

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza posttranslačně modifikovaných (glykovaných) proteinů metodami
kapilární elektroforézy
Bc. Zdeňka Zmatlíková

Diplomová práce

2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zdeňka ZMATLÍKOVÁ**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Analýza posttranslačně modifikovaných (glykovaných) proteinů metodami kapilární elektroforézy**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
 - a) obecný úvod o kapilárně elektromigračních metodách pro analýzu proteinů
 - b) rešerše o posttranslačních modifikacích proteinů se zaměřením na glykace
 - c) Přehled využití kapilárně elektroforetických metod pro analýzu proteinů
- 2) Praktická část:
 - a) Vypracování metod pro modifikaci (glykaci) modelových proteinů (předpokládá se studium albuminu a kolagenu).
 - b) Vypracování metod peptidového mapování využívající enzymy štěpící v rozdílných místech sekvence (např. trypsin, pepsin, proteináza K).
 - c) Vypracování kapilárně-elektroforetické metody pro analýzu vzniklých peptidových map se zaměřením na dosažení co nejvyšší citlivosti.
 - d) Vypracování metody spojení kapilárně elektroforetické separace s hmotností spektrometrií (CE-MS) a její srovnání s metodou HPLC-MS.
 - e) Porovnat dosažené výsledky pro jednotlivé modifikace, proteiny a analytické metody.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

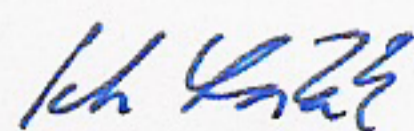
doc. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.
Fyziologický ústav AV Praha

Datum zadání diplomové práce:

1. října 2008

Termín odevzdání diplomové práce:

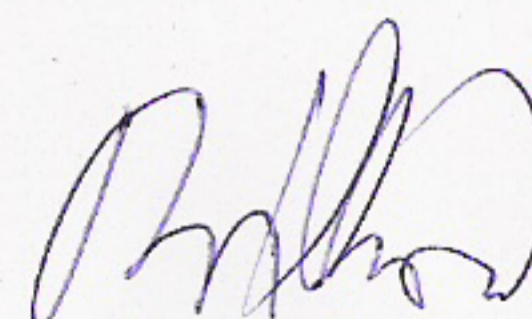
7. května 2009



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Kolíně dne 30. 4. 2009



Zdeňka Zmatlíková

Poděkování

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli doc. Ing. Ivanu Mikšíkovi, DrSc. za jeho vědecké vedení a cenné rady, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Dále děkuji všem členům laboratoře za jejich pomoc a pochopení. Hluboký dík patří mým rodičům a příteli za jejich trpělivost a podporu, kterou mi po celou dobu studia poskytovali.

SOUHRN

Práce se zabývá využitím elektroforetických, chromatografických metod a jejich spojení s hmotnostně spektrometrickými metodami (CE, CE-MS, HPLC-MS) pro analýzu posttranslačních modifikací (glykací) proteinů, jmenovitě albuminu.

Teoretická část je věnována albuminu, problematice posttranslačních modifikací proteinů se zaměřením na glykace, mechanismům CE separace peptidů a proteinů se zaměřením na CZE, výběru vhodných separačních podmínek, možnostem potlačení adsorpce proteinů na stěnu kapiláry, zlepšení citlivosti detekce, detekčním systémům a využití CE metod pro analýzu proteinů

Experimentální část přibližuje používané chemikálie, instrumentaci a metody používané pro tyto studie. Jsou zde také popsány postupy používané pro přípravu jednotlivých vzorků.

Ve výsledcích a diskuzi jsou shrnuty veškeré získané výsledky a poznatky. Tato kapitola je rozdělena do tří částí. Jednotlivé části jsou věnovány používaným metodám (CE, CE-MS, HPLC-MS).

KLÍČOVÁ SLOVA

Posttranslační modifikace, neenzymatická glykace, albumin, kapilární elektroforéza (CE), kapilární zónová elektroforéza (CZE), CE-MS, HPLC-MS

SUMMARY

This thesis is concerned with utilization electrophoretic, chromatographic methods and their on-line coupling to mass spectrometry (CE, CE-MS, HPLC-MS) for analysis of posttranslation modification (glycation) of proteins, especially of albumin.

The theoretical part describes albumin, the problems of posttranslation modification of proteins with a focus on glycation, CE separation mechanisms of peptides and proteins with a focus on CZE, the choice of appropriate separation conditions, possibilities of suppressing adsorption of proteins to inner wall of the capillary, improving of the detection sensitivity, various types of detection systems and utilization CE methods for analysis of proteins.

The experimental part describes chemicals, instrumentation and methods used for this study. The preparation of individual samples is also described.

Results and findings are summarized and discussed in the last part of this study. This chapter is divided into three parts. Individual sections are devoted to the used methods (CE, CE-MS, HPLC-MS).

KEYWORDS

Posttranslation modification, non-enzymatic glycation, albumin, capillary electrophoresis (CE), capillary zone electrophoresis, CE-MS, HPLC-MS

SEZNAM ZKRATEK

ACE	afinitní kapilární elektroforéza
ACN	acetonitril
AGEs	konečné produkty glykace
API-ESI	ionizace za elektrosprejem (za atmosférického tlaku)
BGE	základní elektrolyt
BrNSA	1-bromo-4-naftalensulfonová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CE/ESI-MS	spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem
CE/MS	spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií
CE/UV	kapilární elektroforéza s UV detekcí
CHES	kyselina 2-(N-cyklohexylamino)ethansulfonová
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CML	karboxymethyllysin
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DABCO	1,4-diazobicyklo[2,2,2]oktan
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FITC	fluorescein izothiokyanát
GSH	glutathion
GSSH	oxidovaný glutathion
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC/ESI-MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem
HPLC/MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC/MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HSA	lidský sérový albumin
II-CZE	iontová interakční kapilární zónová elektroforéza
LC	kapalinová chromatografie
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MALDI	laserová desorpce za účasti matrice
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NACE	bezvodá kapilární elektroforéza
PDMA	poly(dimethylakrylamid)
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
pKa	disociační konstanta kyseliny
PVA	poly(vinylalkohol)
RAGE	makrofágový scavengerový receptor
SDS	dodecylsulfát sodný
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
μTAS	miniaturizovaný analytický systém
TOF-MS	hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu
Tris-HCl	tris(hydroxymetyl)aminometan hydrochlorid
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	viditelná oblast ultrafialového záření

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Albumin	11
2.1.1 Struktura a syntéza albuminu	11
2.2 Neenzymatická glykace bílkovin	12
2.2.1 Průběh neenzymatické glykační reakce	12
2.2.2 Faktory ovlivňující vznik AGEs, následky jejich tvorby a hromadění	15
2.3 Kapilární elektroforéza peptidů a proteinů	17
2.3.1 Mechanismy separace peptidů a proteinů	18
2.3.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	19
2.3.2.1 Elektromigrační vlastnosti peptidů a proteinů	19
2.3.2.2 Pufry v CZE	20
2.3.2.3 Potlačení adsorpce peptidů a proteinů	21
2.3.2.3.1 Použití velmi nízkého nebo vysokého pH pufry	21
2.3.2.3.2 Dynamické obalení kapiláry	22
2.3.2.3.3 Statické obalení kapiláry	23
2.3.2.4 Způsoby detekce	24
2.3.2.4.1 Detekce absorpce UV a interferometrie	24
2.3.2.4.2 Laserem indukovaná fluorescence	26
2.3.2.4.3 Hmotnostní spektrometrie	27
2.3.2.4.4 Ostatní detekční techniky	28
2.3.2.5 Zlepšení citlivosti detekce peptidů a proteinů	29
2.3.2.5.1 Zakoncentrování a předseparace	29
2.3.2.5.2 Derivatizace	30
2.3.2.5.3 Mikromanipulace	32
2.3.2.6 Pokroky ve vývoji CZE	32
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1 Chemikálie	35
3.2 Instrumentace	35

3.2.1	Kapilární elektroforéza	35
3.2.2	Spojení vysokoúčinné kapalinové elektroforézy s hmotnostní spektrometrií	36
3.2.3	Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií	36
3.3	Metody	36
3.3.1	Kapilární elektroforéza enzymatických štěpů BSA ve fosfátovém pufru	36
3.3.2	Kapilární elektroforéza enzymatických štěpů BSA v kyselině mravenčí	37
3.3.3	HPLC/MS enzymatických štěpů BSA	37
3.3.4	CE/MS enzymatických štěpů BSA	38
3.4	Příprava vzorků	38
3.4.1	Příprava glykovaných a kontrolních vzorků BSA	38
3.4.2	Redukce a alkylace (karboxymethylace) lysinu	39
3.4.3	Odsolení vzorků	39
3.4.4	Štěpení vzorků BSA trypsinem	40
3.4.5	Štěpení vzorků BSA pepsinem	40
3.4.6	Štěpení vzorků BSA proteinázou K	40
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
4.1	Kapilární elektroforéza enzymatických štěpů BSA	41
4.2	HPLC/MS analýza enzymatických štěpů BSA	48
4.3	CE/MS analýza enzymatických štěpů BSA	58
5.	ZÁVĚR	61
6.	LITERATURA	63

1. ÚVOD

Peptidy a proteiny tvoří rozsáhlou a významnou skupinu biomolekul. Podílejí se na kontrole a regulaci životně důležitých procesů ve všech živých organismech. Působí například jako hormony, neurotransmitery, imunomodulátory, enzymy, koenzymy, enzymové substráty a inhibitory, receptorové ligandy, léčiva, toxiny a antibiotika.

Bylo zjištěno, že pro organismus je důležitá nejenom základní informace o struktuře bílkoviny (obsažená v genomu), ale také následné úpravy tzv. posttranslační modifikace, které souvisí jak s procesy fyziologickými (například hydroxylace lysinu a prolinu v kolagenu), tak s patologickými (například projevy diabetes mellitus). V současné době probíhá tak zvaná éra proteomu, která vystřídala éru genomu. Pomocí proteomického přístupu lze totiž dynamicky popsat celou řadu proteinů dané buňky či tkáně (na rozdíl od statického genomu). Obor zvaný proteomika se zabývá porozuměním složitým biologickým procesům (například vývoji buňky, buněčné diferenciaci a signální transdukci). K tomu je zapotřebí detekovat, identifikovat a kvantifikovat různorodé proteiny, stanovovat jejich interakce, lokalizovat je uvnitř buněk a charakterizovat jejich posttranslační modifikace. K identifikaci struktury a funkce proteinů slouží často jejich peptidové fragmenty získané štěpením různými enzymy. Tyto štěpy se stanovují zejména vysokoúčinnými separačními metodami a jejich spojením s hmotnostně-spektroskopickými metodami. Mezi nejúčinnější patří různé techniky kapilární elektroforézy (CE).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Albumin

Albumin je protein krevní plazmy, který tvoří více než polovinu všech plazmatických bílkovin. Pro svou vysokou koncentraci v plazmě (35-53 g/l) a relativně malou molekulovou hmotnost (68 kDa) se více než 75% podílí na udržování onkotického tlaku plazmy a pokles jeho koncentrace může být tedy doprovázen otoky.

Neméně důležitá je jeho transportní funkce. Přenáší nekonjugovaný bilirubin, neesterifikované mastné kyseliny, tyreoidální hormony (zejména tyroxin, méně i trijodtyronin), část plazmatického tryptofanu a minerály (například vápník, hořčík, zinek). Váže se na něj značný podíl některých léků (například penicilinu, digoxinu a salicylátů) (1). U pacientů s hypoalbuminemií může tedy docházet ke zvýšení volné frakce léku, která je na rozdíl od frakce navázané na albumin účinná. Výše uvedené látky se mohou z vazby na albumin navzájem vytěsňovat (například volné mastné kyseliny a některé léky mohou vytěsnit navázaný bilirubin a ohrozit novorozence poškozením centrální nervové). Albumin se dále uplatňuje i jako součást extracelulárního antioxidačního systému v ochraně proti volným radikálům.

V krevní plazmě se nachází jen zhruba 42% celkového tělního albuminu. Zbytek nalezneme ve tkáních (hlavně podkoží a svaly). Nepatrné množství proniká přes hematoencefalickou bariéru do mozkomíšního moku.

2.1.1 *Struktura a syntéza albuminu*

Na rozdíl od ostatních plazmatických bílkovin není albumin glykoprotein (2). Je to o protein elipsoidního tvaru, který tvoří jeden polypeptidový řetězec o 585 aminokyselinách. Obsahuje 17 disulfidických můstků. Působením proteáz se štěpí na tři domény s rozdílnými funkcemi.

Albumin je syntetizován jako preproprotein v hepatocytech. Jeho signální peptid je odstraněn při průchodu do cisteren zrnitého endoplasmatického retikula, a

hexapeptid na zbylém N-konci je následně odštěpen v dalším průběhu sekreční dráhy. Játra za den vyprodukují přibližně 12 g albuminu.

Biologický poločas albuminu je asi 20 dní, potom dochází k jeho odbourávání endotelem krevních kapilár. Malé množství albuminu proniká do moče nebo se ztrácí difúzí do trávicí trubice.

2.2 Neenzymatická glykace bílkovin

Posttranslační modifikace bílkovin jsou významné reakce, které podstatným způsobem ovlivňují funkce bílkovin v organismu. Principiálně je lze rozdělit na enzymatické a neenzymatické. Neenzymatické modifikace jsou výrazným způsobem ovlivněny nejen endogenními, ale i exogenními faktory. Mezi tyto reakce patří glykace, která hraje významnou roli ve vzniku chronických komplikací diabetu, urémie, v procesech stárnutí a degenerace mozku.

Při neenzymatické glykaci proteinů (starším názvem neenzymatické glykosylaci) reagují volné aminoskupiny s karbonylovými skupinami redukujících cukrů bez katalytického působení enzymů. Tuto reakci poprvé popsal Louis Maillard (3), který pozoroval zhnědnutí bílkovin při jejich zahřívání s cukry, a na jeho počest se nazývá Maillardova reakce. Zpočátku se zdálo, že tato reakce má význam pouze v potravinářské chemii, ale v roce 1971 bylo zjištěno, že glykace probíhá v každém živém organismu (4), zejména je-li v krvi zvýšená koncentrace cukrů.

2.2.1 Průběh neenzymatické glykační reakce

Neenzymatická glykace probíhá ve třech krocích, které lze v analogii s řetězovými radikálovými reakcemi nazvat iniciace, propagace a terminace.

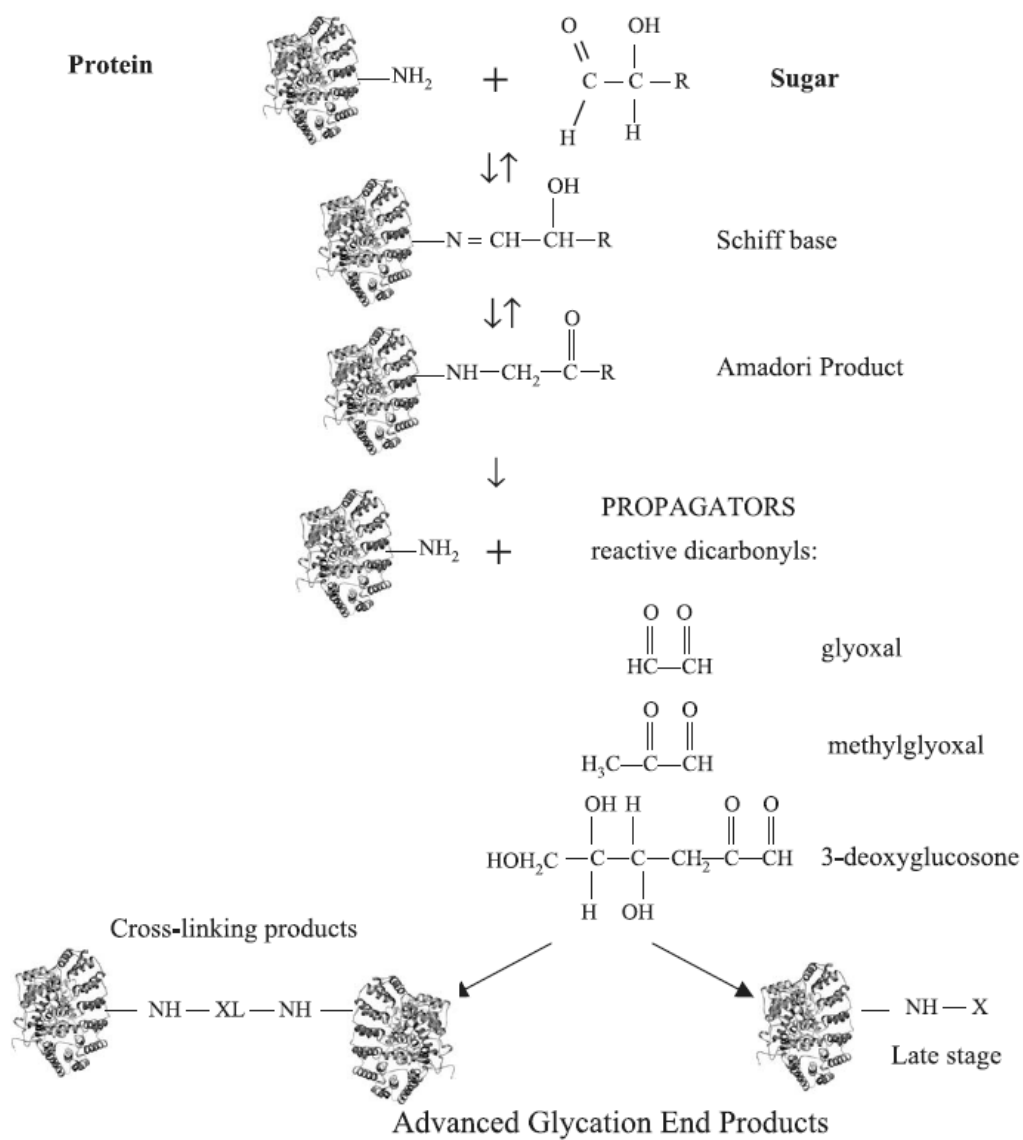
V prvním kroku vznikají tzv. rané produkty glykace. Nejprve dochází ke kondenzaci redukujících cukrů (hlavně glukózy, ale i fruktózy, pentózy, galaktózy, mannózy, askorbátu a xylulózy) s ϵ -aminoskupinou lysinového zbytku (případně aminoskupiny koncové aminokyseliny či argininu) a vzniku nestabilní Schiffovy báze, která se rychle přeskupuje na mnohem stabilnější ketoamin, tzv. Amadoriho

produkt (5). Vzhledem k tomu, že tato reakce nevyžaduje účast enzymů, jsou proměnnými, které ji in vivo regulují, koncentrace redukujícího cukru a proteinu, biologický poločas proteinu, reaktivita volných aminoskupin a propustnost buněčné stěny pro cukr. Při podmínkách in vivo dosáhne Amadoriho produkt rovnováhy za přibližně 15-20 dní a díky nevratnému spojení se hromadí v dlouho i krátce žijících proteinech (6).

