analýza vzorků moči zdravých dárců připravených různými protokoly. Suma intenzit peptidů, průměrné pokrytí sekvence proteinů, poměr počtu peptidů na identifikovaný protein, a četnost chybných štěpení trypsinem získaných analýzou dat po LC-MS/MS (FDR 1 %).

Metoda	Suma intenzit peptidů	Průměrné pokrytí sekvence (%)	Poměr peptidů na protein	Četnost chybných štěpení (%)
SB-HCOOH	$6,6 \cdot 10^{11}$	19,3	6,0	28,9
SB-CF <sub>3</sub> COOH	$1,5 \cdot 10^{11}$	16,9	5,5	31,8
DVS-Perloza	$1,3 \cdot 10^{11}$	12,6	4,1	19,0
FASP	$6,8 \cdot 10^{11}$	16,7	5,0	22,2
FASP-konc.	$4,1 \cdot 10^{12}$	17,8	5,2	21,4

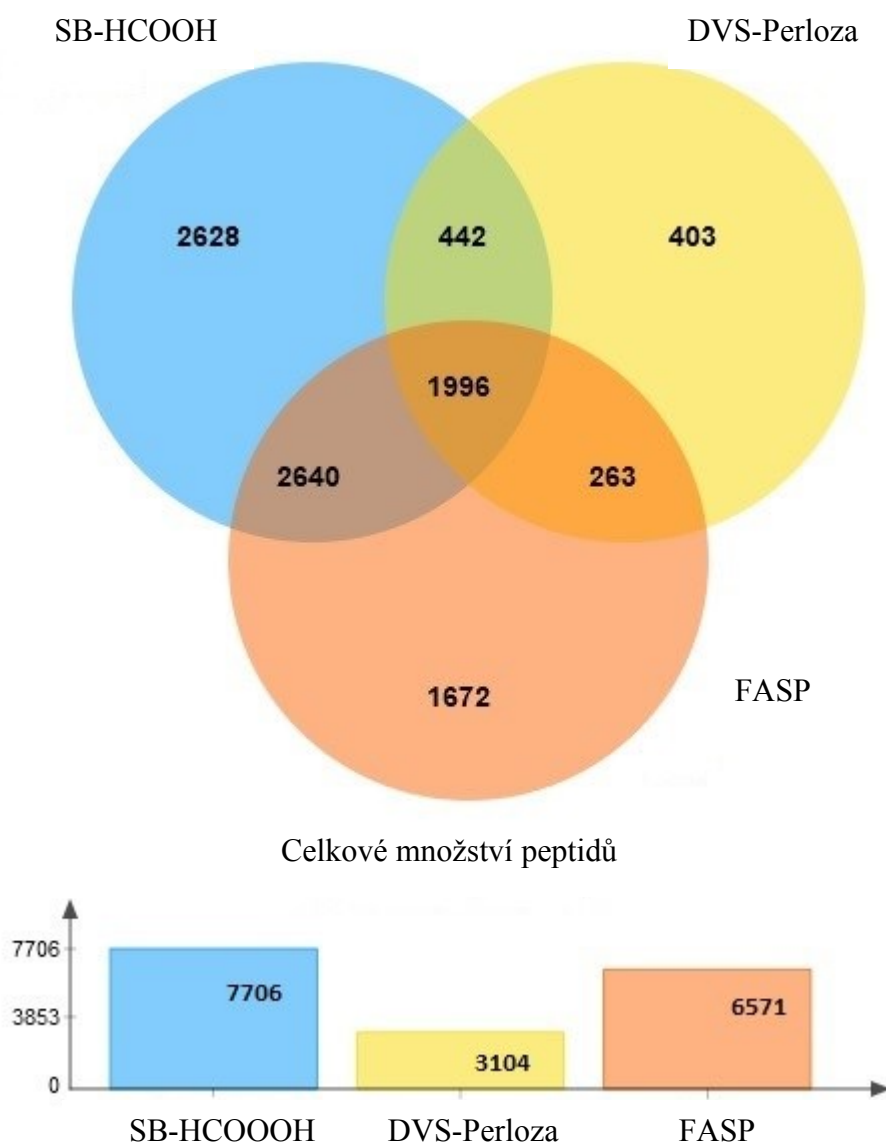
Metoda SB-CF<sub>3</sub>COOH s kyselinou trifluoroctovou nedosahovala tak uspokojivých výsledků a poskytovala jen 5118 identifikovaných peptidů a 597 identifikovaných proteinů. Koncentrace peptidů ve finální směsi byla jen asi

poloviční, tj.  $0,44 \text{ mg mL}^{-1}$  oproti metodě SB-HCOOH, což už naznačovaly i výsledky během optimalizace podmínek.