Během propagace jsou Amadoriho produkty rozkládány na karbonylové sloučeniny (glyoxal, methylglyoxal, deoxyglukosony), které jsou vysoce reaktivní a mohou znovu reagovat s volnými aminoskupinami proteinů, tím propagují celou neenzymatickou glykaci.

Zejména methylglyoxal je velmi reaktivní alfa-oxaldehyd, který může vznikat jak reakcemi, které jsou závislé na množství glukózy (neenzymatická glykace, polyolovou cestou), tak z meziproductů glykolýzy, metabolismem ketosloučenin a katabolismem threoninu. Vysoká reaktivita a zvýšená koncentrace methylglyoxalu v plazmě naznačuje, že tato sloučenina je jednou z nejdůležitějších sloučenin in vivo (7).

V poslední fázi reagují výše zmíněné propagátory s volnými aminoskupinami a prostřednictvím oxidační, dehydratační a cyklizační reakce vznikají žlutohnědé, často fluorescenční a nerozpustné konečné produkty glykace tzv. AGEs (Advanced Glycation End Products), které jsou termodynamicky stabilní a tedy terminují neenzymatickou glykační reakci (8). AGEs se hromadí na proteinech s dlouhým biologickým poločasem a poškozují je.



Obr. 1 Základní schéma neenzymatické glykace (převzato z (6))

2.2.2 Faktory ovlivňující vznik AGEs, následky jejich tvorby a hromadění

Bylo dokázáno, že rychlost tvorby AGEs z dikarboxylových sloučenin odvozených z glukózy a vytvářených intracelulárně je vyšší než při jejich extracelulární tvorbě (9). Toto pozorování tedy naznačuje, že intracelulární hyperglykémie je pravděpodobně nejdůležitější příčina ve tvorbě intra- a extracelulárních AGEs. V buňkách vystavených vysoké koncentraci glukózy (5-30 mM), se objevují intracelulárně tvořené AGEs přibližně za jeden týden. Dále bylo zjištěno, že rychlost glykační reakce glukózy je velmi nízká, zatímco z jiných intracelulárních cukrů (glukózy-6-fosfátu a fruktózy) vznikají AGEs rychleji (10).

Klíčovou roli ve vzniku AGEs hrají oxidační reakce. Byly popsány dva mechanismy katalyzované přechodnými kovy (mědí a železem). První mechanismus zahrnuje autooxidaci volných cukrů v přítomnosti kyslíku a volných kovů, což vede ke tvorbě více reaktivních dikarboxylových sloučenin, které reagují s bílkovinami za vzniku vysoce reaktivních ketoaminů (11). Druhý mechanismus popisuje proteinovou vazbu Amadoriho produktů, která je více náchylná k oxidaci. Karbohydráty kondenzované na proteinu jsou oxidovány a podporují tvorbu volných radikálů, které vedou k dalšímu oxidativnímu poškození (12).

Některé známé AGEs (například pentosidin a karboxymethyllysin) jsou považované za glykooxidační produkty, protože k jejich tvorbě jsou nutné pro-oxidační podmínky (13,14).

Je nutné zdůraznit, že nejenom redukující cukry jsou schopné vytvářet výše popsaným mechanismem AGEs, ale také řada dalších látek (například askorbát a ostatní karbohydráty) reaguje s aminopeptidy, lipidy a nukleovými kyselinami za vzniku AGEs (15). Ukázalo se, že některá tato reakční činidla jsou exogenního původu, tj. přijímáme je z tepelně opracovaných potravin (zejména smažených) (16) a z tabákového kouře. AGEs vzniklé působením tabáku byly objeveny v oční čočce a v cévní stěně koronárních tepen (17).

Množství AGEs v těle odráží rovnováhu mezi jejich tvorbou a katabolismem (degradace v tkáních, vylučování ledvinami). Degradace v tkáních probíhá endocytózou makrofágy a dalšími buněčnými systémy pomocí specifických

receptorů nebo cestou bez receptorů (18, 19). Následnou proteolýzou AGEs vznikají peptidy o nízké molekulové hmotnosti, které jsou vylučovány do moče (20). Jiné intracelulární ochranné mechanismy omezují vznik AGEs (například glykoaldehydový systém přeměňuje methylglyoxal na D-laktát a antioxidační látky) (21).

U diabetiků vznikají AGEs ve vysokém množství a u pacientů s renálním selháváním je vylučování AGEs nedostatečné, dochází k akumulaci AGEs peptidů v plazmě, což vede k produkci toxických látek, interakci s bazální membránou a vazbám k lipoproteinům a kolagenu.

Dlouho se vědci domnívali, že nejvýznamnějším mechanismem poškození AGEs je tvorba příčných vazeb (hlavně u kolagenu). Ovšem významnou roli ve vzniku abnormalit tkání hrají také chemické a fyzikální modifikace proteinu (rostoucí resistance ke štěpení enzymy, snížení rozpustnosti). Třemi hlavními mechanismy poškození AGEs tedy jsou: (i) abnormální tvorba příčných vazeb; (ii) interakce se specifickými receptory a (iii) intracelulární hromadění (22).

Protein ovlivněný vznikem příčných vazeb je obvykle stabilní a má dlouhý biologický poločas. Již na počátku 80. let zjistil Monnier, že modifikace bílkovin s dlouhým poločasem života příčnými vazbami významně přispívá k poklesu funkcí buněk a tkání během procesu stárnutí (23). Tvorba příčných vazeb je velmi složitá reakce a její chemická podstata nebyla dosud zcela objasněna, ale předpokládá se, že se jich účastní hlavně lysinové zbytky (24). Patologická tvorba příčných vazeb vyvolaná AGEs vede ke zvýšení tuhosti matrice proteinů, tedy omezuje jejich funkčnost a zároveň zvyšuje odolnost vůči proteolytickým enzymům, které postupně působí na proces remodelace tkáně. Tyto změny se objevují se zvyšujícím se věkem a jsou urychlovány při diabetu (25). Modifikace proteinů vede ke tvorbě ligandů, které se váží na AGE receptory a vedou ke vzniku reaktivních kyslíkových sloučenin, aktivaci některých transkripčních faktorů a patologickým změnám v genové expresi některých typů buněk (mesangiální, endoteliální, makrofágy).

Bylo objeveno několik AGE specifických receptorů, které zahrnují makrofágový scavengerový receptor typu I a II (RAGE), oligosaccharyl transferázu 48 (AGE-R1), 80K-H fosfoprotein (AGE-R2) a galectin 3 (AGE-R3) (26). Nejvíce prozkoumaným je RAGE receptor, který patří do rodiny imunoglobulinů a slouží jako „uklízeč“ (scavenger) a zároveň zprostředkovává vnitrobuněčnou signalizaci. Vyskytuje se na buňkách endotelu (specificky v oblastech aterosklerózy) (27) a na mikroglíích mozku

(28). Vazba AGE-RAGE vede k oxidačnímu stresu a aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, který je velmi citlivý na volné radikály a spouští složitou kaskádu reakcí (stimuluje transkripci genů pro cytokiny, růstové faktory a makrofágy). Bylo zjištěno, že vazba AGE-RAGE má význam také v místech zánětu, kde fagocyty vytvářejí karboxymethyllysiny (CML) pomocí myeloperoxidasy (29). Tento způsob je nezávislý na hyperglykémii a může vysvětlovat výskyt AGEs v aterosklerotických lézích, které byly nalezeny u pacientů bez diabetu, při zánětlivých stavech (revmatoidní artritida).

Míra hromadění AGEs souvisí se závažností pozorovaných komplikací (u diabetických pacientů se jedná zejména o neuropatii, nefropatii, angiopatii, retinopatii a poškození oční čočky) (30). Pokusy na zvířecích modelech dokázaly, že hromadění AGEs má řadu důležitých důsledků na tkáňové úrovni (peroxidace lipidů, porušení funkce endotelu a nepřiměřená buněčná aktivita spojená s uvolňováním cytokinů) a na buněčné úrovni (změny v dělení buněk). Histologická studie lidských aort zjistila, že existuje závislost mezi hromaděním AGEs v tkáních a ztuhlostí aorty (31). Jiné metody využívající specifické protilátky prokázaly zvýšené hromadění některých AGEs (pyrallinu, crosslinu a pentosidinu) v ledvinách pacientů s diabetem (32). Akumulace AGEs v nervové tkáni souvisí s neurodegenerativními onemocněními (například hromadění v pyramidálních neuronech způsobuje Alzheimerovu chorobu) (33). Studie dále dokázaly, že důležitější pro vznik komplikací je spíše možná míra akumulace AGEs než jejich absolutní koncentrace.

2.3 Kapilární elektroforéza peptidů a proteinů

Kapilární elektroforéza (CE) je souhrnný název pro elektromigrační separační metody, které pro dělení látek využívají kapiláru naplněnou základním elektrolytem (BGE), který vede elektrický proud. Konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem, společně s elektrodami z inertního materiálu (například platiny). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10-30 kV). Do konce kapiláry se nadávkuje malý objem vzorku. Kapilára prochází přes detektor (obvykle fotometrický). Získaný záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforegram a je podobný

chromatogramu. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků kvantitu. V CE se k řízení a zpracování analýz využívá výpočetní technika.

CE je zajímavá alternativní metoda ke klasickým technikám plošné elektroforézy. Nespornou výhodou CE oproti plošným technikám je kratší doba analýzy způsobená zejména těmito důvody: (i) teplo vzniklé uvnitř kapiláry je účinně odváděno jejími stěnami, proto lze analýzu urychlit použitím vysokého napětí; (ii) kapilára prochází detektorem, detekce zón se tedy provádí on-line a píky lze vyhodnotit počítačem; (iii) elektroforéza je doplněna elektroosmózou, elektroosmotický tok (EOF) způsobuje pohyb roztoku kapilárou k detektoru, snižuje analytické časy a k detektoru unáší i částice elektroforeticky migrující opačným směrem. Právě zásluhou profilu elektroosmotického toku je separační účinnost kapilární elektroforézy výrazně vyšší než u jiných elektroforetických metod (řádově až miliony teoretických pater).

2.3.1 Mechanismy separace peptidů a proteinů pomocí metod CE

V sekvencích aminokyselin v polypeptidových řetězcích existuje velké množství rozdílů, které mají za následek mimořádnou rozličnost peptidů a proteinů. V závislosti na počtu, složení a sekvenci spojených aminokyselinových zbytků se peptidy a proteiny vzájemně liší svým elektrickým nábojem, velikostí (relativní molekulovou hmotností), tvarem (strukturou), hydrofobicitou a specifickou vazebnou kapacitou. Tyto vlastnosti umožňují jejich separaci pomocí elektromigračních metod založených na rozdílech v elektroforetické pohyblivosti, velikosti daných molekul (tzv. „prosívací“ efekt), interakci s ligandy a hydrofobicitě (resp. hydrofilicitě).

Rozdílných elektromigračních mobilit ve vodných pufrech se využívá pro separaci proteinů pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE), izotachoforézy (ITP) nebo kapilární izoelektrické fokusace (CIEF). Dělení v kapiláře naplněné gelem nebo polymerním roztokem připraveným z lineárního nebo prostorově zesíťovaného polymeru je založeno na „prosívacím“ efektu. Pro omezení závislosti mobility na náboji, zkrácení času separace a zvýšení rozpustnosti separovaných látek se často přidává dodecylsulfát sodný (SDS), kterým můžeme denaturovat proteiny/peptidy před vlastní analýzou nebo ho přidat do gelu či polymerního

roztoku (34). V afinitní kapilární elektroforéze (ACE) se mohou ligandy (například barviva, substráty, protilátky a antigeny) přidávat do pufru anebo imobilizovat na stěnu kapiláry (přímo nebo přes stacionární fázi). Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a kapilární elektrochromatografie (CEC) představují dvě alternativní metody vhodné pro separaci peptidů/proteinů. Obě jsou založeny na rozdělení separovaných látek mezi mobilní a (pseudo)stacionární fázi. V případě CEC je kapilára naplněna částicemi nebo monolity, které mají vhodnou velikost pórů a funkční skupiny pro vysoce efektivní separaci (případně mohou být funkční skupiny vázány na stěnu kapiláry).

2.3.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

CZE je nejjednodušší, nejuniverzálnější a nejčastěji používaná technika CE pro dělení peptidů a proteinů. CZE je vhodná pro separaci molekul s nábojem (iontů), které se vzájemně liší svou molekulovou hmotností, tvarem a nábojem. Nabité molekuly se dělí na základě svých rozdílných elektroforetických pohyblivostí (mobilit). Elektroosmotický tok separačního pufru uvnitř kapiláry unáší kladné i záporné ionty k detektoru. Ionty navíc migrují rozdílnými elektroforetickými rychlostmi uvnitř pufru a dochází k jejich separaci. Během jednoho experimentu lze dělit a detekovat kladné i záporné ionty.

2.3.2.1 Elektromigrační vlastnosti peptidů a proteinů

Elektroforetická pohyblivost (mobilita) je komplexní funkcí: (i) vlastností peptidů/proteinů (náboje, velikosti, tvaru); (ii) vlastností prostředí (BGE), ve kterém se peptidy pohybují (složení, pH, iontová síla, viskozita, permitivita a teplota); (iii) interakcí peptidů se složkami prostředí (solvatace, disociace, tvorba komplexů). Protože výslednou pohyblivost ovlivňuje mnoho parametrů, musíme ji vždy uvádět spolu s danými experimentálními podmínkami, za kterých byla zjištěna (tj. musí se vztahovat k danému složení, pH a teplotě základního elektrolytu). Takto charakterizovaná mobilita se nazývá efektivní mobilita. Porovnatelné jsou pouze efektivní mobility získané za stejných podmínek.

Již od počátku zavedení elektroforetické separace pro dělení peptidů a proteinů hledali vědci rovnici, která by popsala vztah mezi efektivní mobilitou peptidů/proteinů (m_{ep}), jejich efektivním nábojem (q), molekulární hmotností (M_r) a tvarem (konformací). Jako prvním se to podařilo v roce 1966 Offordovi (35), který na základě separace peptidů papírovou zónovou chromatografií odvodil následující empirický vztah pro výpočet efektivní mobility, kde k je koeficient:

$$m_{ep} = k \cdot q / M_r^{2/3} \quad (1)$$

Z této závislosti ovšem získáme pouze přibližný odhad náboje peptidů. Přesnější hodnoty dosáhneme, pokud závislost hodnot pK_a protonové disociace z ionogenních skupin peptidů vztáhneme na strukturu peptidů a náboj jejich sítě.

Mnoho prací se zabývá studiem semiempirických modelů. Například vztahují mobilitu peptidů k jejich poměru náboj/velikost (M_r). Testováním 64 oligopeptidů (2-14 aminokyselin) dělených CZE v kyselině mravenčí (50 mM, pH 2,75) nebylo ovšem ani v jednom případě dosaženo shody s experimentálními daty (36). Nejvyšší korelační koeficient (0,89) byl získán Offordovým modelem.

2.3.2.2 Pufry v CZE

Důležitý je výběr vhodného dělicího pufru, který musí zprostředkovávat vodivé prostředí a musí mít nízkou UV absorbanci. Z těchto důvodů nejsou obvykle vhodné pufry používané v plošné gelové elektroforéze. Při volbě správného BGE bychom měli vzít v úvahu: (i) vliv kationtů a aniontů na migraci rozpuštěných látek; (ii) rozptýlení Joulova tepla; (iii) pufrací schopnost; (iv) rozpustnost a stabilitu; (v) interakce se stěnou kapiláry (vliv na elektroosmózu) (37). Nejčastěji používané pufry jsou fosfátový, borátový, citrátový a octanový. Kvůli potlačení adsorpce separovaných látek a elektroosmotického toku se používají vysoké koncentrace těchto pufrů (přibližně 20-100 mM). Nevýhodou je však jejich vysoká vodivost, která způsobuje vznik vysokého proudu, ohřívání a tvorbu bublin během separace. Tento problém řeší biologické pufry o nízké vodivosti obsahující aminoskupiny, které obsazují místa na stěně kapiláry a omezují tak adsorpci peptidů a proteinů.

2.3.2.3 Potlačení absorpce peptidů a proteinů

Závažný rušivý faktor v dělení peptidů a proteinů pomocí CE představuje jejich lepení na vnitřní stěnu křemenné kapiláry. Kladně nabitě aminoskupiny peptidů a proteinů mají tendenci adsorbovat se na negativně nabitě silanolové skupiny vnitřní stěny křemenné kapiláry. K potlačení vázání peptidů/proteinů na stěnu křemenné kapiláry a stěnu mikročipů bylo vyvinuto několik různých strategií (viz přehled (38)). Nejčastěji používanými jsou: (i) použití velmi nízkého nebo vysokého pH pufru; (ii) dynamické obalení kapiláry a (iii) statické obalení kapiláry.

2.3.2.3.1 Použití velmi nízkého nebo vysokého pH pufru

Nejjednodušším způsobem je použít extrémně kyselý nebo alkalický BGE pufr (39, 40). Při nízkém pH je potlačena disociace silanolových skupin, dochází k protonaci vnitřní stěny kapiláry a k zabránění elektrostatických interakcí s pozitivně nabitými peptidy/proteiny. Při použití vysoce alkalického BGE, jehož pH je alespoň o 2 jednotky vyšší než isoelektrický bod daného peptidu/proteinu, jsou peptid/protein i vnitřní stěna kapiláry nabitě záporně a dochází k jejich vzájemnému odpuzování. Mimo jiné se při vysokém pH vytváří relativně vysoký EOF. Teoreticky je rozlišení dané separace zlepšeno, když je EOF potlačen a vyvážen vůči elektroforetické migraci (například pomocí různých aditiv pufru).

I když jsou oba výše uvedené postupy v praxi snadno proveditelné, musíme si uvědomit, že použití extrémních hodnot pH s sebou nese jisté problémy. Tyto postupy proto nejsou vhodné hned z několika důvodů: (i) dochází k rozkladu, agregaci a deaminaci proteinů, což znemožňuje studium mnoha nativních molekulárně konformačních interakcí; (ii) mění se biologická aktivita proteinů; (iii) při pH vyšším než 11 se může porušit stěna kapiláry.

2.3.2.3.2 Dynamické obalení kapiláry

Dynamické obalení kapiláry je založeno na vratné (dynamické) absorpci hydrofilních polymerů (deriváty celulózy, syntetické polysacharidy) přidávaných do

BGE. Molekuly těchto povrchově aktivních látek se váží na povrch kapiláry, chrání silanolové skupiny a zabraňují tak adsorpci peptidů a proteinů. Stěnu kapiláry je možné po každé analýze zregenerovat propláchnutím pufrům s nízkomolekulárními modifikátory nebo polymery.

Dynamického obalení kapiláry se používá také pro kontrolu EOF, který ovlivňuje rozlišení, účinnost a rychlost dělení analytů v CE (41). Ukázalo se, že EOF se zpomaluje v pufru obsahujícím aditiva (například Mg^{2+} a hexamethonium, které vyměňují ionty s povrchovými silanolovými skupinami, což vede ke snížení efektivního náboje stěny kapiláry). K vytvoření kationtové vrstvy na stěně kapiláry pro obrácení EOF se používají kationaktivní polyelektrolyt (Polybrene) nebo kationaktivní surfaktanty (cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), didodecyldimethylamonium bromid).