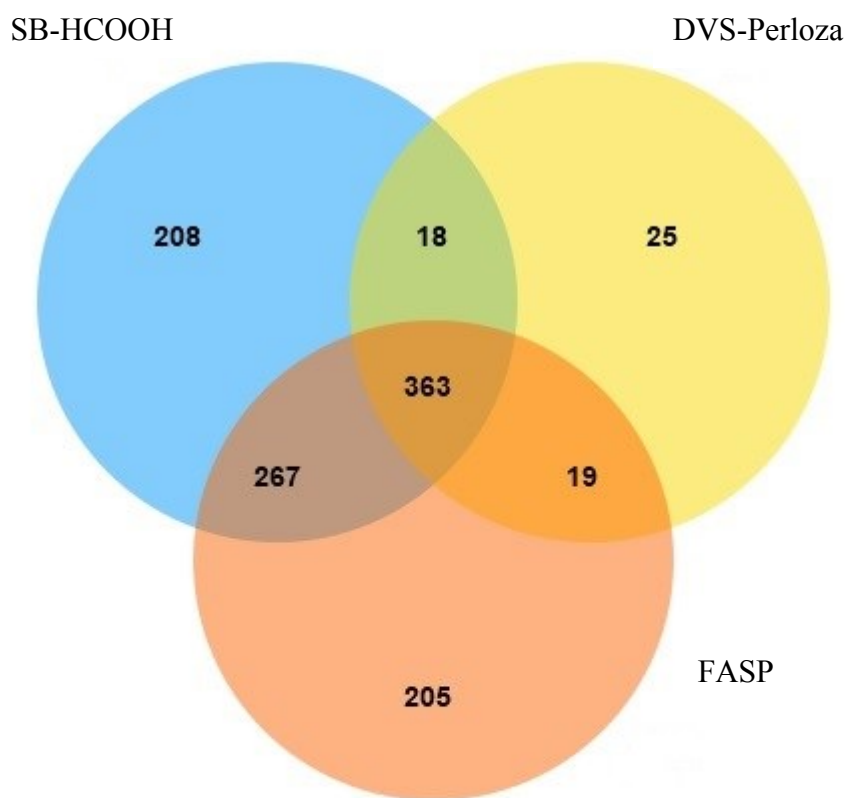
Jako nejméně vhodný se ukázal přístup kovaletní vazby močových proteinů na mikročástice z perlové celulózy DVS-Perloza (aktivované divinylsulfonem). Poskytoval jen poloviční množství identifikovaných peptidů a proteinů než mikročástice SpeedBeads. Ačkoliv finální peptidová směs teoreticky vykazovala vysokou koncentraci, byl vzorek pravděpodobně znečištěn neznámým kontaminantem, protože absorpční spektrum vykazovalo vysoké pozadí. Původ tohoto znečištění není znám. Celulózové částice obsahují až 80 % vody a mohlo by se tak jednat o stopy chemických látek, které nebyly dostatečně vymyty z materiálu částic. Současně to může být stejný důvod pro nedokonalou eluci peptidů, které mohou zůstat zadrženy v makroporézním materiálu Perlozy. Metoda DVS-Perloza byla také pravděpodobně znevýhodněna, protože kinetika tvorby kovaletní vazby proteinů s divinylsulfonovou skupinou není tak rychlá (optimální doba inkubace 18 hodin) a inkubace byla z praktických důvodů prováděna jen po dobu 2 hodin. Navíc je zde nutný další krok blokace zbylých aktivních skupin na povrchu částic. Také zde může hrát roli i vysoké pH 10 při kterém se celý postup imobilizace proteinů provádí a kdy může docházet ke zvýšené degradaci proteinů či peptidů.

V dalším kroku byly vybrány pouze tři metody se stejným počátečním množstvím moči vstupujícím do izolace a s principiálně rozdílným způsobem retence proteinů, tj. metoda SB-HCOOH, DVS-Perloza a FASP. Metody byly porovnány z hlediska počtu a překryvu peptidových a proteinových identifikací, aby poté mohly být porovnány z pohledu fyzikálně-chemických vlastností peptidů a proteinů specifických pro danou jednotlivou metodu.

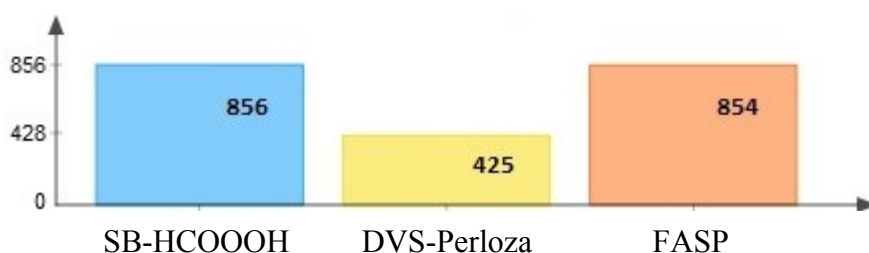
Z výsledků vyplývá, že 60-70 % peptidů a téměř 75 % proteinů bylo extrahováno metodou SB-HCOOH i FASP společně, přičemž zbylé peptidy a proteiny jsou unikátní pro daný proteomický postup (**Obr. 4.15 a 4.16**). Z toho vyplývá, že ještě poměrně vysoké procento identifikací je vlastní jednotlivým variantám, což může znamenat, že oba postupy jsou komplementární. Metoda DVS-Perloza byla v této kalkulaci zanedbána pro její výše zmíněné nedostatky.



**Obr. 4.15** Vennův diagram počtu identifikovaných peptidů připravených metodou využívající paramagnetické částice SpeedBeads (označení SB-HCOOH, modrá), metodou využívající celulóznové částice Perloza MG200 aktivované DVS (označení DVS-Perloza, žlutá) a metodou FASP (oranžová).



Celkové množství proteinů



**Obr. 4.16** Vennův diagram počtu identifikovaných proteinů připravených metodou využívající paramagnetické částice SpeedBeads (označení SB-HCOOH, modrá), metodou využívající celulósovú částice Perloza MG200 aktivované DVS (označení DVS-Perloza, žlutá) a metodou FASP (oranžová).

Pro lepší porozumění specifických rozdílů v procesech identifikovaných proteinů a peptidů byly dále zkoumány fyzikálně-chemické vlastnosti unikátních a sdílených peptidů a proteinů. Na **Obr. 4.17** až **4.19** jsou znázorněny grafy pro zvolené prekoncentrační metody. Konkrétně byla porovnána molekulová hmotnost,

izoelektrický bod a hydrofobicita, resp. GRAVY index. GRAVY index charakterizuje peptidy a proteiny z hlediska jejich hydrofobicity. Kladná hodnota označuje hydrofobní, zatímco záporná hodnota hydrofilní molekuly<sup>55</sup>.

Porovnáme-li nejdříve grafy pro peptidy (**Obr. 4.17A, 4.18A a 4.19A**) je zřejmé, že metoda DVS-Perloza upřednostňuje nízké molekulové hmotnosti, relativně bazické a více hydrofobní peptidy než obě zbylé metody. Vysoká četnost malých peptidů koresponduje s nízkou hodnotou tzv. „miscleavages“ (malým počtem chyb při štěpení trypsinem), což znamená, že ve vzorku nezůstávají nedoštěpené delší fragmenty peptidů. A pouze v tomto parametru předčila metoda DVS-Perloza ostatní protokoly (viz **Tab. 4.5**).

Daleko zajímavější rozdíly lze vyzorovat z grafů pro proteiny (**Obr. 4.17B, 4.18B a 4.19B**). Je zřejmé, že metoda DVS-Perloza, stejně jako v případě peptidů, preferuje hlavně nízkomolekulární proteiny do hmotnosti 20 kDa. Naproti tomu metoda SB-HCOOH upřednostňuje především proteiny v oblasti 20-40 kDa a dále pak proteiny nad 80 kDa stejně jako metoda FASP.