Ke snížení adsorpce jednořetězcových částí protilátek během separace CZE byla použita kationaktivní polymerová pufrovací aditiva (0,5% PDMAC - poly(diallyldimethylammonium chlorid), pH 7) (42). Polymerní aditiva vytvářejí na povrchu křemenné kapiláry kladně nabitou vrstvu, která obrací elektroosmózu a vede k elektrostatickému odpuzování kladně nabitých bazických polypeptidů.

Pro efektivní CZE dělení kalcitoninů z jejich tryptických štěpů v kyselém BGE (25 mM kyselina fosforečná, upravená NaOH na pH 3,1) byly použity křemenné kapiláry dynamicky povlečené polykationaktivními polymery polyethyleniminem (PEI, $M_r = 10\ 000$, 0,8% ve vodě) a hexadimethrin bromidem (Polybren, $M_r = 25\ 000$, 0,25% ve vodě) (43). Kromě potlačení peptidové sorpce došlo k obrácení EOF a k vytvoření silného anionaktivního EOF, který zajišťuje poměrně rychlou migraci všech peptidů (negativně nabitě, neutrální a pozitivně nabitě) k anodě. Ve srovnání s kapilárami obalenými Polybrenem byl EOF u kapilár obalených PEI významně pomalejší a stabilnější, ale bylo dosaženo vyšší adsorpce peptidových analytů.

Potlačení adsorpce peptidů/proteinů bylo pozorováno také při CZE separaci v 20mM fosfátovém BGE o pH 2,5 a upraveném 10% Pluronicem F127 (44). Tento polymer je specifické médium, které vykazuje jak vlastnosti povrchově aktivní látky, tak i gelu (viskozita je snadno ovlivnitelná teplotou).

Kapiláru lze účinně obalit také sloučeninami o nízké molekulové hmotnosti. Adsorpce kationaktivních triethylentetraminů způsobuje překrytí silanolových skupin na stěně křemenné kapiláry (45). Adsorpce kladně nabitých peptidů a proteinů může

být snížena použitím kyselých BGE obsahujících tetraalkylammoniové kationty (46). Tetramethyl- a tetrabutylammoniové kationty dynamicky modifikují povrch kapiláry, což vede k odpuzování kladně nabitých peptidů/proteinů od kladně nabitě kapilární stěny a k obrácení EOF.

Závažný je také problém adsorpce peptidů a bílkovin u plastových mikročipů (47). Vzhledem k jejich hydrofobicitě silně reaguje vnitřní povrch s nepolárními analyty nebo látkami obsahujícími hydrofobní domény (včetně polypeptidů a bílkovin), což vede k jejich navázání na stěny kapiláry. Řešením je použití kationaktivních kvartérních amonných derivátů škrobu pro dynamické obalení, které potlačí adsorpci fluorescenčně značených oligopeptidů a aminokyselin během CE separace v poly(methyl-methakrylátu) (PMMA). Účinek byl pozorován v rozmezí pH 2,5-8. Dalšími přednostmi tohoto dynamického polymerního obalovacího činidla byly dobrá rozpustnost a nízká viskozita.

2.3.2.3.3 *Statické obalení kapiláry*

Statické (permanentní) modifikace vnitřní stěny kapiláry zahrnují tvorbu kovalentní vazby mezi vhodným derivatizačním obalovacím činidlem a silanolovými skupinami křemenné kapiláry. Dochází k imobilizovanému polymernímu obalení. Tato vazba může být i nekovalentní, ale přesto permanentní, založená na nereverzibilní absorpci polymerů (například polyvinylalkoholu (PVA) nebo polyethylenglykolu (PEG)) z vodných roztoků na kapilární stěnu. Statické obalení kapiláry je stabilní v širokém rozmezí pH 3-10. Vzhledem ke zdlouhavému obalovacímu procesu však ztrácí v poslední době na oblíbenosti.

Kovalentní obalení křemenné kapiláry neutrálním polymerem poly(dimethylakrylamidem) (PDMA) vede ke dvojnásobnému zlepšení opakovatelnosti migračních časů CZE při separaci směsi kyselých a bazických peptidů (složených z fosforylovaných a nefosforylovaných peptidových substrátů pro kinázy a fosfatázu) (48). Účinnější separace byly dosaženy použitím kovalentně spojených, nabitých polymerních modifikátorů, které snižují interakci peptidů/proteinů se stěnou kapiláry. Obalení anionaktivními poly(akrylátovými) a kationaktivními poly ([3 - (methakryloylamino) propyl]-trimethylamoniovými)

modifikátory zlepšilo účinnost CZE separace peptidů oproti použití PDMA (4-7krát) a také opakovatelnosti jejich migračních časů byly lepší.

Byly zkoumány sloučeniny, které by mohly sloužit jako zhášedla silanolových interakcí s peptidy a proteiny v jejich dělení CZE (49). Testovány byly například dva deriváty 1,4-diazobicyklo[2,2,2]oktanu (DABCO). První z nich, monokvarternizovaný piperazin, byl vázán kovalentně na kapilární stěnu a obrátil její náboj. Tento modifikátor lze použít v širokém rozmezí pH a umožňuje dobrou separaci peptidů a bílkovin, aniž by s nimi interagoval. Druhá sloučenina, dikvarternizovaný DABCO derivát se dvěma dlouhými alkylovými řetězci na koncích, se na stěnu neváže kovalentně, proto se musí přidávat do BGE. Lze ho použít pouze pro malé oligopeptidy.

Pro zabránění adsorpce separovaných peptidů/proteinů na stěny mikročipů se podobně jako u dynamického přístupu používá PMMA (47). PMMA se váže kovalentně na stěnu mikročipů pomocí polyethylenglykolu (PEG) a snižuje EOF a nespecifickou adsorpci peptidů a bílkovin. Separační účinnost a opakovatelnost migračních časů byla o jeden řád lepší ve srovnání s PMMA nemodifikovanými čipy.

2.3.2.4 Způsoby detekce

2.3.2.4.1 Detekce absorpce UV a interferometrie

Detektory založené na absorpci UV záření představují nejběžnější a nejčastěji používaný detekční mód v CE separaci peptidů a proteinů. Vzhledem k poměrně silné absorpci peptidové vazby v krátkých vlnových délkách UV záření (200-220 nm) se k UV absorpční detekci využívá právě tohoto rozsahu vlnových délek. Tímto univerzálním detekčním způsobem lze sledovat separace peptidů a proteinů v CE s koncentračním limitem v mikromolárním rozsahu. Absorpce UV záření v oblasti 200-220 nm charakterizuje kvantitu peptidové vazby (tj. delší peptidy poskytují při stejné molární koncentraci vyšší odezvu signálu absorbance) (50).

Citlivost a lineární rozsah detekce v CE je omezen extrémně malým rozměrem kyvety, kterou tvoří část odkryté kapiláry. Pro vyřešení tohoto problému byly navrženy speciální tvary detekční části kapiláry (například Z-cela, bublinová cela, U-

cela). Tyto i další nově navržené UV-absorpční detektory pro CE a separace na čipu byly popsány v několika přehledech (51, 52).

Zvýšená citlivost detekce peptidů ve velmi krátké UV oblasti byla využita pro analýzu neuropeptidů v plazmě lidí a krys (53), CZE stanovení angiotenzinů v plazmě (54) a bacitracinu v krmivu (55).

Nový typem je optický detektor, který je založen na celo-kolonovém zobrazovacím detekčním systému. Tento detektor pracuje střídavě v režimech absorpce, indexu lomu a fluorescence (56). Z 5 centimetrů křemenné kapiláry je odstraněn polyimidový obal. Tato část kapiláry je poté osvětlena pomocí světla vedeného ze světelného zdroje (deuteriová lampa, xenonová výbojka, He-Ne laser, diodový laser) svazkem optických vláken a paprsky jsou fokusovány cylindrickými čočkami do kapiláry. Intenzita světla po průchodu přes kapiláru je měřena CCD kamerou, která je umístěna ve směru zdroje světla (pro režim absorpce nebo gradient indexu lomu) nebo kolmo na něj (pro fluorescenční uspořádání). Absorpční mód je pro své univerzální vlastnosti a kvantitativní schopnosti využitelný nejen pro CIEF peptidů a bílkovin, pro které byl původně vyvinut, ale i pro CZE dělení peptidů, bílkovin a dalších analytů, u kterých nám umožňuje studovat dynamiku jejich elektroseparačního procesu.

UV absorpční detektor využívající pomocný kovový oxidový polovodič (Complementary Metal Oxide Semiconductor - CMOS) jako aktivní bodový senzor, byl postaven pro znázornění elektroforeticky zprostředkovaných reakcí v kapiláře v reálném čase (57). Zobrazení píků analytu absorbujících při 200 nm a migrujících kapilárou délky 14 mm umožnilo měření rychlosti a délky reakčních zón a zón produktů. Tento mód byl použit pro sledování oxidace glutathionu pomocí peroxidu vodíku. Reakce, separace a kvantifikace se provádí v nanoliterových objemech a trvá přibližně 5 minut.

2.3.2.4.2 *Laserem indukovaná fluorescence*

Nejcitlivějším detekčním uspořádáním v CZE i ostatních mikroanalytických systémech je laserem indukovaná fluorescence (LIF) (58). Díky speciální konstrukci detekčních cel má LIF detekce potenciál dosáhnout limity detekce jediné molekuly (59).

Nevýhodou v LIF detekci peptidů je nutnost jejich derivatizace fluorogenními značkami. Přirozené fluorescence může být totiž využito pouze pro detekci peptidů obsahujících aromatické aminokyselinové zbytky (tryptofanu, tyrosinu a fenylyalaninu). Pro jejich excitaci jsou zapotřebí krátkovlnné laserové systémy pracující v UV oblasti (například Nd:YAG laser pracující při 266 nm) (60). Tento laser se používá pro detekci tryptických štěpů hovězího sérového albuminu (BSA).

Zajímavou alternativou k předchozímu uspořádání je použití dvou- nebo třífotonové excitace. Dva nebo tři viditelné či infračervené fotony pomáhají překlenout propast mezi energií elektronového stavu S₀ a S₁ v analytu. Pro tento účel se využívají femtosekundové titan-safírové (Ti:S) lasery, které jsou velmi vhodné pro detekci široké škály biologicky významných fluoroforů. Tato detekce založená na multifotonové excitaci vnitřní fluorescence na výstupu z kolony byla použita ke stanovení neuropeptidů a tryptických štěpů bílkovin v atomolárních hladinách (61). Jiným příkladem tohoto přístupu je kompaktní LIF detektor založený na dvoufotonové excitaci přirozené fluorescence peptidů a bílkovin, které obsahují výše uvedené zbytky aromatických aminokyselin (62). Fluorescence je excitována diodou v pevném stavu čerpaného mikročipového laseru (pracujícího při 532 nm, s průměrným výkonem 29,3 mW, šířkou pulsu 500 ps, počtem opakování 6,56 kHz a průměrem paprsku 0,2 mm). Detekční limity koncentrace pro fenylyalanin, tyrosin a tryptofan byly 62 μM, 2,0 μM a 470 nM (v objemu 3 fL), pro BSA byl limit 130 nM.

Nejčastěji je fluorescenční detekce peptidů v CE založena na předkolonovém a postkolonovém značení fluorescenčními sondami. Nevýhodou tohoto přístupu je, že vinou přítomnosti několika různých derivatizačních míst v molekule peptidu/proteinu můžeme získat více derivátů s různými elektroforetickými mobilitami a následně i více píků.

Peptidy mohou být detekovány také bez chemické derivatizace pomocí zhasené fosforescence. Do BGE se přidává fosfor (1-bromo-4-naftalensulfonová kyselina (BrNSA)), který se dobře rozpouští ve vodě a poskytuje silnou fosforescenci (excitace/emise = 290/535 nm) při pokojové teplotě a v širokém rozmezí pH (63). Detekce je založena na dynamickém zhasení fosforescence BrNSA elektronem, přeneseným z aminoskupiny peptidů při pH 9,5-10. Pro malé di- a tripeptidy bylo dosaženo detekčních limitů v rozmezí 5-20 mg /l.

2.3.2.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) představuje vysoce účinnou detekční metodu pro CE, protože je univerzální, citlivá a selektivní. Význam MS jako analytické a strukturu-objasňující metody vzrostl v posledních letech, protože hraje důležitou roli v proteomické analýze peptidů a proteinů v komplexních biologických směsích. O tom, že roste důležitost on- a off-line spojení MS s CE dělením peptidů a proteinů, zejména v proteomice, peptidomice a peptidovém mapování, se můžeme přesvědčit v několika přehledech (64, 65).

Obrovský pokrok v on-line a off-line elektroforetické charakterizaci separovaných peptidů a proteinů v MS přineslo hlavně zavedení ionizačních technik ionizace elektrosprejem (ESI) a laserové desorpce za účasti matrice (MALDI). Spojení CE s těmito měkkými ionizačními technikami umožnilo nejenom vysokou přesnost stanovení molekulové hmotnosti separovaných peptidů/proteinů, ale také poskytlo důležitá strukturální data o sekvenci aminokyselin, o místech posttranslačních modifikací, peptidovém mapování a nekovalentních interakcích peptidů/proteinů. ESI je nejčastěji používaný mód pro spojení s CZE zejména z těchto důvodů: (i) umožňuje detekovat vícenásobně nabitě ionty o vysoké molekulové hmotnosti; (ii) molekuly mohou být převedeny přímo ze separační kapiláry do hmotnostního spektrometru pomocí rozhraní (66). Proto je ESI vhodná pro analýzu velkých biomolekul, které se obtížně odpařují a ionizují. Spojení CE-ESI lze provést těmito způsoby: (i) obalovou kapalinou („sheath-flow“); (ii) bez obalové kapaliny („sheathless“).

Častěji se využívá rozhraní vytvořeného obalovou kapalinou, které bylo poprvé popsáno v roce 1988 (67) a představuje nejběžnější přístup ve spojení CE-ESI. Výhodou je jednoduché a reprodukovatelné uspořádání. Konec kapiláry je omýváno proudem kapaliny (sheath liquid), což umožňuje stabilní a vyšší průtok kapaliny do spektrometru. Nevýhodou je, že tímto způsobem dochází ke zředění analyzovaného vzorku a ke zvýšení signálu pozadí.

Jako příklad zvýšení citlivosti v analýze proteinů lze uvést použití zařízení pro SPME/CE systém spojený s ESI-IT-MS pro tryptické štěpy BSA, kdy byl získán limit detekce 400 amol (68).

2.3.2.4.4 *Ostatní detekční techniky*

Mezi další detekční systémy používané v CZE analýze peptidů a proteinů patří elektrochemický (69), kontaktní a bezkontaktní vodivostní (70), potenciometrický (71), a chemiluminiscenční detektor (72).

Vylepšena byla metoda přípravy obaleného elektrochemického (ampérometrického) detektoru umístěného na konci kolony pro kapiláry s nanometrovým vnitřním průměrem a s pikolitrovým objemem detekční cely (73). Tato metoda zahrnuje leptání uhlíkového vlákna elektrody a detekčního konce kapiláry, což minimalizuje mrtvý objem detektoru.

Ke stanovení angiotensinu a komplexu měď-angiotensin byla použita elektrochemická (amperometrická) detekce s tříelektrodovým systémem skládajícím se z pracovní elektrody (CPO-uhlíková pasta), referenční elektrody (Ag/AgCl) a pomocné elektrody (platinového drátku). Tato detekce byla citlivější (detekční limit 0,2-2 μM) než UV-absorpční detekce při 200 nm (detekční limit 2-18 μM) (74).

Kontaktní vodivostní detektor s elektrodami umístěnými na výstupu z kapiláry byl použit pro CE stanovení glutathionu (GSH) a jeho oxidované formy (GSSG) (75). Díky poměrně vysoké vodivosti malého nabitého tripeptidu GSH a jeho dimeru GSSG a nízké vodivosti BGE pufru (100 mM CHES, 40 mM LiOH, 5 mM spermine, pH 9,1) bylo dosaženo nízkých mezí detekce (11 μM pro GSH a 8 μM pro GSSG).

Optimalizovaný tříelektrodový bezkontaktní vodivostní detektor (s frekvencí nad 20 kHz) umožnil detekci standardních oligopeptidů v μM hladinách po jejich předchozí CZE separaci (100 mM fosfátový BGE, pH 2,5) (76).

Velký přínos pro objasnění struktury a studium konformací separovaných peptidů a proteinů se očekává od on-line spojení CE s detekcí pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) (77). Off-line spojení CE a NMR bylo využito ke zjištění strukturní enantioselektivity syntetických cyklopeptidů (chirálních selektorů) (78), izomerního složení prolinu (peptidu vázaného v inhibitoru angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACE) (79) a pro studium asociace mezi peptidy a SDS nebo CTAB micelami (80).

2.3.2.5 Zlepšení citlivosti detekce peptidů a proteinů

2.3.2.5.1 Zakoncentrování a předseparace

Zakoncentrování a předseparace jsou důležitými kroky v přípravě vzorků peptidů a bílkovin k následné analýze pomocí metod CE. Biologické vzorky jsou velmi složité (například tělní tekutiny, buněčné lyzáty a extrakty z tkání) a často bývá problém stanovit všechny složky, zvláště pokud se vyskytují v nízké koncentraci a ve vzorku je přítomen výrazně dominující protein (například stanovení minoritních proteinů krevního séra za přítomnosti dominantního albuminu). Pomocí zakoncentrování a předseparace zvýšíme citlivost a účinnost CE analýzy. Používané techniky můžeme rozdělit na chromatografické a elektroforetické.

Dříve se používaly převážně off-line metody, kdy se vzorky před nadávkováním do kapiláry upravily pomocí extrakce na pevné fázi (SPE), mikroextrakce na pevné fázi (SPME) a extrakce kapalina-kapalina (LLE). V současné době jsou nahrazovány on-line metodami. K zakoncentrování a předseparaci analytu se velmi často používá pevná fáze sorbentu (SPE, SPME). Jinou možností je použití kolony obsahující membránu, která je napuštěna různými chromatografickými stacionárními fázemi (81). Kolonu tvoří kus křemenné kapiláry, který odpovídá vnějšímu průměru použité separační kapiláry pro CE.

Několik příkladů použití selektivních adsorbentů v CE-MS pro zakoncentrování peptidů a jiných analytů jsou uvedeny v přehledu (82). Pro kvantitativní analýzu terapeuticky aktivních peptidů v plazmě byl použit polymerický adsorbent umístěný mezi zakoncentrující a separační kapiláru (83). Obrácená fáze C18 byla spojena on-line s enkefaliny oddělovanými ze složek o vysoké molekulové hmotnosti z mozkomíšního moku před jejich CZE analýzou (84).

Zajímavou technikou zakoncentrování je tzv. „dynamic pH junction“. Při této metodě se analyzované vzorky rozpouští v roztoku o vyšším pH než má základní pufr. Potom se tyto roztoky dávkuje do kapiláry tak, aby vytvořily delší zónu (dávkování s delší dobou nástřiku). Rozdíl hodnot pH matrice vzorku a základního pufru způsobuje změny elektroforetických pohyblivostí a má za následek zúžení

jejich pásů na rozhraní pufrů. K získání dobrého zaostření zón peptidu P musí platit následující vztah:

$$v_{P,B} > v_B > v_{P,S} \quad (2)$$

kde ($v_{P,B}$) je rychlost peptidu P v zóně základního pufru, (v_B) rychlost rozhraní a ($v_{P,S}$) rychlost peptidu P v zóně vzorku. Touto technikou lze zvýšit citlivost 550-1000krát (85).

Metoda byla použita například pro analýzu tryptických štěpů bílkovin (bradykininu, angiotensinu I a angiotensinu II) pomocí CE-MS (86). Vzorky byly rozpuštěny v roztoku mravenčanu amonného na výsledné pH 8 a nadávkovány do kapiláry naplněné 1 M kyselinou mravenčí o pH 2. Bylo dosaženo značného zvýšení citlivosti (přibližně 1000krát).

2.3.2.5.2 *Derivatizace*

Derivatizační techniky se používají ke zvýšení citlivosti a selektivity detekce (inkorporace UV-absorbujících nebo fluorescenčních skupin). Derivatizační postupy v CE lze rozdělit na derivatizaci před-kapilární (před nástřikem do kapiláry), derivatizaci v kapiláře a derivatizaci post-kapilární.

Bylo vydáno několik souhrnů, které se zabývají derivatizací proteinů o nízké koncentraci (87) nebo derivatizací peptidů pro LC (kapalinovou chromatografii) a CE analýzu (88).

Nejčastěji používaným módem je před-kapilární derivatizace. Její přednosti jsou především široký výběr derivatizačních činidel a možnost provádět i derivatizace, které probíhají pouze za extrémních podmínek (vysoká teplota, delší reakční čas).

Příkladem před-kapilární derivatizace je nekovalentní značení lidského sérového albuminu indokyaninovou zelení a jeho následná analýza pomocí CE s detekcí diodovou laserem indukovanou fluorescencí (89).

Existuje velké množství dalších prací zabývajících se před-kapilární derivatizací peptidů a proteinů. Jako derivatizační činidla se v nich používají například fluoresceinisothiokyanát, fluorescamin, 3-(2-fluoroyl)quinolin-2-karboxaldehyd a dansylchlorid.

Kyselina 1-anilinonaftalen-8-sulfonová (1,8-ANS), kyselina 4,4'-dianilino-1,1'-binaftyl-5,5'-disulfonová (bis-ANS) a kyselina 2-(p-toluidino)naftalen-6-sulfonová (2,6-TNS) byly použity jako derivatizační činidla pro derivatizaci v kapiláře při stanovení proteinů hovězí syrovátky pomocí CE s LIF detekcí (90). Tyto N-arylaminaftalen sulfonáty poskytují po spojení s proteiny značnou emisi fluorescenčního záření, zatímco v samotných vodných pufrách používaných v CE je tato emise velmi nízká. Největší zvýšení fluorescence proteinů bylo zaznamenáno při použití pufru kyseliny 2-(N-cyklohexylamino)ethansulfonové (CHES) o pH 10,2 a derivatizaci 2,6-TNS. Limity detekce některých proteinů hovězí syrovátky získané LIF detektorem byly srovnány s limitami detekce dosaženými za stejných podmínek UV detekcí. Limity detekce u BSA, β -laktoglobulinu A a β -laktoglobulinu B stanovené LIF detektorem byly 2krát vyšší než u UV detekce. Naopak limita detekce α -laktalbuminu byla lepší při použití UV detektoru.

Dobré separační efektivity v post-kapilární (post-kolonové) derivatizaci proteinů a aminokyselin bylo dosaženo za použití „sheath-flow“ reakční cely (91). „Sheath-flow“ cely je využívána jako post-kolonový reaktor pro derivatizaci o-ftaldehydem. Bylo dosaženo až pětinasobného zvýšení limity detekce karbonanhydrázy. Předností tohoto uspořádání je vysoká rychlost reakce (1-2 sekundy). Navíc nedochází k nechtěnému rozšiřování reakčních zón.

Další možností derivatizace je tzv. on-line derivatizace. Jako příklad uvedme automatizaci v derivatizaci aminokyselin a peptidů on-line spojením sekvenční injekční analýzy (SIA) a CE (92). Jako derivatizační činidlo byl použit dichlorotriazinylaminofluorescein, jako detektor argonový LIF detektor. U testovaného des-Tyr-[Met]-enkefalinamidu bylo dosaženo limitu detekce 30 ng/ml.

1.3.2.5.3 Mikromanipulace

Schopnost CE analyzovat velmi malé objemy vzorků (v řádu nano- až pikolitřů) klade zvláštní požadavky na používané techniky a mikropřístroje. Mikromanipulace se vzorky jsou sjednoceny v tzv. mikrototálních analytických systémech (μ TAS) (93), kde jsou všechny operace (tj. manipulace se vzorkem, potenciální zakoncentrování, očištění, derivatizace, separace a detekce) prováděny v mikrostrukturách vytvořených na čipu. Existuje několik souhrnů pojednávajících o

různých možnostech zpracování vzorku v μ TAS (94), jako je zavedení vzorku na čip, předseparace, derivatizace, mikrodávkování, mikrovstříkování (elektrokinetické, tlakové, piezoelektrické, optická vtoková soustava, mikrorotační ventily), míchání statickými mísiči, odstředivé síly, kapilární síly, pneumatický pohon a elektromanipulace.

Mikromanipulační techniky našly uplatnění v analýze jedné buňky (95) a v analýzách mikrobioptických a mikrodialyzačních vzorků (96).

Bylo vyvinuto několik ucelených systémů pro on-line spojení štěpení proteinů enzymy a následné CE separace. Příkladem je štěpení myoglobinu na křemíkovém mikročipu potaženém imobilizovaným proteolytickým enzymem (trypsin nebo chymotrypsin) a následná CE s MALDI-TOF detekcí (97).

2.3.2.6 Pokroky ve vývoji CZE

Velkým pokrokem ve vývoji CZE bylo vytvoření ultra rychlé elektroforézy, která byla založena na nové geometrii kapiláry ve tvaru přesýpacích hodin, která lokálně zvyšuje intenzitu elektrického pole až na 100 kV/cm, což umožňuje separaci v řádu mikrosekund (98). Toto uspořádání nám umožňuje sledovat reakční mechanismus molekul s krátkou dobou života a milisekundové změny v chemickém složení v malých objemech vzorků (například uvolňování neurotransmiterů a peptidů z neuronů).

Rychlé CZE separace (obvykle do 20-60 s) je možné dosáhnout také pomocí čipu s krátkou migrační cestou a vysokým elektrickým polem. Například mikroZE separace tryptických štěpů BSA značených fluoresceinem izothiokyanátem (FITC) bylo dosaženo za 35 s (47). Rychlou separaci lze provést i v klasické křemenné kapiláře. Separace GSH a GSSG v čase kratším než 1 minuta byla provedena v neobalené křemenné kapiláře o délce 27 cm a vnitřním průměru 75 μ m v 300 mmol/l borátovém BGE o pH 7,8, s dělicím napětím 28 kV a proudem 90 mA (99).

V čistých organických rozpouštědlech (acetonitril, metanol, 2-propanol) se provádí tzv. bezvodá kapilární elektroforéza (NACE), která našla uplatnění především v analýze peptidů a jejich derivátů (100). Stejně uplatnění má i CZE

v hydroorganických rozpouštědlech (směsi organických rozpouštědel s vodnými pufrů).

Iontová interakční CZE (II-CZE) byla zavedena pro separaci diastereomerních peptidových párů, v nichž se aminokyselina nachází v centru nepolárního povrchu amfipatického α -šroubovicového peptidu (18 aminokyselinových zbytků) a je nahrazena jednou z 19 L- nebo D-aminokyselin (101). Takové L- a D-peptidové páry mají stejný poměr hmotnost/náboj, sekvenci aminokyselin a vnitřní hydrofóbcita se liší pouze v stereochemii jednoho zbytku. Prostřednictvím použití perfluorovaných kyselin (trifluoroctové, pentafluoropropionové, heptafluoromáselné) o vysokých koncentracích (až 400 mM) jako složek BGE (upravených LiOH na pH 2,0), bylo možné dosáhnout základního rozdělení všech 19 diastereomerních peptidových párů v neobalené křemenné kapiláře. Výborného rozlišení bylo dosaženo díky jemnému narušení peptidové struktury/konformace (způsobeného přítomností D-aminokyseliny) na nepolárním povrchu v amfipatickém α -helixu a jeho interakcemi s hydrofóbními aniontovými iontově-párujícími činidly. Vzhledem k vynikajícím rozlišovacím schopnostem diastereomerních dvojic peptidů lze touto metodou rovněž oddělit směsi těchto úzce příbuzných α -šroubovicových peptidů.

Princip II-CZE byl úspěšně použit také pro dělení peptidů lišících se substitucí jedné aminokyseliny v deka- a dodekapeptidech s modelovou sekvencí amikokyselin (102). Substitute se lišily rozsáhlou řadou vlastností (například postranním alkylovým řetězcem, postranním polárním řetězcem a postranním nabitým řetězcem. Hydrofóbní anionty pentafluoropropionové kyseliny poskytly nejlepší separaci peptidů, které se lišili hydrofóbcitou svých hydrofóbních postranních řetězců. Naopak vysoká koncentrace hydrofilních fosfátových aniontů byla nejlepší pro dělení peptidů lišících se polaritou postranních řetězců. Důležitou roli tedy hrají rozdílné hydratační/dehydratační vlastnosti postranních řetězců peptidů, hydratační/dehydratační vlastnosti hydrofilních/hydrofóbních aniontů a elektrostatické přitažlivé síly mezi peptidy a anionty v roztoku.

Stále rostoucí požadavky na výkonnost analytických metod vedly k vývoji systémů, ve kterých se provádí separace souběžně v 8, 48, 96 nebo 384 paralelních kapilárách. Toto uspořádání našlo uplatnění hlavně v peptidovém mapování.

Schopnost souběžně analyzovat více vzorků za stejných nebo odlišných separačních podmínek je shrnuta ve dvou přehledech (103, 104).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Glukóza, dihydrogenfosfát sodný, tris(hydroxymetyl)aminometan hydrochlorid (Tris-HCl) a toluen byly získány od firmy Lachema (Brno, Česká republika). Hovězí sérový albumin (BSA), ribóza, dithiotreitol, kyselina jódoctová, hydrogenuhličitan amonný, trypsin (z prasečí slinivky břišní), pepsin (pepsin A, z prasečí žaludeční

sliznice), proteináza K (z *Tritirachium album*) a kyselina mravenčí pocházely od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA). Glyoxal, glutardialdehyd a acetonitril byly zakoupeny od firmy Merck (Schuchardt, Německo). Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové byla získána od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Guanidin HCl pocházel od firmy Appli Chem, Biochemica (Darmstadt, Germany). Chlorid sodný byl zakoupen od firmy Penta (Chrudim, Česká republika), kyselina octová od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a azid sodný od firmy Trucizna (Polsko). Tablety Complete Mini obsahující inhibitory proteáz byly od firmy Roche Diagnostics (Manheim, Německo).

Všechny roztoky byly připraveny v ultra čisté vodě Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.2 Instrumentace

3.2.1 Kapilární elektroforéza

Analýza vzorků byla provedena na dvou typech přístrojů Beckman. Vzorky měřené ve fosfátovém pufru byly stanoveny pomocí Beckman P/ACE systém 5500 (Beckman, Fullerton, CA, USA) a za použití křemenné kapiláry o celkové délce 47 cm (40 cm k detektoru) s vnitřním průměrem 75 μm . Analýza vzorků v prostředí kyseliny mravenčí byla provedena na přístroji Beckman P/ACE systém 5000 (Beckman, Fullerton, CA, USA) a v křemenné kapiláře o celkové délce 57 cm (50 cm k detektoru) s vnitřním průměrem 50 μm . V obou případech byl použit spektrofotometrický detektor (UV detekce při 214 nm).

3.2.2 Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Přístroj HPLC 1100 LC/MSD (Agilent, Palo Alto, CA, USA) skládající se z degaséru, binární pumpy, autosampleru, termostatované kolony a detektoru diodového pole byl spojen s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí (Agilent, LC-MSD Trap XCT-Ultra). Analýza MS/MS dat byla prováděna pomocí softwaru

Spectrum Mill (v. 3.02 Agilent). Data pro BSA byla extrahována z databáze SwissProt.

3.2.3 Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií

Kapilární elektroforéza Beckman P/ACE 5000 (Beckman, Fullerton, CA, USA) s UV detekcí při 214 nm dělicí na křemenné kapiláře o celkové délce 100 cm a s vnitřním průměrem 50 μm byla spojena pomocí uzemněné jehly s přísádkem „obalové kapaliny“ (sheath liquid) s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí (Agilent, LC-MSD Trap XCT-Ultra). Analýza MS/MS dat byla provedena pomocí softwaru Spectrum Mill (v. 3.02 Agilent). Data pro BSA byla extrahována z databáze SwissProt.

3.3. Metody

3.3.1 Kapilární elektroforéza enzymatických štěpů BSA ve fosfátovém pufru

Měření bylo provedeno na přístroji Beckman P/ACE systém 5500. Byla použita křemenná kapilára o celkové délce 47 cm (40 cm k detektoru) s vnitřním průměrem 75 μm . Před první analýzou byla kapilára promyta nejprve vodou, poté 1 mol/l HCl, následně opět vodou, potom 1 mol/l NaOH a na závěr 0,1 mol/l fosfátovým pufrům o pH 2,5 (upraveno pomocí 3 mol/l HCl). Každý promývací krok trval 15 minut. Fosfátový pufr byl před použitím filtrován přes 45- μm Millex-HV filtr (Millipore). Vzorek byl nastříkovan elektrokineticky (10 sekund, 10 kV).

3.3.2 Kapilární elektroforéza enzymatických štěpů BSA v kyselině mravenčí

Měření bylo provedeno na přístroji Beckman P/ACE systém 5000. Byla použita křemenná kapilára o celkové délce 57 cm (50 cm k detektoru) s vnitřním průměrem 50 μm . Před první analýzou byla kapilára promyta nejprve vodou, poté 1 mol/l HCl, následně opět vodou, potom 1 mol/l NaOH a na závěr 1 mol/l kyselinou mravenčí (pH neupravováno, přibližná hodnota 1,75). Každý promývací krok trval 15 minut. Vzorek byl nastříkovan hydrodynamicky (198 sekund, 20 kV).

3.3.3 HPLC/MS analýza enzymatických štěpů BSA

Chromatografická separace probíhala na koloně Jupiter 4 μm Proteo 90 A (250 x 2 mm vnitřní průměr, Phenomenex, Torrence, CA, USA). Bylo nastříkováno 20 μl vzorku BSA (bez tablety i s tabletou Complete Mini obsahující inhibitory proteáz). Eluce byla provedena pomocí lineárního gradientu mezi mobilní fází A (voda s 0,1% kyselinou mravenčí) a B (acetonitril s 0,085% kyselinou mravenčí). Separace byla zahájena izokratickou elucí trvající 2 minuty s 2% mobilní fází B, následovala gradientová eluce do 35% B ve 40. minutě. Nakonec byla kolona 10 minut promývána 100% B. Před další analýzou byla kolona 10 minut ekvilibrována 2% B. Průtoková rychlost byla 0,25 ml/min. Teplota kolony byla udržována na 25 °C. UV detekce probíhala při 214 nm. Pro spojení s MS byl použit hmotnostní spektrometr s iontovou pastí (API-ESI ionizace) a následující podmínky: sušící plyn N_2 10 l/min, teplota sušícího plynu 350 °C, tlak rozprašovače 25 psi.

3.3.4 CE/MS analýza enzymatických štěpů BSA

Separace byly prováděny při napětí 25 kV, vzorky BSA (s tabletou Complete Mini obsahující inhibitory proteáz) byly nastříkovány hydrodynamicky (300 s). Jako základní elektrolyt byla použita kyselina mravenčí (0,25 mol/l). Přístroj Beckman P/ACE 5000 byl spojen pomocí uzemněné jehly a „obalové kapaliny“ (5 mmol/l octan amonný/izopropanol (1:1; v/v) ve vodě, průtoková rychlost 3 μ l/min) s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí (Agilent, LC-MSD Trap XCT-Ultra). Platily následující podmínky: sušící plyn N₂ 8 l/min, teplota sušícího plynu 150 °C, tlak rozprašovače 5 psi.

Před první analýzou byla kapilára promyta nejprve 1 mol/l NaOH, poté vodou, následně 1 mol/l HCl, potom opět vodou a na závěr pufrem. Každý promývací krok trval 20 minut. Mezi jednotlivými analýzami byla kapilára promývána pouze pufrem (5 minut).

3.4. Příprava vzorků

3.4.1 Příprava glykovaných a kontrolních vzorků BSA

Hovězí sérový albumin (BSA) byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru (0,2 mol/l NaH₂PO₄, pH 7,4) na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Tento roztok byl inkubován (při 37 °C, 7 dní) s jednotlivými zvolenými látkami obsahujícími oxo-skupinu (glukóza, ribóza, glyoxal a glutardialdehyd), jejichž koncentrace v roztoku BSA byla 0,1 mol/l. Kontrolní vzorek BSA byl připraven obdobným způsobem pouze bez přidání cukru. Kvůli zabránění kontaminace, která by mohla vzniknout během inkubace působením bakteriálních enzymů, byl ke každému vzorku přidán azid sodný a vrstvička toluenu.

Pro kontrolu, jestli nedochází ke štěpení proteinů proteázami z možné kontaminace během inkubace, byla v kontrolní sérii přidána tableta Complete Mini obsahující inhibitory proteáz (1 tableta na 10 ml fosfátového pufru).

Po uplynutí doby inkubace byla provedena dialýza vzorků (neobsahujících tabletu) v dialyzačních střívkách (od firmy Kalle, Wiesbaden-Biebrich, Německo). Dialýza probíhala po dobu 24 hodin.

Kontrolní série (s tabletou) byla po skončení inkubace odsolena na kolonkách Econo-Pac 10 DG (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Nejprve byl z kolonek vypuštěn uchovávací pufr (10 mmol/l NaCl; 10 mmol/l NaH₂PO₄ · 2H₂O a 0,02% NaN₃; pH 7) a poté byly promyty 20 ml vody. Kolonky byly naplněny 3 ml vzorku, který byl po svém naabsorbování vymyt 4 ml vody (tato frakce se jímala). Po opětovném propláchnutí kolonky vodou byly nadávkovány další 3 ml vzorku a takto se pokračovalo, dokud nebyl odsolen celý vzorek. Náplň kolonek byla zregenerována promytím uchovávacím pufrem. Pro zabránění vyschnutí byly nakonec kolonky tímto pufrem naplněny.