Dále se ukázalo, že metody vykazovaly velké nesymetrické rozdělení relativní četnosti s ohledem k pI proteinů. Jak ukazuje obrázek 4.18B, u metody DVS-Perloza byly nejvíce zastoupené proteiny s vysokým pI, mající ve své sekvenci velké množství bazických aminokyselin argininu a lysinu. Postranní řetězce těchto aminokyselin se chovají jako nukleofil a tvoří kovaletní vazbu s divinylsulfonovou skupinou Michaelisovou adicí. V případě FASP metody měly nejvyšší zastoupení kyselé proteiny v oblasti pI 4,0-5,0, zatímco metoda SB-HCOOH preferovala více bazické proteiny v oblasti pI 8,0-9,0.

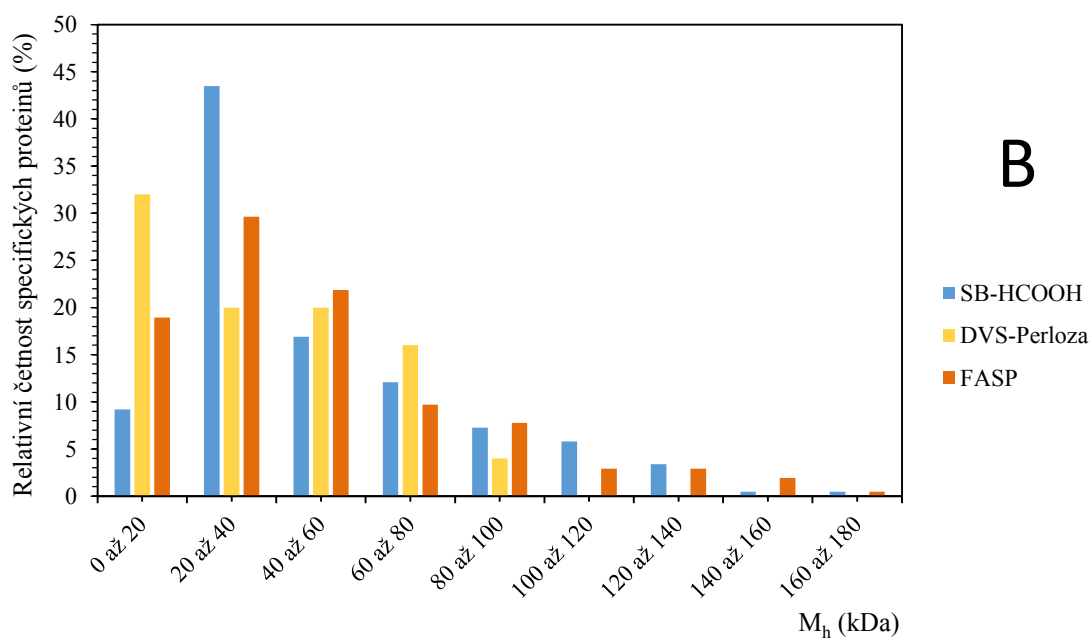
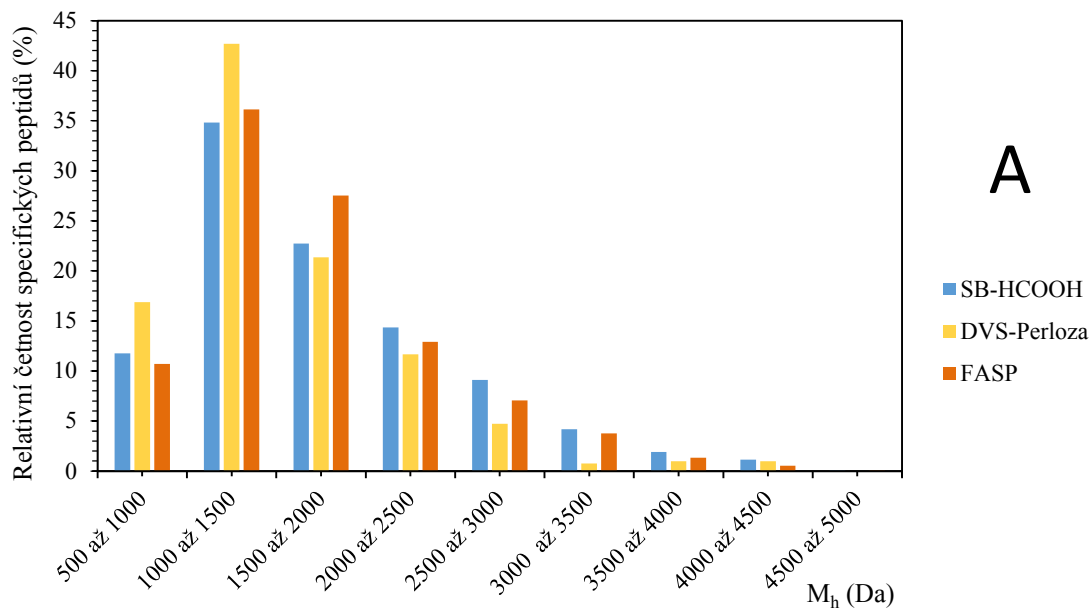
Rozdíl mezi třemi metodami byl pozorován i po výpočtu GRAVY indexu. Ačkoliv tyto odlišnosti nebyly velké. Nejvíce se lišil postup s DVS-Perlozou, který měl nejvyšší zastoupení mírně nepolárních proteinů s hodnotami 0 až 0,5. Metody SB-HCOOH a FASP jsou si podobné a straní spíše hydrofilním proteinům s GRAVY indexy 0 a méně. I když oba postupy poskytly i malé procento nepolárních proteinů (viz **Obr. 4.19B**).

Celkově lze říci, že příprava vzorků moči před LC-MS proteomickou analýzou pomocí SpeedBeads mikročástic v režimu HILIC chromatografie dává minimálně stejný, v případě peptidů i vyšší, počet identifikací jako metoda FASP a je proto vhodná

pro rutinní prekoncentraci proteinů ze vzorů moči. Nicméně vzhledem k tomu, že obě metody poskytují z jedné třetiny jiný set peptidů a proteinů, je vhodné pro důkladnou proteomickou analýzu biologického materiálu použít jejich kombinaci.