Nakonec byly všechny vzorky hluboce zmrazeny a poté zlyofilizovány (lyofilizátor Alpha 1-2 LD plus, Osterode am Harz, Německo).

3.4.2 Redukce a alkylace (karboxymethylace) lysinu

K 5 mg zlyofilizovaného vzorku BSA bylo přidáno 0,5 ml pufru o pH 8,4 (6 mol/l guanidine HCl; 1,2 mol/l Tris-HCl; 2,5 mmol/l Na₂EDTA). Redukce byla provedena přidáním 25 µl dithiotreitolu o koncentraci 1 mol/l. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 65 °C. Následovala karboxymethylace 60 µl jódoctové kyseliny o koncentraci 1mol/l (inkubace při laboratorní teplotě, 40 minut, ve tmě). Reakce byla zastavena přidáním 15 µl 1 mol/l dithiotreitolu.

3.4.3 Odsolení vzorků

Vzorky byly doplněny pufrem NH₄HCO₃ (20 mmol/l; pH 7,8) na celkový objem 3 ml a odsoleny na kolonkách Econo-Pac 10 DG.

Nejprve byl z kolonek vypuštěn uchovávací pufr (10 mmol/l NaCl; 10 mmol/l NaH₂PO₄ · 2H₂O a 0,02% NaN₃; pH 7) a poté byly promyty 20 ml pufru NH₄HCO₃. Kolonky byly naplněny 3 ml vzorku, který byl po svém naabsorbování vymyt 4 ml pufru (tato frakce se sbírala). Náplň kolonek byla zregenerována promytím 20 ml

uchovávacího pufru. Pro zabránění vyschnutí náplně během skladování byly kolonky tímto pufrem naplněny.

Jímaná frakce (obsahující odsolený vzorek) byla hluboce zmražena a poté zlyofilizována (lyofilizátor Alpha 1-2 LD plus).

3.4.4 Štěpení vzorků BSA trypsinem

Byl připraven roztok lyofilizovaného BSA ve 20 mmol/l NH_4HCO_3 o pH 7,8. Výsledná koncentrace BSA v pufru byla 5 mg/ml. K roztoku BSA byl přidán trypsin (poměr substrát:enzym = 50:1). Inkubace probíhala při 37 °C 2 hodiny.

3.4.5 Štěpení vzorků BSA pepsinem

Lyofilizované vzorky BSA byly rozpuštěny v kyselině octové (0,5 mol/l; pH 2,5) na koncentraci 2 mg/ml a štěpeny pepsinem (poměr substrát:enzym = 50:1). Inkubace probíhala při 37 °C 2 hodiny.

3.4.6 Štěpení BSA proteinázou K

Byl připraven roztok lyofilizovaného BSA v 10 mmol/l Tris-HCl pufru o pH 7,5. Výsledná koncentrace BSA v pufru byla 5 mg/ml. BSA byl štěpen proteinázou K (poměr substrát:enzym = 50:1). Inkubace probíhala při 37 °C 2 hodiny.

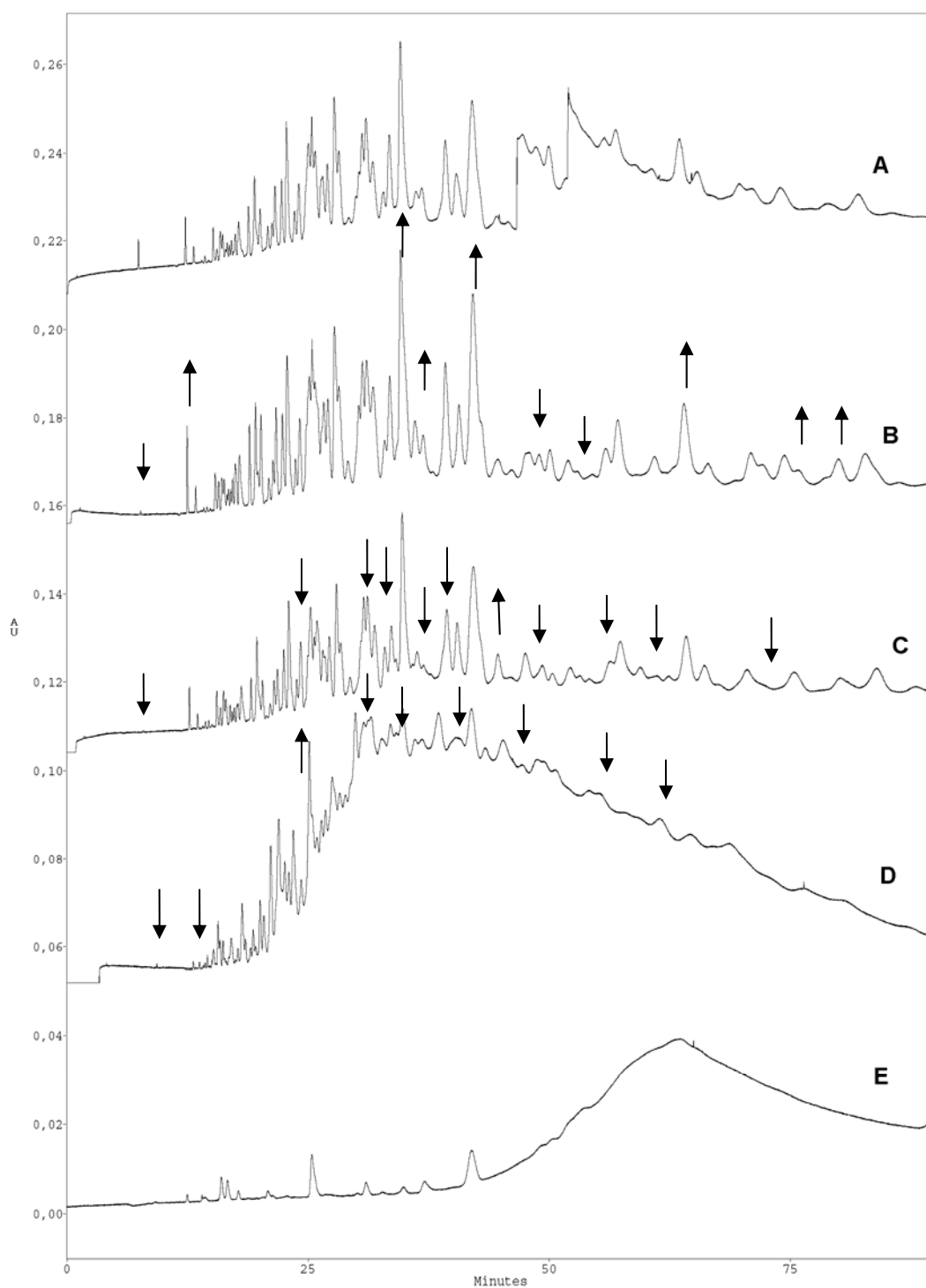
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kapilární elektroforéza enzymatických štěpů BSA

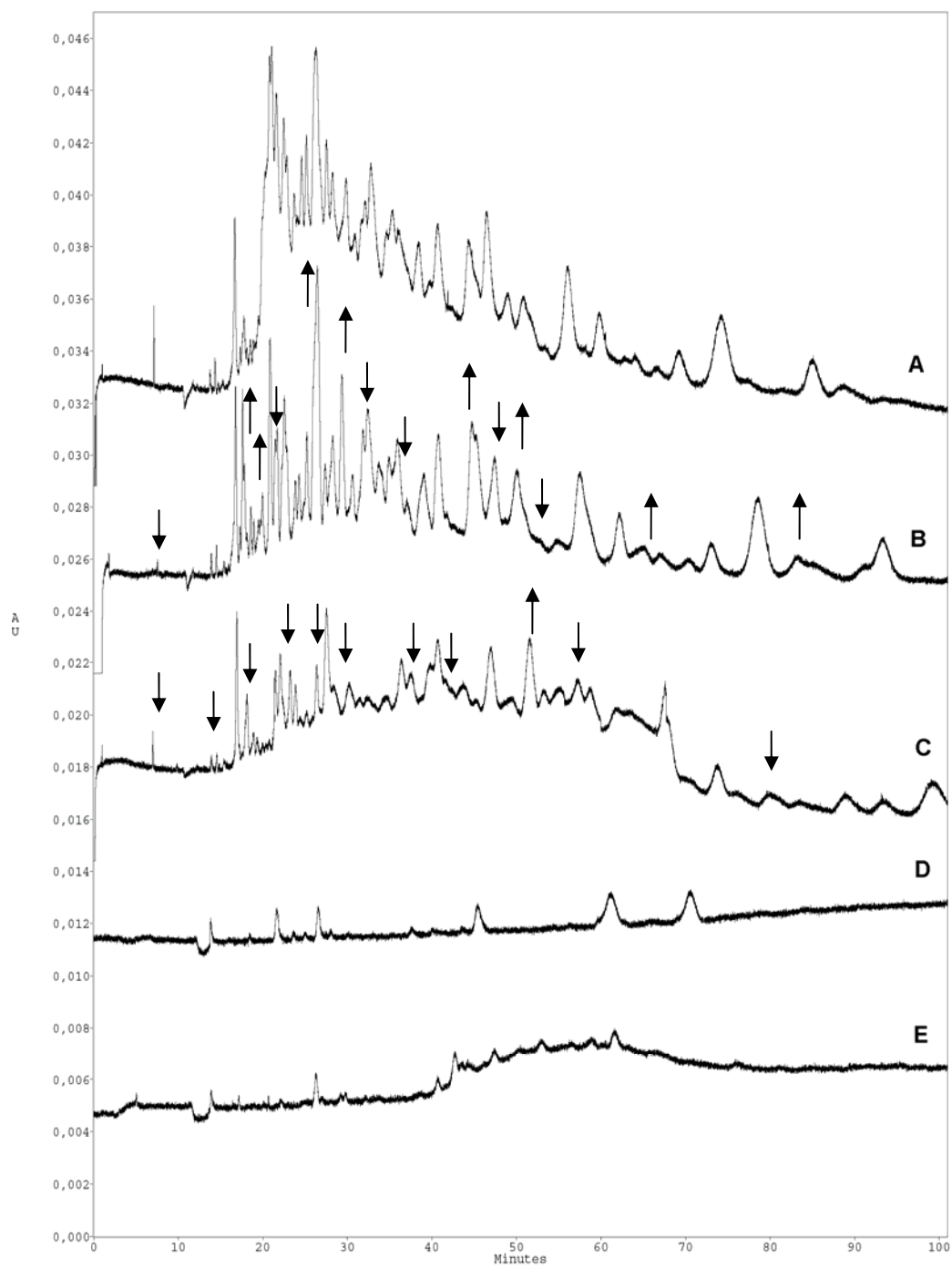
Kapilární elektroforézou s UV detekcí při 214 nm byly získány peptidové mapy enzymatických štěpů glykovaných a kontrolních vzorků BSA. Separace probíhala v křemenné kapiláře (délka 47 /40 cm; vnitřní průměr 75 μm) ve fosfátovém pufru (0,1 mol/l; pH 2,5). Vzorek byl nastříkovan elektrokineticky (10 sekund, 10 kV). Ke štěpení BSA byly použity následující enzymy: trypsin (Obr. 2), pepsin (Obr. 3) a proteináza K (Obr. 4). Šipkami jsou vyznačeny rozdíly mezi kontrolními (Obr. 2A, 3A, 4A) a glykovanými vzorky.

Z obr. 2-4 je zřejmé, že výsledné peptidové mapy jsou silně ovlivněny použitým modifikátorem. Při glykaci BSA glukózou a následném štěpení enzymy (Obr. 2B, 3B, 4B) byly získány bohaté peptidové mapy. Glukóza patří mezi mírné modifikátory, rychlost reakce (glykace), tzn. kinetika modifikace, je velmi pomalá, vzniká málo příčných vazeb (tj. i málo pokročilých AGE produktů) a po štěpení enzymy jsou produkovány peptidy jen málo pozměněné ve srovnání s neglykovaným (nemodifikovaným) albuminem. Méně bohatého peptidového profilu bylo dosaženo při modifikaci ribózou a štěpením trypsinem a pepsinem (Obr. 2C, 3C). Naopak peptidový profil vzorku glykovaného ribózou a štěpeného proteinázou K (Obr. 4C) byl srovnatelný s profilem vzorku glykovaného glukózou a štěpeným stejným enzymem (Obr. 4B). Lze předpokládat, že místa v aminokyselinové sekvenci BSA, kde štěpí proteináza K, nebyly ribózou příliš modifikovány a vzniklé specifické peptidy nebyly spojeny příčnými vazbami (na rozdíl od peptidů detekovaných po štěpení ostatními enzymy). Zcela jiná situace nastává při použití dioxo-sloučenin (glyoxalu a glutardialdehydu (Obr. 2D, 2E, 3D, 3E, 4D, 4E)). Tyto látky patří mezi silné modifikátory, které rychle reagují s volnou aminoskupinou (lysinu, argininu) bílkoviny a vyvolávají tvorbu příčných vazeb. Takto modifikované bílkoviny jsou odolné vůči enzymatickému štěpení a poskytují chudý peptidový profil. Vznikají velké, navzájem spojené proteinové (či peptidové) molekuly, které nelze pomocí CE účinně rozdělit. Proto na některých záznamech (Obr. 2D, 2E, 3E) vytváří základní čára hrbol.

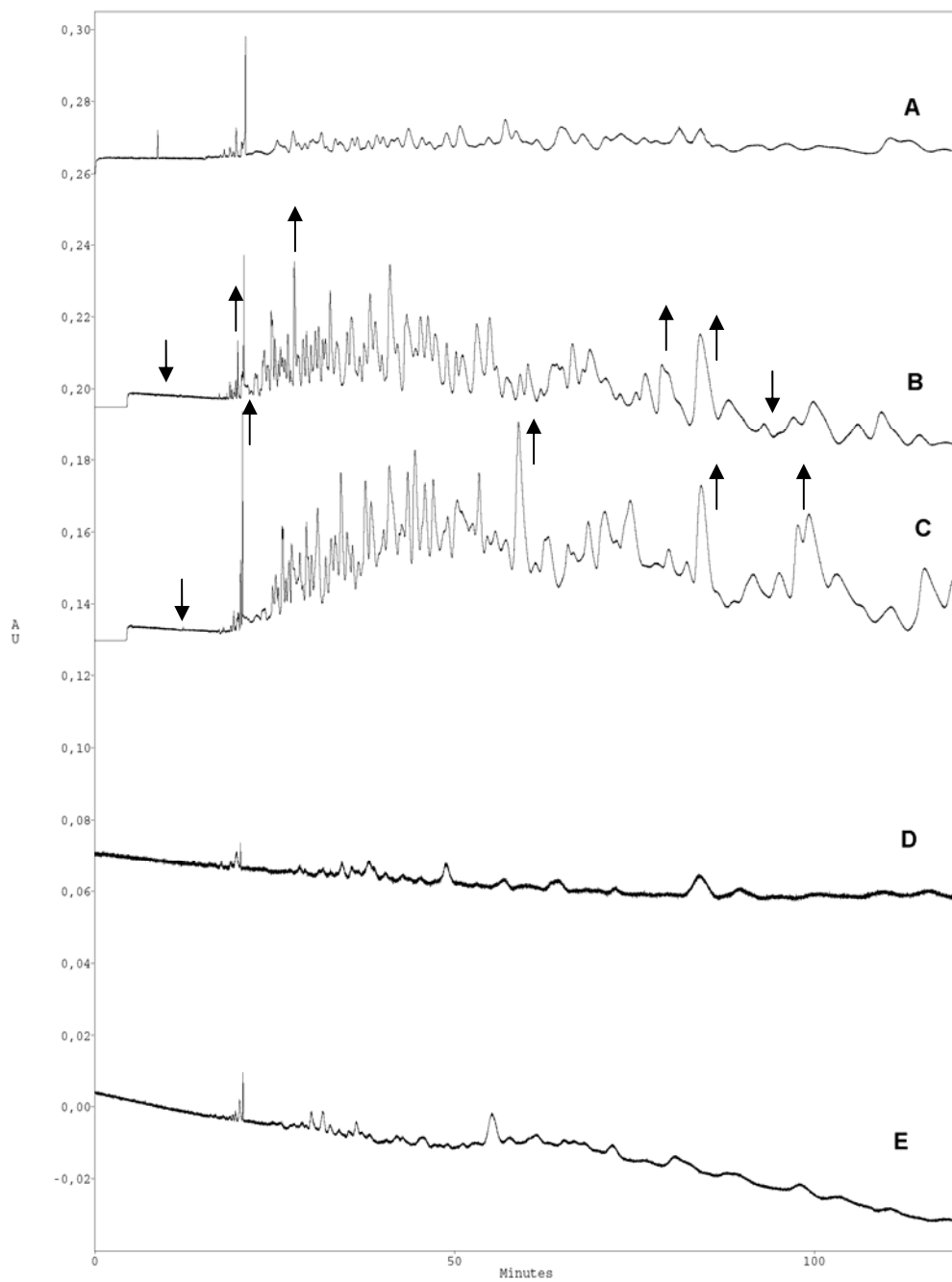
Změna struktury a tedy i vlastností BSA byla patrná již pouze optickým posouzením po inkubaci s glyoxalem a glutardialdehydem (bez štěpení enzymy). Tyto vzorky byly žluté (glyoxal) až žlutooranžové (glutardilaldehyd) na rozdíl od ostatních vzorků, které zůstaly bezbarvé.