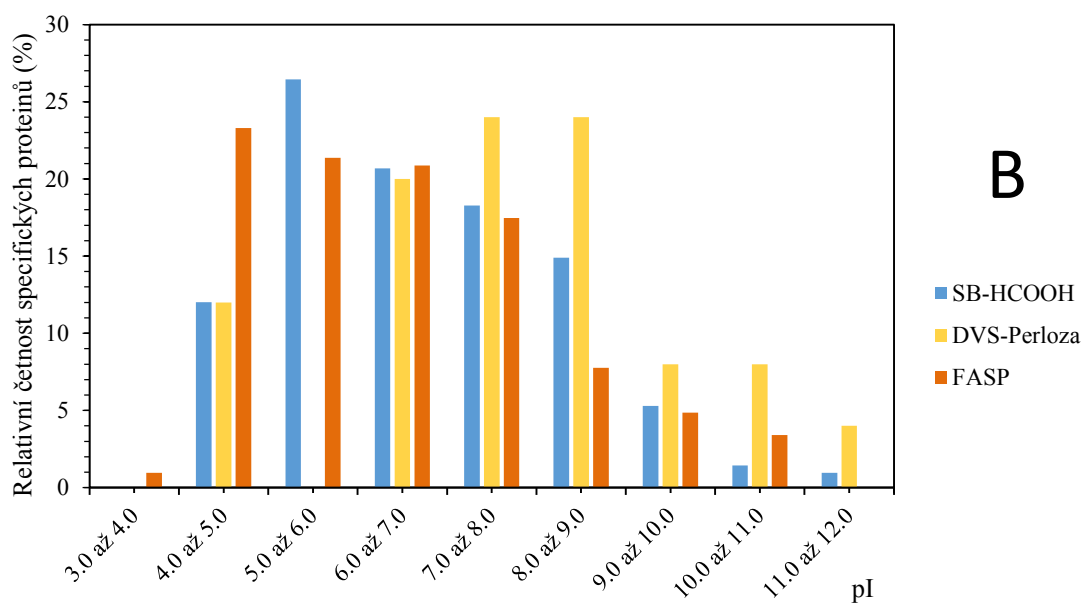
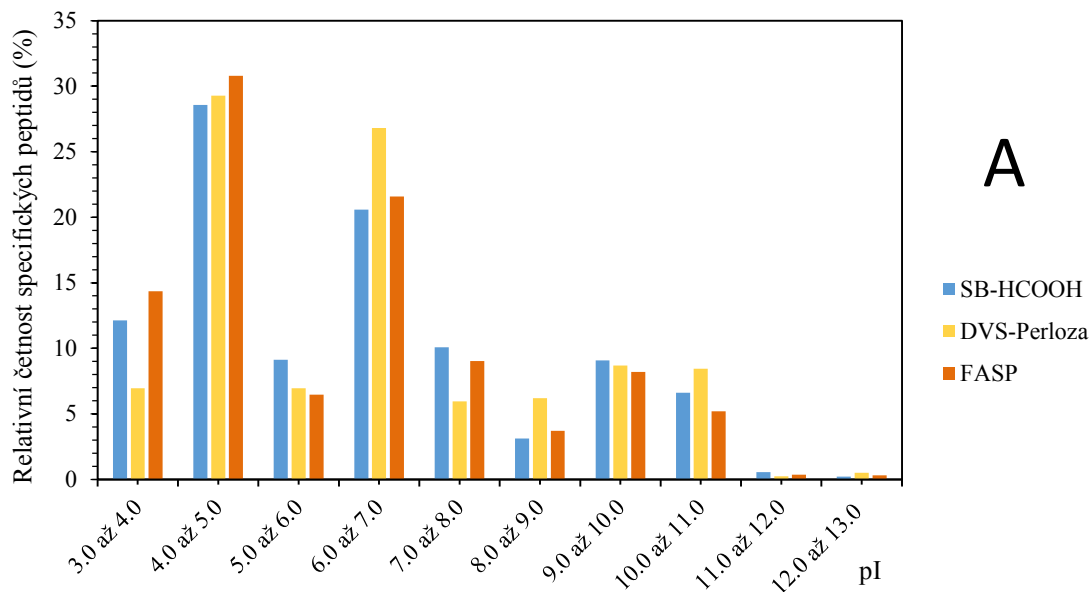
Na konec byl charakterizován močový proteom získaný jednotlivými metodami pomocí „gene-ontology“ analýzy, kdy byly specifickým identifikovaným proteinům přiřazeny termíny spojené s buněčnou komponentou („Cellular component“) a bylo provedeno porovnání relativního zastoupení těchto termínů mezi jednotlivými metodami.

**Obr. 4.20** ukazuje výsledky těchto srovnávacích proteinových lokalizací, přičemž je uvedeno pouze 10 nejčtenějších GO termínů. Tato analýza ukázala, že protokol s DVS-Perlozou obohacuje přednostně extracelulární proteiny. Proteiny plazmatické membrány jsou obohaceny především FASP metodou a postup SB-HCOOH je specifický pro lysosomální, cytosolové a jaderné proteiny, zatímco jiné intracelulární proteiny nejsou obohaceny. Lze očekávat, že moč by měla obsahovat mnoho extracelulárních proteinů, nicméně přítomnost proteinů plazmatické membrány a intracelulárních proteinů je relativně překvapivá. Tyto výsledky naznačují, že existují specifické dráhy pro transport těchto původem buněčných proteinů do moči<sup>54</sup>. Již dříve byla navržena vylučovací dráha proteinů renálních apikálních plazmatických membrán prostřednictvím procesu tvorby exozomů<sup>56</sup> a právě exozomální proteiny byly též nejvíce preferovány metodou SB-HCOOH, jak je vidět na **Obr. 4.20**.

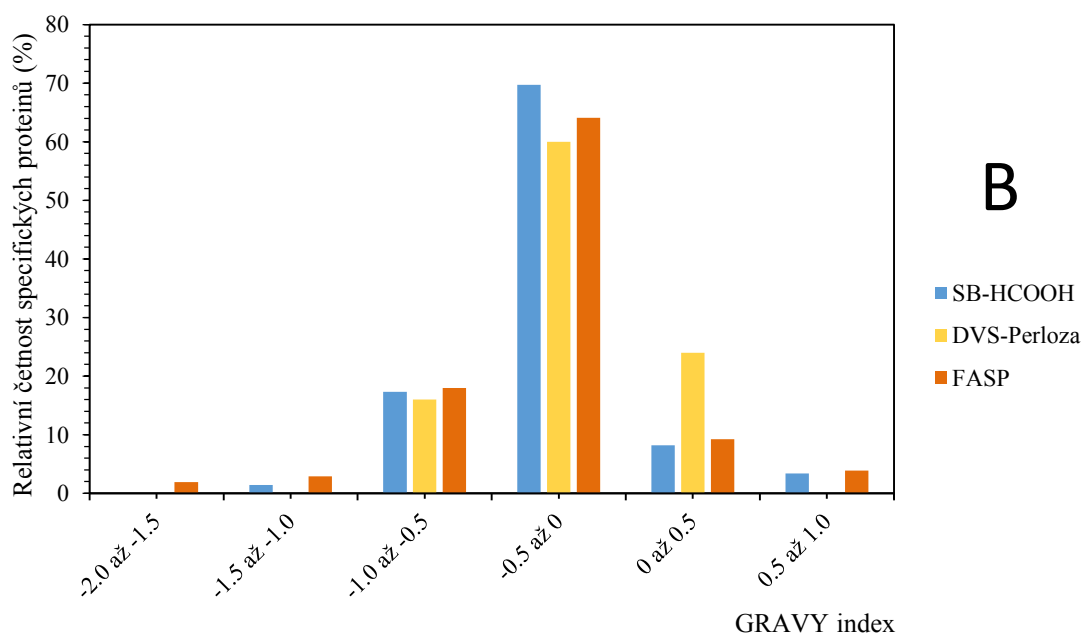
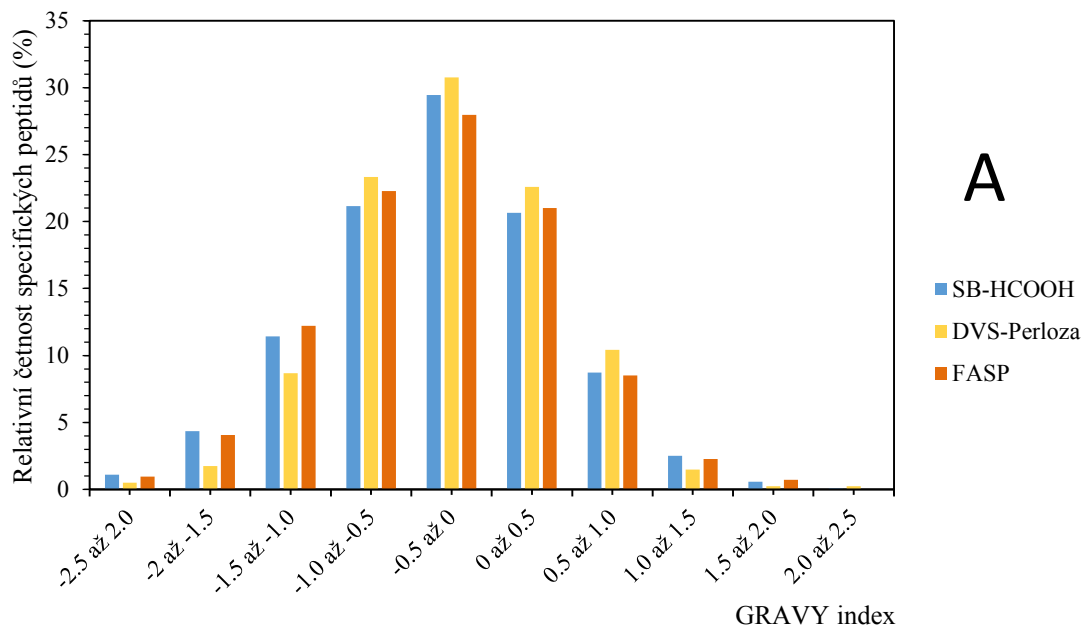


**Obr. 4.17** Relativní zastoupení identifikovaných specifických peptidů (A) a proteinů (B) získaných metodou s SB-HCOOH (modrá), DVS-Perloza (žlutá) a FASP (oranžová) a ležících mimo překryv z hlediska molekulové hmotnosti ( $M_h$ ).