Obr. 2 CE/UV tryptická peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA ve fosfátovém pufru (0,1 mol/l; pH 2,5): (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) ribózou, (D) glyoxalem, (E) glutardialdehydem



Obr. 3 CE/UV pepsinová peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA ve fosfátovém pufru (0,1 mol/l; pH 2,5): (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) ribózou, (D) glyoxalem, (E) glutardialdehydem

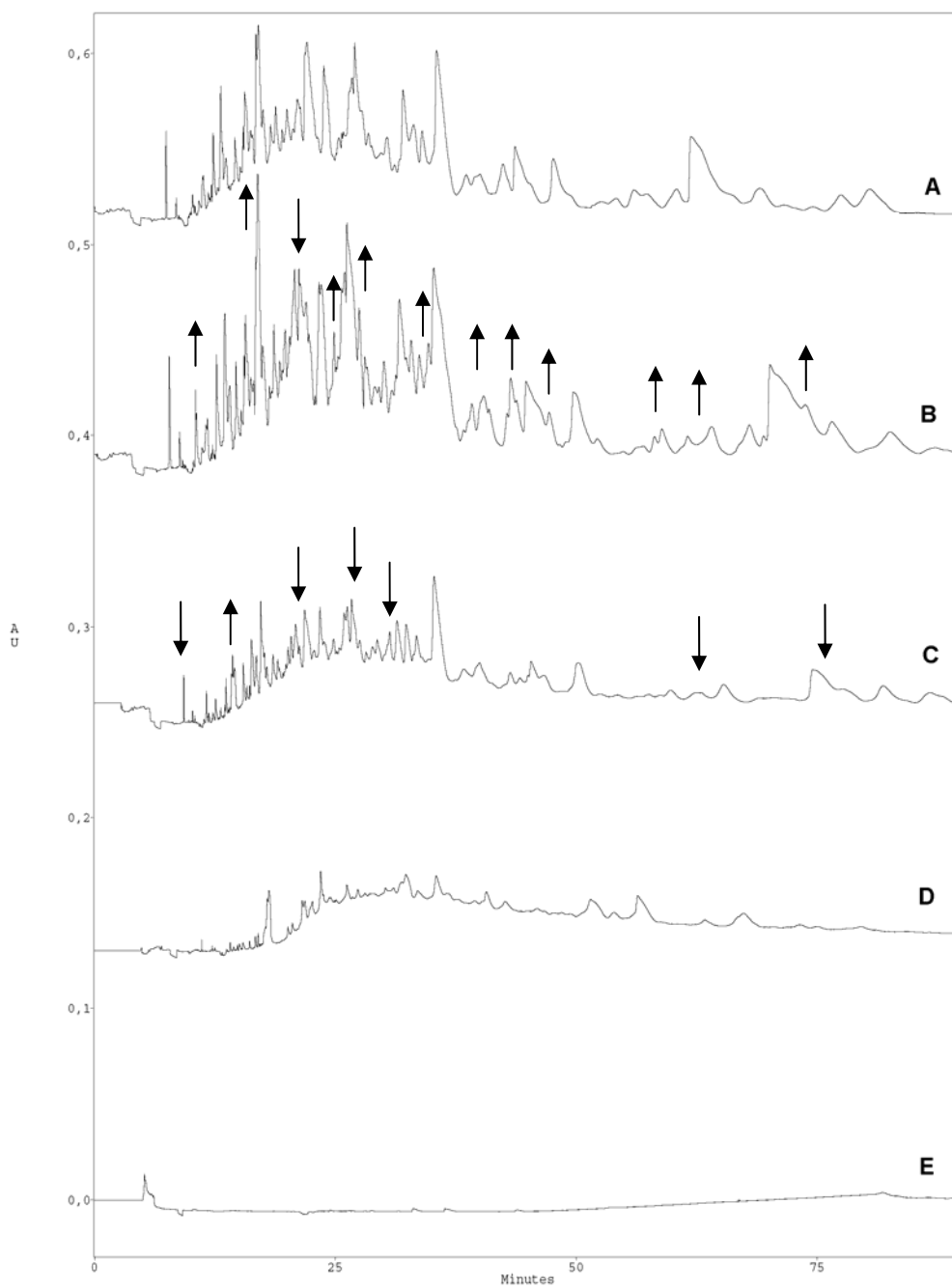


Obr. 4 CE/UV proteinázová peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA ve fosfátovém pufru (0,1 mol/l; pH 2,5): (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) ribózou, (D) glyoxalem, (E) glutardialdehydem

Dále byla zkoušena metoda zakoncentrování pomocí tzv. „dynamic pH junction“. Tato technika využívá delší dobu nástřiku vzorku a rozdílné hodnoty pH vzorku a základního pufru ke změně elektroforetických pohyblivostí, tím dochází k zakoncentrování vzorku na rozhraní a zvýšení citlivosti (86). Tato metoda slouží k zakoncentrování vzorku pro účely spojení CE-MS. Zde totiž dochází k naředění analytů vlivem použití obalové kapaliny (sheath liquid) a tím podstatnému snížení citlivosti.

Příklad tohoto přístupu je demonstrován sledováním separace pomocí UV detektoru při 214 nm (Obr. 5). Tryptické štěpy BSA rozpuštěné v 20 mmol/l NH_4HCO_3 o pH 7,8 byly separovány v HCOOH o koncentraci 1 mol/l (pH neupravováno, přibližná hodnota 1,75). Separace probíhala v křemenné kapiláře (délka 57 /50 cm; vnitřní průměr 50 μm). Vzorek byl nastřikován hydrodynamicky (198 sekund, 20 kV).

Získaná tryptická peptidová mapa (Obr. 5) je opět silně ovlivněna volbou modifikátoru. Rozdíly mezi kontrolou (Obr. 5A) a glykovanými vzorky (Obr. 5B-E) jsou naznačeny šipkami. U dioxo-sloučenin (Obr. 5D-E) byl získán chudý peptidový profil. V porovnání s výsledky získanými ve fosfátovém pufru (Obr. 2) nedošlo ke zlepšení separace. Došlo ovšem k podstatnému zvýšení odezvy detektoru. To znamená, že bylo skutečně dosaženo většího zkconcentrování vzorku.



Obr. 5 CE/UV tryptická peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA v kyselině mravenčí (1 mol/l; pH přibližně 1,75): (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) ribózou, (D) glyoxalem, (E) glutardialdehydem

4.2 HPLC/MS analýza enzymatických štěpů BSA

Použitím techniky HPLC s MS a MS/MS detekcí byly získány peptidové mapy enzymatických štěpů BSA. Ke štěpení BSA byly použity následující enzymy: trypsin (Obr. 6), pepsin (Obr. 7) a proteináza K (Obr. 8). Výsledky z MS (MS/MS) byly vyhodnoceny pomocí softwaru Spectrum Mill (v. 3.02 Agilent) porovnáním se specifickou databází pro BSA extrahovanou z databáze SwissProt. Hlavním typem detekované modifikace byla karboxymethylace lysinu (CML). Pozice výskytu peptidů s CML jsou naznačeny šipkami. V tabulce 1 jsou uvedena konkrétní umístění CML v sekvenci BSA a jeho peptidové pokrytí. Vznik CML a pokrytí jsou silně ovlivněna použitým modifikátorem. Nejmenší pokrytí poskytují vzorky modifikované glutardialdehydem. Toto bylo ale způsobeno zesíťováním proteinu pomocí reaktivní dioxo-sloučeniny. U těchto vzorků nebyly nalezeny žádné CML, ale na rozdíl od ostatních modifikátorů se zde vyskytovaly oxidované methioniny (v poloze 111, 208 a 469).

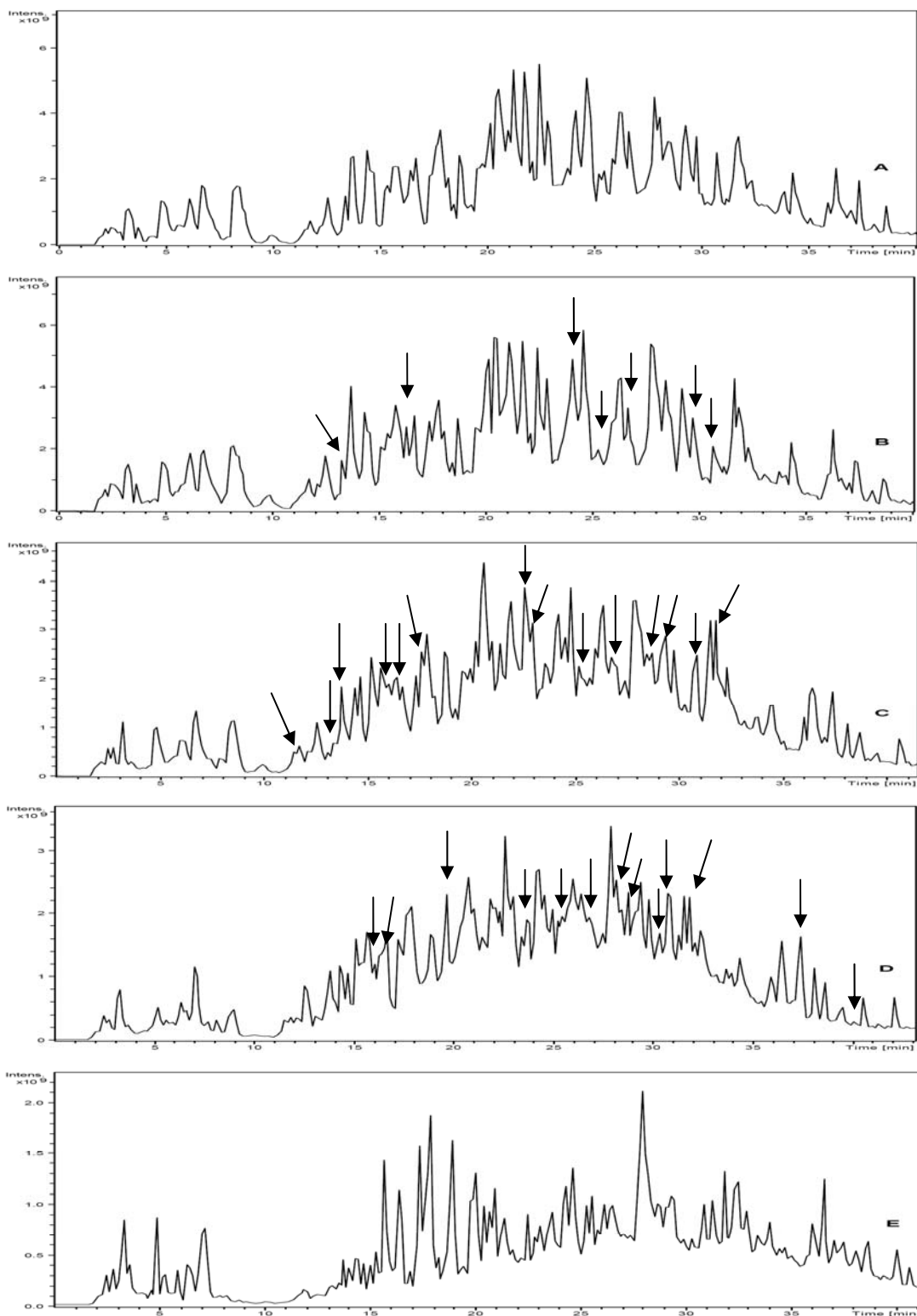
Z tabulky vyplývá, že počet CML roste ve směru od glukózy ke glyoxalu, bez ohledu na použitý enzym. Toto je v souladu s reaktivitou cukrů, kdy ribóza je cukrem s vyšším obsahem redukcí formy než glukóza. U BSA glykovaného glukózou a štěpeného pepsinem se na rozdíl od ostatních dvou enzymů nevyskytovaly žádné CML, i když jeho pokrytí bylo vyšší. U pepsinových štěpů BSA glykovaného ribózou a glyoxalem došlo k poklesu výskytu CML oproti ostatním dvěma enzymům. To je pravděpodobně způsobeno sníženou reaktivitou pepsinu s glykovanými peptidy. Je samozřejmé, že modifikační reakce neprobíhá se 100% výtežkem, a proto existují vedle sebe peptidy/proteiny jak glykované na specifickém místě, tak i nemodifikované. Pravděpodobně právě pepsin preferenčně štěpí nemodifikované peptidy. Je třeba zdůraznit, že vzorky byly modifikovány za stejných podmínek v jedné zkumavce a byly rozděleny na adekvátní části až před enzymatickým štěpením.

Velmi reaktivním místem BSA uváděným v literatuře je peptidová sekvence 548-557 (KQTELVLLK) (105). Lysin 548 snadno podléhá karboxymethylaci. Dalšími reaktivními místy uváděnými v literatuře (106) jsou lysiny v pozicích 88, 248, 256, 263, 309, 495, 528 a 597. V případě lidského sérového albuminu (HSA) se

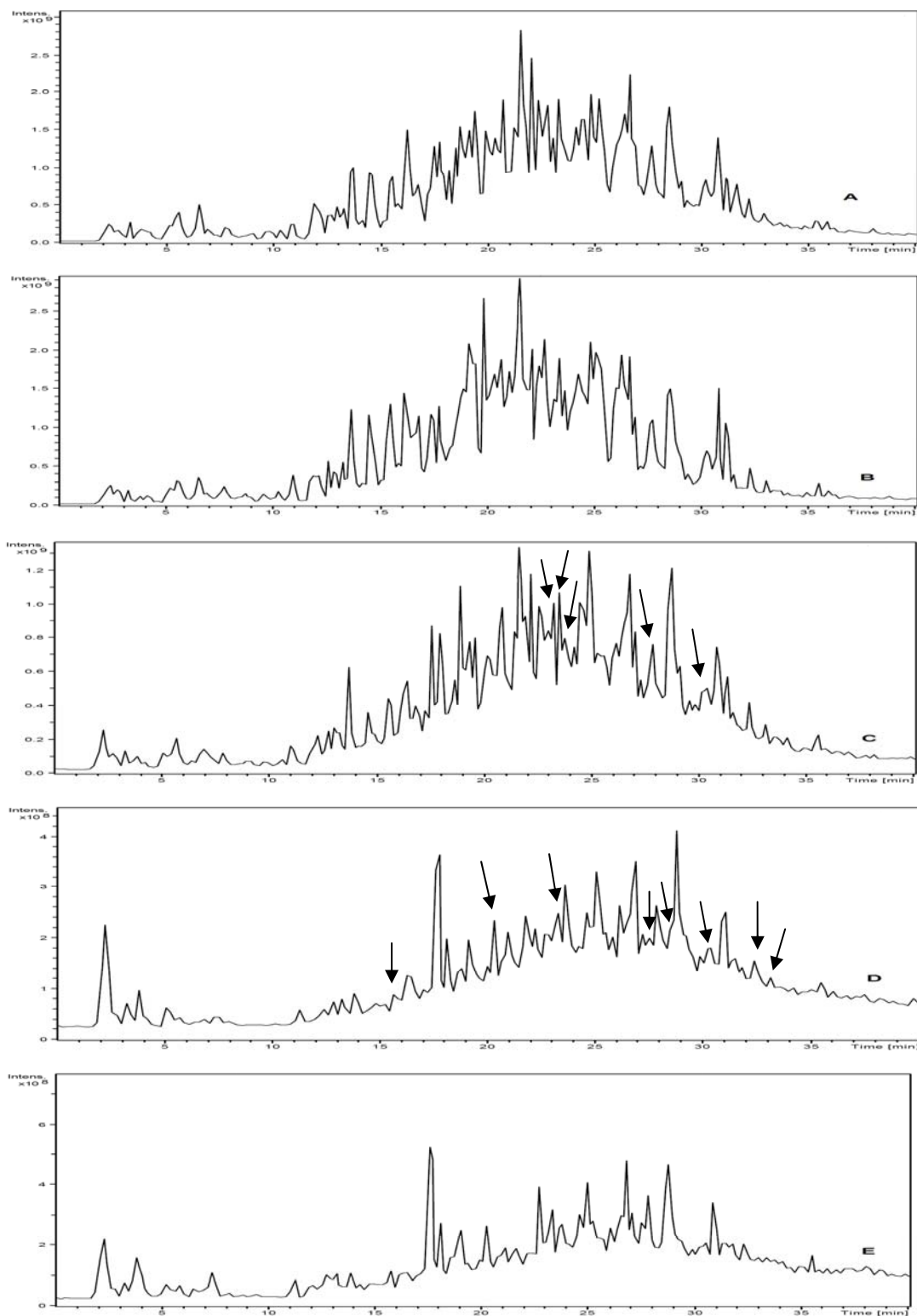
nejreaktivnější místo nachází na lysinu v poloze 525 (107). Při nedávné studii HSA bylo objeveno dalších 30 míst náchylných ke glykaci (108). Mezi nejvýznamnější patřily lysiny v pozicích 205 a 475.

Z tabulky 1 vyplývá, že převážná část reaktivních míst BSA uváděných v literatuře se nachází i v analyzovaných vzorcích. Konkrétně se jednalo o CML v poloze 548, 88, 248, 256, 309, 495 a 597. Díky štěpení třemi různými enzymy bylo získáno nejenom větší pokrytí, ale i další karboxymethylované lysiny. Zajímavé je, že některé CML se vyskytují opakovaně, i když jsou vzorky glykovány různými cukry a štěpeny různými enzymy. Například CML v poloze 140 se objevuje u tryptických i proteinázových štěpů. To svědčí o překrytí peptidů v peptidovém mapování a reaktivnosti nalezených míst. Mezi nejreaktivnější místa patří, vedle již zmíněného lysinu v poloze 548, také polohy 401, 412, 455.

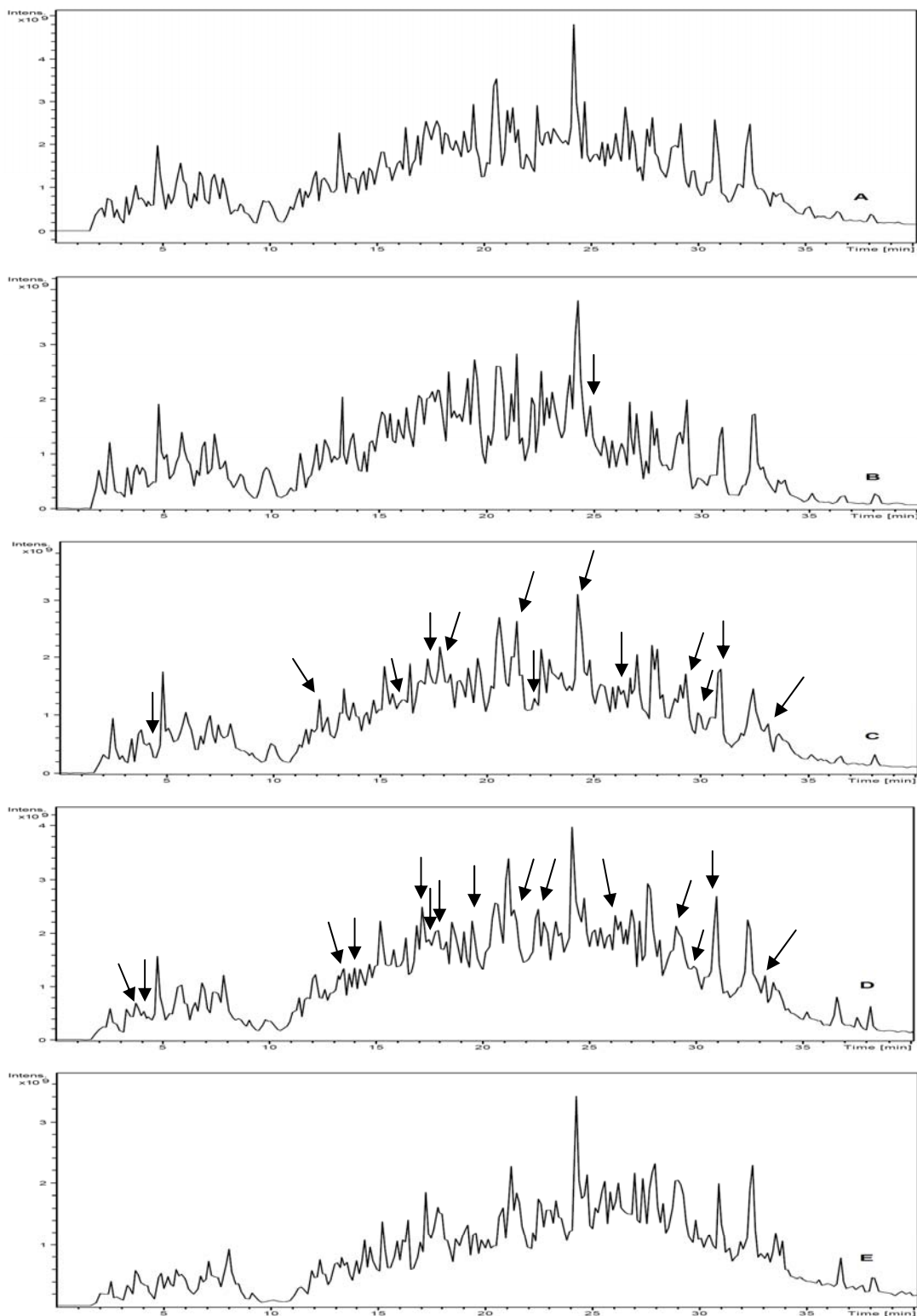
Na obr. 9-12 jsou uvedeny příklady MS/MS spekter nemoifikovaných peptidů a stejných peptidů obsahujících CML.