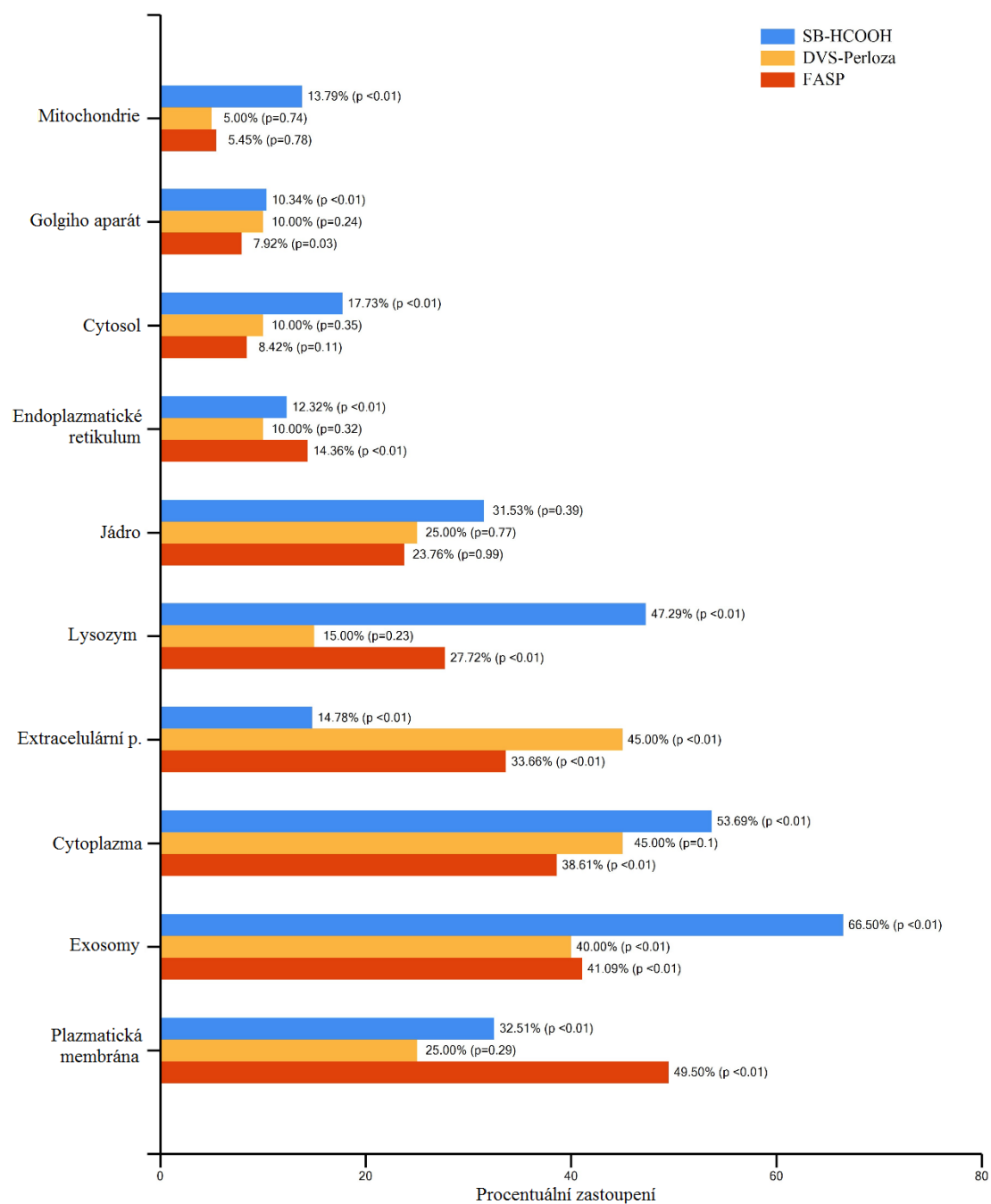




**Obr. 4.18** Relativní zastoupení identifikovaných specifických peptidů (A) a proteinů (B) získaných metodou s SB-HCOOH (modrá), DVS-Perloza (žlutá) a FASP (oranžová) a ležících mimo překryv z hlediska izoelektrického bodu (pI).



**Obr. 4.19** Relativní zastoupení identifikovaných specifických peptidů (A) a proteinů (B) získaných metodou s SB-HCOOH (modrá), DVS-Perloza (žlutá) a FASP (oranžová) a ležících mimo překryv z hlediska hydrofobicity („GRAVY index“).



**Obr. 4.20** GO anotace buněčných komponent („Cellular component“) specifických proteinů pro danou metodu přípravy vzorku moče, jmenovitě pro SB-HCOOH (modrá), DVS-Perloza (žlutá) a FASP (oranžová).

## 5. ZÁVĚR

Moč lze považovat za ideální neinvazivní zdroj biomarkerů, které mohou sloužit k časnému odhalení onemocnění ledvin. „Shotgun“ proteomika využívající kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) představuje ideální technologii pro analýzu proteinů v tělních tekutinách a hledání nových biomarkerů. Výhodou této technologie je možnost v jednom kroku identifikovat a současně kvantifikovat proteiny ve vzorku. Také neustálý technologický vývoj v oblasti hmotnostní spektrometrie umožňuje získávat data s čím dál vyšší přesností a s čím dál nižší mezí detekce. Tento pokrok nám umožňuje stále hlouběji pronikat do nezmapované části lidského proteomu.

Významnou roli v proteomickém procesu hraje příprava vzorku, protože ve většině případů není složení biologické matrice vzorků kompatibilní s LC-MS analýzou. Takovým typem vzorku je i moč, která obsahuje velké množství různých metabolitů, solí a pigmentů. V takovém případě se příprava vzorku spoléhá na několikastupňový proces složený z extrakce proteinů, jejich přečištění, zakoncentrování a proteolytického štěpení. Tato diplomová práce se zabývala přípravou vzorku moči zdravých dárců před LC-MS/MS analýzou pomocí paramagnetických mikročástic s vázanými karboxylovými skupinami v režimu HILIC chromatografie. Studovaná metoda byla optimalizována a porovnána s dalšími zavedenými postupy jako je především příprava vzorku za pomoci filtru FASP.

Výsledky experimentů týkající se optimalizace podmínek zakoncentrování proteinů z moče ukázaly, že nejvyšších proteinových výtěžků bylo dosaženo, při složení „mobilní fáze“ s 50% acetonitrilem a přídavkem 2,5  $\mu$ L kyseliny mravenčí do 0,5 mL vzorku moči s výsledným pH 3,0 po inkubaci 20 minut za laboratorní teploty. Experimenty s přídavkem kyseliny trifluoroctové neposkytovaly uspokojivé výsledky.

V dalším bloku experimentů zaměřeného na porovnání pěti různých prekoncentračních protokolů bylo zjištěno, že optimalizovaná metoda SB-HCOOH, založená na HILIC interakci na povrchu paramagnetických mikročástic, poskytovala nejvyšší počet identifikovaných peptidů a proteinů s nejvyšším průměrným pokrytím sekvence ze stejného počátečního množství moči. Srovnatelných výsledků dosahovala pouze standardní metoda FASP, která ačkoliv měla nižší peptidové výtěžky, dokázala

i tak dostatečně pokrýt močový proteom. Nicméně postup SB-HCOOH dosáhl těchto výborných výsledků v trojnásobně kratším čase s výrazně nižšími náklady na analýzu jednoho vzorku.

Naopak jako nevýhodné se ukázalo použití metody s divinylsulfonem aktivovanými paramagnetickými mikročásticemi z perlové celulózy, protože tvorba kovalentní vazby nebyla dostatečně rychlá, postup byl zdlouhavý a pravděpodobně docházelo ke ztrátám peptidů v materiálu částic. Tento protokol by si zasloužil samostatný proces optimalizace, ale z časových důvodů to nebylo možné.