Obr.6 HPLC/ESI-MS tryptická peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA: (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) ribózou, (D) glyoxalem, (E) glutardialdehydem. X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud



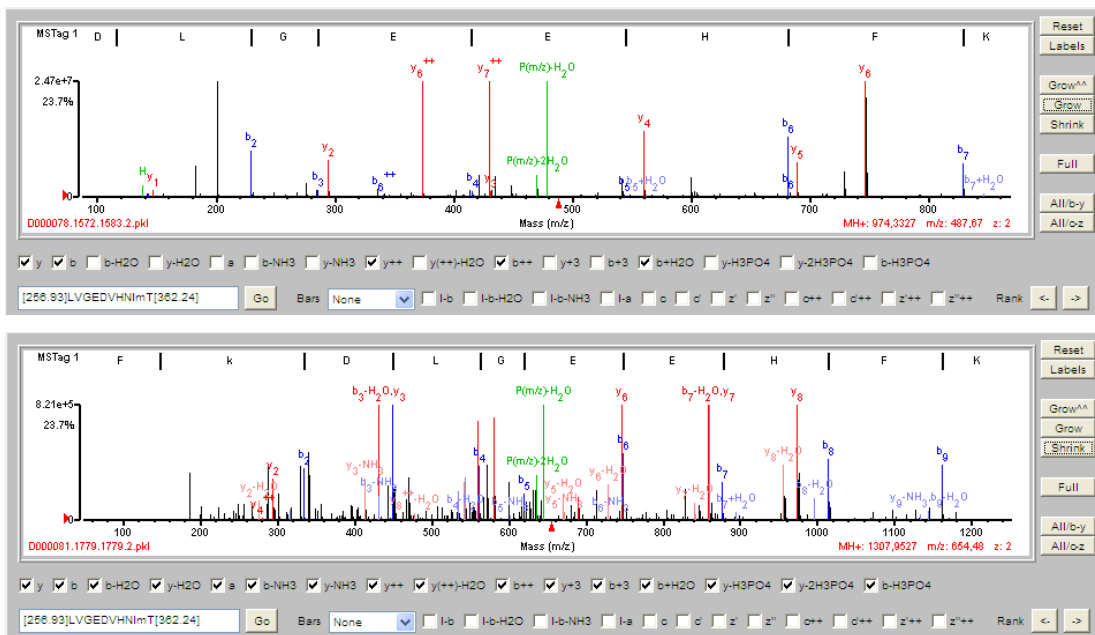
Obr.7 HPLC/ESI-MS pepsinová peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA: (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) ribózou, (D) glyoxalem, (E) glutardialdehydem. X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud



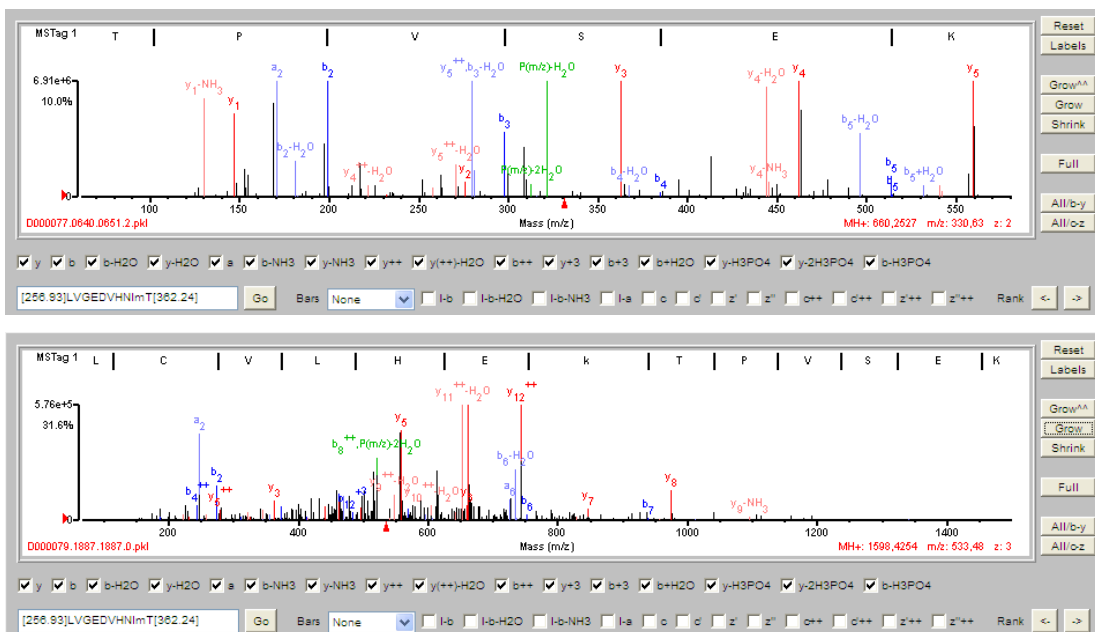
Obr.8 HPLC/ESI-MS proteinázová peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA: (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) ribózou, (D) glyoxalem, (E) glutardialdehydem. X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud

Tabulka 1 HPLC/MS analýza kontrolních a glykovaných vzorků BSA, štěpeno trypsinem, pepsinem, proteinázou K: pokrytí a místa výskytu karboxymethylovaných lysinů (CML)

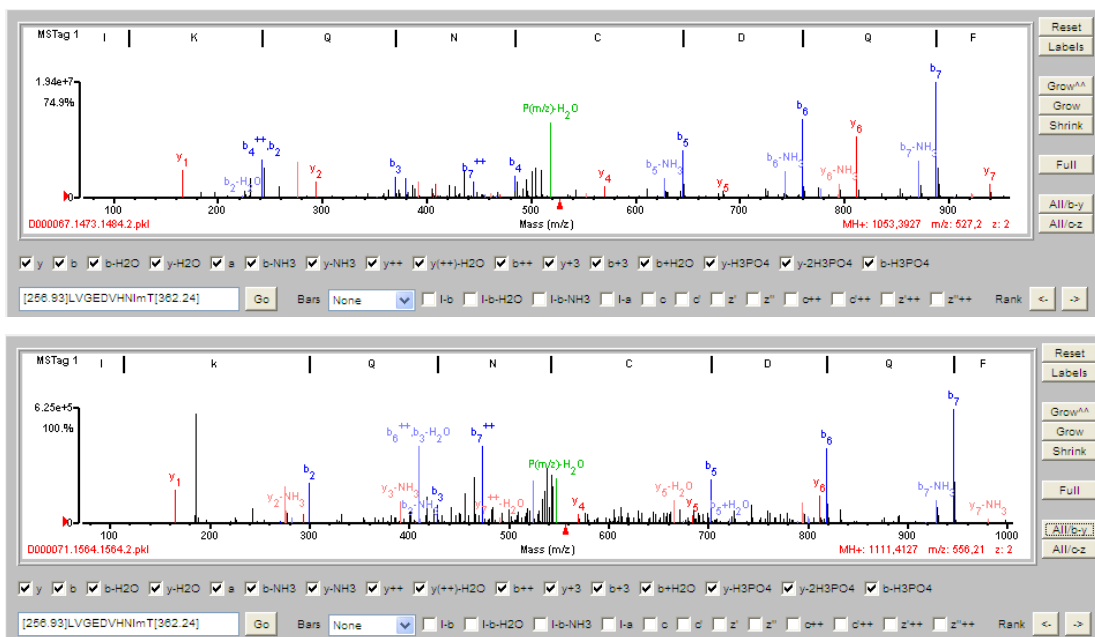
	Trypsin		Pepsin		Proteináza K	
	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML
Kontrola	44%	-	65%	-	44%	-
Glukóza	54%	140	69%	-	53%	140
		401				-
		412				-
		455				-
		489				-
		548				-
		561				-
Ribóza	53%	28	54%	138	56%	88
		36		412		138
		88		489		140
		140		568		183
		204		597		204
		248		-		374
		346		-		437
		401		-		455
		412		-		489
		455		-		495
		495		-		523
		498		-		544
		548		-		597
		561		-		-
		Glyoxal		53%		100
204	309		130			
245	318		138			
248	420		140			
256	489		204			
285	523		228			
297	568		285			
401	597		374			
412	-		401			
437	-		412			
455	-		437			
489	-		489			
495	-		495			
523	-		523			
548	-	597				
Glutardialdehyd	18%	-	20%	-	22%	-



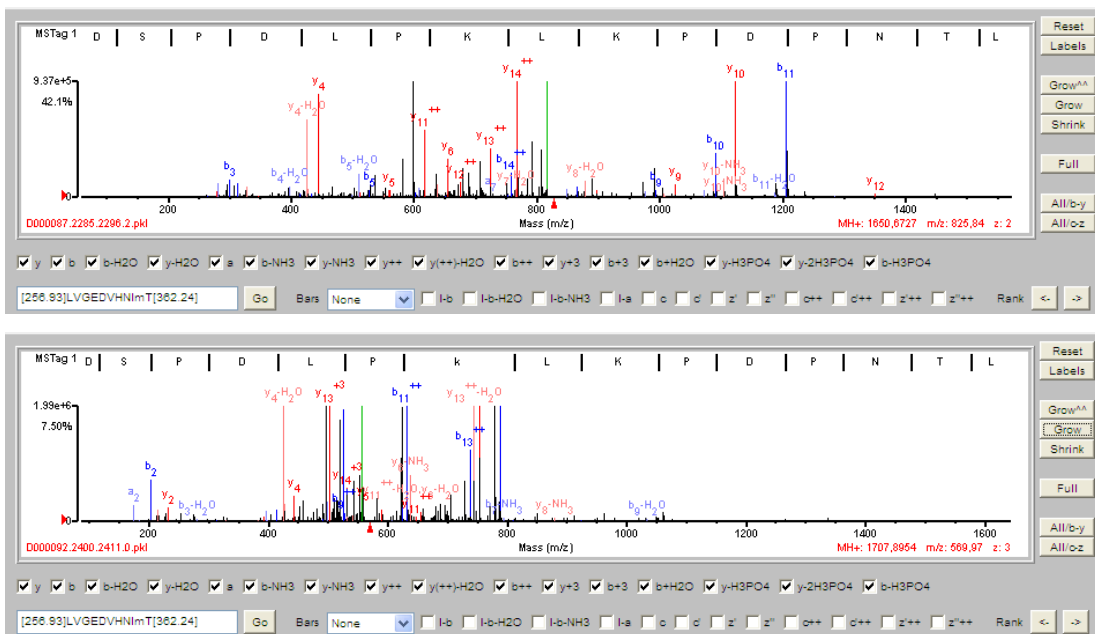
Obr. 9 HPLC-MS/MS spektrum sekvence DLGEEHFK získané štěpením BSA trypsinem: nahoře kontrola, dole BSA modifikovaný ribózou (CML 36)



Obr. 10 HPLC-MS/MS spektrum sekvence TPVSEK získané štěpením BSA trypsinem: nahoře kontrola, dole BSA modifikovaný glukózou (CML 489)



Obr. 11 HPLC-MS/MS spektrum sekvence IKQNCDQF získané štěpením BSA pepsinem: nahoře kontrola, dole BSA modifikovaný ribózou (CML 412)



Obr. 12 HPLC-MS/MS spektrum sekvence DSPDLPKLPDNPNTL získané štěpením BSA proteinázou K: nahoře kontrolna, dole BSA modifikovaný ribózou (CML 138)

Jak bylo zmíněno výše, kombinací různých enzymů lze dosáhnout vyššího pokrytí. Tabulka 2 udává pokrytí sekvence BSA u kontroly a jednotlivých glykovaných vzorků, kterého bylo dosaženo při použití všech třech enzymů najednou. Bylo nalezeno 551 aminokyselin z 607 možných, ze kterých se celkově skládá sekvence BSA. Aminokyselinová sekvence BSA je znázorněna na obr. 13. Identifikované peptidy jsou zvýrazněny tučným písmem. Lysiny a argininy, u kterých může docházet ke glykačním modifikacím, jsou podtrženy.

Tabulka 2 HPLC/MS analýza kontrolních a glykovaných vzorků BSA štěpených trypsinem, pepsinem, proteinázou K: celkové pokrytí pro jednotlivé modifikátory

Modifikátor	Celkové pokrytí
Bez modifikátoru	81%
Glukóza	85%
Ribóza	82%
Glyoxal	75%
Glutardialdehyd	42%

1	<u>M</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u>	<u>L</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>G</u>	<u>V</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>E</u>	<u>I</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>E</u>	<u>E</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u>	50
51	<u>F</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>F</u>	<u>D</u> <u>E</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>L</u>	<u>T</u> <u>E</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>D</u>	<u>E</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>L</u>	<u>H</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>K</u>	100
101	<u>V</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>D</u>	<u>M</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>P</u>	<u>E</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>K</u>	<u>D</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u>	<u>P</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>F</u>	150
151	<u>K</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>K</u>	<u>Y</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>P</u>	<u>Y</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>Y</u>	<u>A</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>E</u>	<u>C</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u>	200
201	<u>L</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>E</u>	<u>K</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>R</u>	<u>L</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>G</u>	<u>E</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u>	<u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>E</u>	250
251	<u>F</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>D</u>	<u>L</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>H</u>	<u>G</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>R</u>	<u>A</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>N</u>	<u>Q</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>E</u>	300
301	<u>C</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>S</u>	<u>H</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>A</u>	<u>I</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>A</u>	<u>D</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>K</u>	<u>N</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>L</u>	350
351	<u>G</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>R</u>	<u>H</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u>	<u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u>	<u>E</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>H</u>	<u>A</u> <u>C</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>L</u>	400
401	<u>K</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>L</u>	<u>I</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>D</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>K</u>	<u>L</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>L</u>	<u>I</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>Q</u>	<u>V</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>S</u>	450
451	<u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>C</u>	<u>C</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>M</u> <u>P</u>	<u>C</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>L</u>	<u>N</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>T</u>	<u>P</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>C</u>	500
501	<u>T</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>C</u>	<u>F</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Y</u>	<u>V</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>F</u>	<u>T</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>P</u>	<u>D</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>T</u>	550
561	<u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>P</u>	<u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>V</u>	<u>M</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>K</u>	<u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>C</u>	<u>F</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>V</u>	600
601	<u>S</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u>					607

Obr. 13 Aminokyselinová sekvence BSA (identifikované úseky jsou označeny tučně, lysiny a argininy podtržením)

Pro kontrolu, zda nedošlo ke štěpení proteinů proteázami z možné kontaminace během inkubace, byla analyzována i kontrolní série vzorků s tabletou obsahující inhibitory proteáz (Complete Mini, Roche, Mannheim, Německo). Získané peptidové mapy se shodovaly s profily vzorků bez tablety. Byly nalezeny i stejné pozice CML. Lze tedy usuzovat, že u původních vzorků (bez tablety) nedošlo k bakteriální kontaminaci a peptidové štěpy vznikly pouze působením zvolených enzymů (trypsinu, pepsinu nebo proteinázy K).

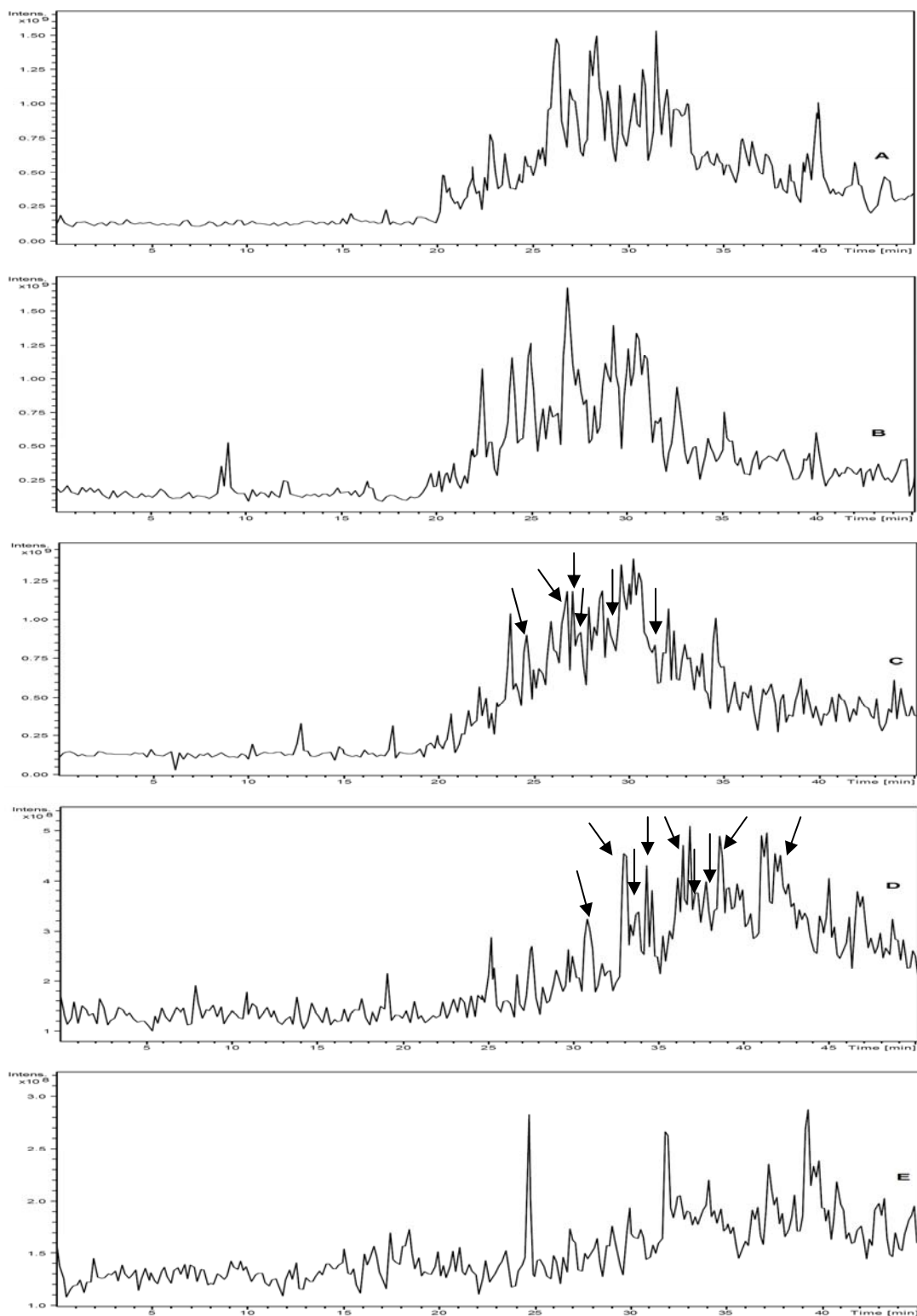
4.3 CE/MS analýza enzymatických štěpů BSA

Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie se hojně využívá pro stanovení proteinové sekvence, posttranslačních modifikací, k určení přesného místa glykace i ve spojení s vysokou separační účinností kapilární elektroforézy. CE/MS ovšem vždy vyžaduje optimalizaci jednotlivých parametrů (například napětí na kapiláře a toku „obalové kapaliny“) (109).