Vedle toho byly metody, založené na odlišných principech retence proteinů, porovnávány na základě fyzikálně-chemických vlastností identifikovaných peptidů a proteinů specifických pro daný protokol. Tyto vlastnosti byly spočítány z peptidových a proteinových sekvencí a jmenovitě se jednalo o molekulovou hmotnost, izoelektrický bod a hydrofobicitu (GRAVY index). Výsledky těchto analýz ukázaly, že metoda SB-HCOOH preferuje peptidy a proteiny podobných vlastností jako v praxi zavedená metoda FASP. Přesto zde zůstává téměř 25 % proteinových identifikací, které jsou popsány jen jednou z metod. Proto by bylo vhodné, pro důkladnou proteomickou analýzu močového proteomu, použít jejich kombinaci.

Močový proteom ve vzorcích po jednotlivých proteomických protokolech byl charakterizován pomocí „gene-ontology“ analýzy. Její výsledky ukázali, že moč neobsahuje pouze extracelulární bílkoviny, jak by se dalo předpokládat, ale značné množství intracelulárních peptidů a proteinů exozomálního původu.

V této diplomové práci byla vůbec poprvé aplikována metoda s využitím paramagnetických mikročástic SpeedBeads v kombinaci s principem zachycení močových proteinů na jejich povrchu pomocí mechanismu HILIC chromatografie před LC-MS/MS analýzou.

Výsledky této práce budou aplikovány přímo do praxe v Laboratoři nefrologické proteomiky, na pracovišti Ústavu patologické fyziologie, 1. LF UK v Praze.

## 6. LITERATURA

1. Peng, J. M.; Gygi, S. P., Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 1083-1091.
2. Chmelík, J., Proteomický průvodce. *Chemické listy* **2005**, *99*, 883 – 885.
3. Aebersold, R.; Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 198-207.
4. Mallick, P.; Kuster, B., Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 695-709.
5. Stojnev, S.; Pejčić, M.; Dolicanin, Z.; Velickovic, L. J.; Dimov, I.; Stefanovic, V., Challenges of genomics and proteomics in nephrology. *Renal failure* **2009**, *31*, 765-72.
6. Gao, Y. H., Urine Is a Better Biomarker Source Than Blood Especially for Kidney Diseases. In *Urine Proteomics in Kidney Disease Biomarker Discovery*, Gao, Y., Ed. Springer-Verlag Berlin: Berlin, 2015; Vol. 845, pp 3-12.
7. Jia, L. L.; Zhang, L.; Shao, C.; Song, E. L.; Sun, W.; Li, M. X.; Gao, Y. H., An Attempt to Understand Kidney's Protein Handling Function by Comparing Plasma and Urine Proteomes. *PLoS One* **2009**, *4*, 9.
8. Decramer, S.; de Peredo, A. G.; Breuil, B.; Mischak, H.; Monsarrat, B.; Bascands, J. L.; Schanstra, J. P., Urine in Clinical Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1850-1862.
9. Marimuthu, A.; O'Meally, R. N.; Chaerkady, R.; Subbannayya, Y.; Nanjappa, V.; Kumar, P.; Kelkar, D. S.; Pinto, S. M.; Sharma, R.; Renuse, S.; Goel, R.; Christopher, R.; Delanghe, B.; Cole, R. N.; Harsha, H. C.; Pandey, A., A Comprehensive Map of the Human Urinary Proteome. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 2734-2743.
10. Schaub, S.; Wilkins, J.; Weiler, T.; Sangster, K.; Rush, D.; Nickerson, P., Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney international* **2004**, *65*, 323-32.
11. Tantipaiboonwong, P.; Sinchaikul, S.; Sriyam, S.; Phutrakul, S.; Chen, S. T., Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients. *Proteomics* **2005**, *5*, 1140-9.

12. Thongboonkerd, V.; McLeish, K. R.; Arthur, J. M.; Klein, J. B., Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney international* **2002**, *62*, 1461-1469.
13. Khan, A.; Packer, N. H., Simple urinary sample preparation for proteomic analysis. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2824-2838.
14. Thongboonkerd, V.; Chutipongtanate, S.; Kanlaya, R., Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: Quantity, quality, and variability. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 183-191.
15. Court, M.; Selevsek, N.; Matondo, M.; Allory, Y.; Garin, J.; Masselon, C. D.; Domon, B., Toward a standardized urine proteome analysis methodology. *Proteomics* **2011**, *11*, 1160-1171.
16. Zou, L. L.; Sun, W., Human Urine Proteome: A Powerful Source for Clinical Research. In *Urine Proteomics in Kidney Disease Biomarker Discovery*, Gao, Y., Ed. Springer-Verlag Berlin: Berlin, 2015; Vol. 845, pp 31-42.
17. Oh, J.; Pyo, J. H.; Jo, E. H.; Hwang, S. I.; Kang, S. C.; Jung, J. H.; Park, E. K.; Kim, S. Y.; Choi, J. Y.; Lim, J., Establishment of a near-standard two-dimensional human urine proteomic map. *Proteomics* **2004**, *4*, 3485-3497.
18. Safarik, I., Pospiskova, K., Horska, K., Safarikova, M., Magnetically Responsive (Nano) Biocomposites. *Soft Matter* **2012**, *8*, 5407-5413.
19. Pečová, M., Zajoncová, L., Poláková, K., Čuda, J., Šafaříková, M., Šebela, M., Šafařík, I., Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy* **2011**, *105*, 524-530.
20. Safarik, I.; Safarikova, M., Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagnetic research and technology* **2004**, *2*, 7.
21. Albertoni, G. A.; Arnoni, C. P.; Araujo, P. R. B.; Andrade, S. S.; Carvalho, F. O.; Girao, M.; Schor, N.; Barreto, J. A., Magnetic bead technology for viral RNA extraction from serum in blood bank screening. *Braz. J. Infect. Dis.* **2011**, *15*, 547-552.
22. Safarik, I., Safarikova, M., Magnetically Responsive Nanocomposite Materials for Bioapplications *Solid State Phenomena* **2009**, *151*, 88-94.
23. Hughes, C. S.; Foehr, S.; Garfield, D. A.; Furlong, E. E.; Steinmetz, L. M.; Krijgsveld, J., Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Molecular systems biology* **2014**, *10*, 757.

24. Buszewski, B.; Noga, S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 231-247.
25. Alpert, A. J., Hydrophilic-Interaction Chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography* **1990**, *499*, 177-196.
26. Tetaz, T.; Detzner, S.; Friedlein, A.; Molitor, B.; Mary, J. L., Hydrophilic interaction chromatography of intact, soluble proteins. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5892-5896.
27. Periat, A.; Krull, I. S.; Guillarme, D., Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 357-367.
28. Boersema, P. J.; Mohammed, S.; Heck, A. J. R., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 151-159.
29. Thermo Scientific Sera-Mag Speedbeads. Dostupné z URL: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PS\\_TS%20Sera-Mag%20SpeedBeads%20CM\\_V5a.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PS_TS%20Sera-Mag%20SpeedBeads%20CM_V5a.pdf) [cit. 26.4.2017]
30. GE Healthcare Life Sciences. Dostupné z URL: [http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-cz/products/AlternativeProductStructure\\_24411/29103105](http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-cz/products/AlternativeProductStructure_24411/29103105) [cit. 20.4.2017]
31. Částice Perloza MG200. Dostupné z URL: <https://www.perloza.cz/cz/perloza/mg/perloza-mg200> [cit. 20.4.2017]
32. Glazer, A. N., Bioconjugate techniques - Hermanson,GT. *Nature* **1996**, *381*, 290-290.
33. dos Santos, J. C. S.; Rueda, N.; Barbosa, O.; Fernandez-Sanchez, J. F.; Medina-Castillo, A. L.; Ramon-Marquez, T.; Arias-Martos, M. C.; Millan-Linares, M. C.; Pedroche, J.; Yust, M. D.; Goncalves, L. R. B.; Fernandez-Lafuente, R., Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 20639-20649.
34. Vařilová, T., Stacionární fáze v afinitní chromatografii. *Chemické Listy* **2005**, *99*, 570-577.



35. Kopylov, A. T.; Zgoda, V. G.; Lisitsa, A. V.; Archakov, A. I., Combined use of irreversible binding and MRM technology for low- and ultralow copy-number protein detection and quantitation. *Proteomics* **2013**, *13*, 727-742.
36. Sartorius. . Dostupné z URL:  
<[https://www.sartorius.com/sartorius/en/EUR/Products/Laboratory/Ultrafiltration/Vivacon-500/p/M\\_Vivacon500](https://www.sartorius.com/sartorius/en/EUR/Products/Laboratory/Ultrafiltration/Vivacon-500/p/M_Vivacon500)> [cit. 15.4.2017]
37. Wisniewski, J. R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M., Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* **2009**, *6*, 359-U60.
38. Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850-858.
39. Nagaraj, N.; Lu, A. P.; Mann, M.; Wisniewski, J. R., Detergent-Based but Gel-Free Method Allows Identification of Several Hundred Membrane Proteins in Single LC-MS Runs. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 5028-5032.
40. Yu, Y. B.; Suh, M. J.; Sikorski, P.; Kwon, K.; Nelson, K. E.; Pieper, R., Urine Sample Preparation in 96-Well Filter Plates for Quantitative Clinical Proteomics. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5470-5477.
41. Erde, J.; Loo, R. R. O.; Loo, J. A., Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 1885-1895.
42. Cox, J.; Hein, M. Y.; Lubner, C. A.; Paron, I.; Nagaraj, N.; Mann, M., Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 2513-2526.
43. Apweiler, R.; Martin, M. J.; O'Donovan, C.; Magrane, M.; UniProt, C., The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, D142-D148.
44. Atkin-Smith, G. K.; Tixeira, R.; Paone, S.; Mathivanan, S.; Collins, C., A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10.
45. Blake, J. A.; Christie, K. R.; Dolan, M. E., Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D1049-D1056.

46. Prasad, T. S. K., Human Protein Reference Database-2009 update. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D767-D772.
47. Maglott, D.; Ostell, J.; Pruitt, K. D.; Tatusova, T., Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D52-D57.
48. Zhang, Y. Y.; Fonslow, B. R.; Shan, B.; Baek, M. C.; Yates, J. R., Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2343-2394.
49. Chourey, K.; Jansson, J.; VerBerkmoes, N.; Shah, M.; Chavarria, K. L.; Tom, L. M.; Brodie, E. L.; Hettich, R. L., Direct Cellular Lysis/Protein Extraction Protocol for Soil Metaproteomics. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 6615-6622.
50. Zhou, J. Y.; Dann, G. P.; Shi, T. J.; Wang, L.; Gao, X. L.; Su, D. A.; Nicora, C. D.; Shukla, A. K.; Moore, R. J.; Liu, T.; Camp, D. G.; Smith, R. D.; Qian, W. J., Simple Sodium Dodecyl Sulfate-Assisted Sample Preparation Method for LC-MS-Based Proteomics Applications. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2862-2867.
51. Skeie, J. M.; Mahajan, V. B., Proteomic Interactions in the Mouse Vitreous-Retina Complex. *PLoS One* **2013**, *8*, 14.
52. Tang, Y.; Underwood, A.; Gielbert, A.; Woodward, M. J.; Petrovska, L., Metaproteomics Analysis Reveals the Adaptation Process for the Chicken Gut Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 478-485.
53. Raimondo, F.; Corbetta, S.; Morosi, L.; Chinello, C.; Gianazza, E.; Castoldi, G.; Di Gioia, C.; Bombardi, C.; Stella, A.; Battaglia, C.; Bianchi, C.; Magni, F.; Pitto, M., Urinary exosomes and diabetic nephropathy: a proteomic approach. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 1139-1146.
54. Adachi, J.; Kumar, C.; Zhang, Y. L.; Olsen, J. V.; Mann, M., The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome Biol.* **2006**, *7*, 16.
55. Kyte, J.; Doolittle, R. F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105-132.
56. Kanno, K.; Sasaki, S.; Hirata, Y.; Ishikawa, S.; Fushimi, K.; Nakanishi, S.; Bichet, D. G.; Marumo, F., Urinary-Excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes-insipidus. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1540-1545.