Separace vzorků BSA probíhala v křemenné kapiláře (celková délka 100 cm; vnitřní průměr 50 μm), která byla spojena pomocí uzemněné jehly a „obalové kapaliny“ (sheath liquid) s hmotnostním detektorem s iontovou pastí. „Obalovou kapalinou“ tvořila směs 5 mmol/l octanu amonného/izopropanolu (1:1; v/v) ve vodě. Její průtoková rychlost byla 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Jako základní elektrolyt byla použita kyselina mravenčí (0,25 mol/l). Vzorek byl nastříkovan hydrodynamicky (300 sekund).

Problémem ve spojení CE/MS je naředění vzorků „obalovou kapalinou“ a následné snížení citlivosti. Řešením je zakoncentrování vzorku. V našem případě byla k zakoncentrování použita technika tzv. „dynamic pH junction“, která využívá delší dobu nástřiku vzorku a rozdílné hodnoty pH vzorku a základního pufru.

Metodou CE/MS byl analyzován vzorek BSA (obsahující tabletu Complete Mini s inhibitory bakteriálních proteáz) štěpený trypsinem (Obr. 14). Výsledky z MS byly vyhodnoceny pomocí softwaru Spectrum Mill (v. 3.02 Agilent). Data pro BSA byly extrahovány z databáze Swiss Prot. Hlavním typem detekované modifikace byla karboxymethylace lysinu (CML). Pozice výskytu CML u jednotlivých modifikátorů jsou naznačeny šipkami.



Obr. 14 CE/ESI-MS tryptická peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA (s tabletou Complete Mini): (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) ribózou, (D)glyoxalem, (E) glutardialdehydem. X-osa: retenční čas, Y-osa: celkový iontový proud

Tabulka 3 uvádí konkrétní umístění CML v sekvenci BSA a její pokrytí. V porovnání s výše uvedenou metodou HPLC/MS bylo dosaženo nižšího pokrytí a bylo identifikováno menší množství CML. Celkové pokrytí aminokyselinové sekvence BSA získané kombinací kontroly a glykovaných vzorků bylo pouze 54%. Nižší citlivost byla způsobena naředěním analytu „obalovou kapalinou“.

Tabulka 3 CE/MS analýza kontroly a glykovaných vzorků BSA (s tabletou Complete Mini) štěpených trypsinem: pokrytí a místa výskytu karboxymethylovaných lysinů (CML)

Kontrola		Glukóza		Ribóza		Glyoxal		Glutardiald.	
Pokr.	CML	Pokr.	CML	Pokr.	CML	Pokr.	CML	Pokr.	CML
24%	-	32%	-	31%	36	46%	36	6%	-
					401		100		
					455		228		
					489		245		
					498		248		
					548		256		
					-		401		
					-		455		
					-		548		

5. ZÁVĚR

Práce se zabývala studiem separace enzymatických štěpů neenzymaticky modifikovaného (glykovaného) BSA pomocí technik CE, CE-MS a HPLC-MS. Byly vypracovány metody pro modifikaci BSA různými oxo-sloučeninami (glukózou, ribózou, glyoxalem a glutardialdehydem) a pro jeho následné peptidové mapování, kde byly použity enzymy štěpící v rozdílných místech sekvence (trypsin, pepsin a proteináza K).

Kapilární elektroforézou ve fosfátovém pufru bylo zjištěno, že vznik peptidových map je významně ovlivněn použitým modifikátorem. Mírné modifikátory s pomalou kinetikou glykace (například glukóza) poskytují po enzymatickém štěpení pouze malé množství pozměněných peptidů (ve srovnání s neglykovaným vzorkem). Výsledkem je bohatý peptidový profil. Při použití silných modifikátorů (dioxo-sloučenin) vznikají velké molekuly spojené příčnými vazbami, které jsou odolné vůči enzymatickému štěpení a nelze je pomocí CE účinně rozdělit.

Na tryptických štěpech BSA byla testována metoda zakoncentrování pomocí tzv. „dynamic pH junction“. Jako pufr sloužila kyselina mravenčí (pH 1,75) a vzorky byly rozpuštěny v slabě alkalické pufru (pH 7,8). Separační účinnost se nezměnila (oproti dělení ve fosfátovém pufru), ale vlivem zakoncentrování se výrazně zvýšila odezva detektoru (tj. koncentrace peptidů).

Pro stanovení proteinové sekvence, posttranslačních modifikací a k určení přesného místa těchto modifikací byl použit hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem a iontovou pastí. Bylo využito spojení s HPLC i CE.

Technikou HPLC-MS byly detekovány modifikace vyskytující se v peptidových sekvencích enzymatických štěpů glykovaného BSA. Hlavním typem nalezené modifikace byla karboxymethylace lysinu (CML). Bylo potvrzeno, že nejreaktivnějším glykačním místem je lysin 548. Další velmi reaktivní místa se nacházela na lysinech 401, 412 a 455 (tato místa byla shodná pro všechny modifikátory mimo glutardialdehyd). Bylo nalezeno 551 aminokyselin BSA z 607 možných.

Metodou CE-MS bylo detekováno menší množství CML (ve srovnání s HPLC-MS). Také pokrytí aminokyselinové sekvence bylo nižší. Příčinou výrazného snížení

citlivosti bylo naředění analytu „obalovou kapalinou“. Poklesu citlivosti nezabránilo ani zkoncentrování pomocí techniky „dynamic pH junction“.

6. LITERATURA

1. **Racek, J.** *Klinická biochemie*. Praha : Galén, 1999. p. 62-63.
2. **Murray, R.K.** *Harperova biochemie*. Jinočany : H&H, 1998. p. 704.
3. **Maillard, L.C.** *C.R. Seances Acad. Sci.* 1912, **154**, p. 66.
4. **Trivelli, L.A., Ranney, H.M., Lai, H.T.** *N. Engl. J. Med.* 1971, **284**, p. 353-357.
5. **Watkins, N.G., Thorpe, S.R., Baynes, J.W.** *J. Biol. Chem.* 1985, **260**: p. 10626-10636.
6. **Lapolla, A., Traldi, P., Fedele, D.** *Clinical Biochemistry*. 2005, **38**: p. 103-115.
7. **Thornalley, P.J.** *Endocrinol. Metab.* 1996, **3**: p. 149-166.
8. **Ahmed, N., Argirov, O.K., Minhas, H.S., Cordeiro, C.A.A., Thornalley, P.J.** *Biochem. J.* 2002, **364**: p. 1-14.
9. **Brownlee, M.** *Nature*. 2001, **414**: p. 813-820.
10. **Bierhaus, A., Hofman, M.A., Ziegler, R., Nawroth, P.P.** *Cardiovasc. Res.* 1998, **37**: p. 586-600.
11. **Wolf, S.P., Jiang, Z.Y., Hunt, J.V.** *Free Radic. Biol. Med.* 1991, **10**: p. 339-352.
12. **Dyer, D.G., Blackledge, J.A., Katz, B.M.** *J. Nutr.* 1990, **29**: p. 13-20.
13. **Sell, D.R., Monnier, V.M.** *J. Biol. Chem.* 1989, **264**: p. 21597-21602.
14. **Ahmed, A.H., Thorpe, S.R., Baynes, J.W.** *J. Biol. Chem.* 1986, **261**: p. 4888-4894.
15. **Peppas, M., Uribarri, J., Vlassara, H.** *Cardiovasc. Toxicol.* 2002, **2**: p. 275-287.
16. **Kotchinsky, T., He, C.J., Mitsuhashi, T.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, **94**: p. 6474-6479.
17. **Nicholl, I.D., Bucala, R.** *Cell. Mol. Biol.* 1998, **44**: p. 1025-1033.
18. **Dean, R.T.** *Eur. J. Biochem.* 1975, **58**: p. 9-14.
19. **Horiuchi, S., Higashi, T., Ikeda, K., Saishoji, T., Jinnouchi, Y., Sano, H., Shibayama, R., Sakamoto, T., Araki, N.** *Diabetes*. 1996, **45**: p. 73-76.

20. Skolnik, E.Y., Yang, Z., Makita, Z., Radoff, S., Kirkstein, M., Vlassara, H. *J. Exp. Med.* 1991, **174**: p. 931-939.
21. Shinoara, M., Thornalley, P.J., Giardino, I. *J. Clin. Invest.* 1998, **101**: p. 1142-1147.
22. Sing, R., Barden, A., Mori, T., Beilin, L. *Diabetologia.* 2001, **44**: p. 129-146.
23. Monnier, V.M., Cerami, A. *Science.* 1981, **211**: p. 491-493.
24. Monnier, V.M., Glomb, M., Elgawish, A., Sell, D.R. *Diabetes.* 1996, **45**: p. 367-372.
25. Paul, R.G., Bailey, A.J. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1999, **31**: p. 653-660.
26. Stitt, A.W., Bucala, R., Vlassara H. *An. NY. Acad. Sci.* 1997, **811**: p. 115-129.
27. Schmidt, A.M., Hori, O., Cao, R. *Diabetes.* 1996, **45**: p. 77-80.
28. Christie, R.H., Freeman, M., Hyman, B.T. *Am. J. Pathol.* 1996, **148**: p. 399-403.
29. Anderson, M.M., Requena, J.R., Crowley, J.R., Thorpe, S.R., Heinecke, J.W. *J. Clin. Invest.* 1999, **104**: p. 103-113.
30. Wells-Knecht, K.J., Brinkmann, E., Wells-Knecht, M.C. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996, **11**: p. 41-47.
31. Sims, T.J., Rasmussen, L.M., Oxlund, H., Bailey, A.J. *Diabetologia.* 1996, **39**: p. 946-951.
32. Furth, A. *Br. J. Biomed. Sci.* 1997, **54**: p. 192-200.
33. Münch, G., Thome, J., Foley, P., Schitzel, R., Rieder, P. *Brain Research Reviews.* 1997, **23**: p. 134-143.
34. Ferguson, K.A. *Metabolism.* 1964, **13**: p. 985-1002.
35. Offord, R.E. *Nature.* 1966, **211**: p. 591-593.
36. Tessier, B., Blanchard, F., Vanderesse, R., Harcoat, C., Marc, I. *J. Chromatogr. A.* 2004, **1024**: p. 255-266.
37. Messina, I., Rossetti, D.V., Cassiano, L., Misiti, F., Giardina, B., Castagnola, M. *J. Chromatogr. B.* 1997, **699**: p. 149-171.
38. Liu, J.K., Lee, M.L. *Electrophoresis.* 2006, **27**: p. 3533-3546.
39. Lauer, H.H., McManigill, D. *Analytical Chemistry.* 1986, **58**: p. 166.
40. McCormick, R.M. *Analytical Chemistry.* 1988, **60**: p. 2322.

41. **Melanson, J. E., Baryla, N. E., Lucy, C. A.** *Trends Anal. Chem.* 2001, **20**: p. 365-374.
42. **Morand, M., Blaas, D., Kenndler, E.** *Journal of Chromatography B.* 1997, **691**: p. 192-196.
43. **Amini, A., Olofsson, I.M.** *J. Sep. Sci.* 2004, **27**: p. 675–685.
44. **Mikšík, I., Charvátová, J., Eckhardt, A., Deyl, Z.** *J. Chromatogr. B.* 2004, **800**, p. 155–160.
45. **Corradini, D., Cogliandro, E., D'Alessandro, L., Nicoletti, I. J.** *Chromatogr. A.* 2003, **1013**: p. 221–232.
46. **Quang, C.Y., Malek, A., Khaledi, M.G.** *Electrophoresis.* 2003, **24**: p. 824–828.
47. **Liu, J.K., Pan, T., Woolley, A.T., Lee, M.L.** *Anal. Chem.* 2004, **76**: p. 6948–6955.
48. **Wang, Y., Hu, S.W., Li, H N., Allbritton, N.L., Sims, C.E.** *J. Chromatogr. A.* 2003, **1004**: p. 61–70.
49. **Pontoglio, A., Vigano, A., Sebastiano, R., Maragnoli, L., Righetti, P.G., Gelfi, C.** *Electrophoresis.* 2004, **25**: p. 1065–1070.
50. **Hamrníková, I., Mikšík, I., Uhrová, M., Deyl, Z.** *Anal. Chim. Acta.* 1998, **372**: p. 257-272.
51. **Gotz, S., Karst, U.** *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, **387**: p. 183-192.
51. **Xu, X.M., Li, L., Weber, S.G.** *Trends Anal. Chem.* 2007, **26**: p. 68-79.
53. **Ban, E.M., Kim, D., Yoo, E.A., Yoo, Y.S.** *Anal. Sci.* 1997, **13**: p. 489-492.
54. **Sim, M.K., Qui, X.S.** *Regul. Pept.* 2003, **111**: p. 179–182.
55. **Injac, R., Kac, J., Mlinaric, A., Karlikovic-Rajic, K.** *J. Sep. Sci.* 2006, **29**: p. 1288-1293.
56. **Liu, Z., Pawliszyn, J.** *Anal. Biochem.* 2005, **336**: p. 94–101.
57. **Kulp, M., Urban, P.L., Kaljurand, M., Bergstrom, E.T., Goodall, D.M.** *Anal. Chim. Acta.* 2006, **570**: p. 1-7.
58. **Johnson, M.E., Landers, J.P.** *Electrophoresis.* 2004, **25**: p. 3513–3527.
59. **Lee, J.Y., Li, H.W., Yeung, E.S.** *J. Chromatogr. A.* 2004, **1053**: p. 173–179.
60. **Huang, Y.F., Huang, C.C., Chang, H.T.** *Langmuir.* 2003, **19**: p. 7498–7502.
61. **Okerberg, E., Shear, J.B.** *Anal. Chem.* 2001, **73**: p. 1610–1613.

62. Paul, U.P., Li, L., Lee, M.L., Farnsworth, P.B. *Anal. Chem.* 2005, **77**: p. 3690–3693.
63. Kuijt, J., van Teylingen, R., Nijbacker, T., Ariese, F., Brinkman, U.A.T., Gooijer, C. *Anal. Chem.* 2001, **73**: p. 5026–5029.
64. Stutz, H. *Electrophoresis.* 2005, **26**: p. 1254-1290.
65. Monton, M.R.N., Terabe, S. *Anal. Sci.* 2005, **21**: p. 5-13.
66. von Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E. *Electrophoresis.* 2001, **22**: p. 1251-1266.
67. Smith, R.D., Barinaga, C.J., Udseth, H.R. *Anal. Chem.* 1988, **60**: p. 1948-1952.
68. Figeys, D., Aebersold, R. *Electrophoresis.* 1997, **18**: p. 360-368.
69. Rossier, J., Reymond, F., Michel, P. E. *Electrophoresis.* 2002, **23**: p. 858–867.
70. Zemann, A.J. *Trends Anal. Chem.* 2001, **20**: p. 346–354.
71. Tanyanyiwa, J., Leuthardt, S., Hauser, P.C. *Electrophoresis.* 2002, **23**: p. 3659–3666.
72. Liu, Y. M., Cheng, J. K. *J. Chromatogr. A.* 2002, **959**: p. 1–13.
73. Woods, L.A., Ewing, A.G. *Chem. Phys. Chem.* 2003, **14**: p. 207–211.
74. Lacher, N.A., Garrison, K.E., Lunte, S.M. *Electrophoresis.* 2002, **23**: p. 1577–1584.
75. Govindaraju, K., Govindaraju, V., Eidelman, D.H. *J. Chromatogr. B.* 2003, **788**: p. 369–376.
76. Baltussen, E., Guijt, R.M., van der Steen, G., Laugere, F., Baltussen, S., van Dedem, G.W.K. *Electrophoresis.* 2002, **23**: p. 2888–2893.
77. Gfrorer, P., Tseng, L.H., Rapp, E., Albert, K., Bayer, E. *Anal. Chem.* 2001, **73**: p. 3234–3239.
78. De Lorenzi, E., Massolini, G., Molinari, P., Galbusera, C., Longhi, R., Marini, C., Consonni, R., Chiari, M. *Electrophoresis.* 2001, **22**: p. 1373–1384.
79. Stellwagen, E., Ledger, R. *Anal. Biochem.* 2003, **321**: p. 167–173.
80. Hemond, C., Furtos-Matei, A., Waldron, K.C. *Electrophoresis.* 2003, **24**: p. 816–823.

81. **Janini, G.M., Zhou, M., Yu, L.R., Blonder, L., Gignac, M., Conrads, T.P., Issaq, H.J., Veenstra, T.D.** *Anal. Chem.* 2003, **75**: p. 5984-5993.
82. **Guzman, N.A., Stubbs, R.J.** *Electrophoresis.* 2001, **22**: p. 3602–3628.
83. **Waterval, J.C.M., Hommels, G., Bestebreurtje, P., Versluis, C., Heck, A.J.R., Bult, A., Lingeman, H., Underberg, W.J.M.** *Electrophoresis.* 2001, **22**: 2709–2716.
84. **Stroink, T., Wiese, G., Teeuwesen, J., Lingeman, H., Waterval, J.C.M., Bult, A., de Jong, G.J., Underberg, W.J.M.** *Electrophoresis.* 2003, **24**: p. 897–903.
85. **Monton, M.R.N., Imami, K., Nakanishi, M., Kim, J.B., Terabe, S.** *J. Chromatogr. A* 2005, **1079**: p. 266-273.
86. **Imami, K., Monton, M.R.N., Ishihama, Y., Terabe, S.** *J. Chromatogr. A* 2007, **1148**: p. 250-255.
87. **Banks, P.R.** *Trends Anal. Chem.* 1998, **17**: p. 612-622.
88. **Deantonis, K. M., Brown, P. R.** *Adv. Chromatogr.* 1997, **37**: p. 425-452.
89. **Moody, E.D., Viskari, P.J., Colyer, C.L.** *J. Chromatogr. B.* 1999, **729**: p. 55-64.
90. **Benito, I** *J. Chromatogr. A.* 1999, **841**: p. 105-114.
91. **Coble, P.G., Timperman, A.T.** *J. Chromatogr. A.* 1998, **829**: p. 309-315.
92. **Zacharis, C.K., Tempels, F.W.A., Theodoris, G.A.** *J. Chromatogr. A.* 2006, p. 297-303.
93. **Janasek, D., Franzke, J., Manz, A.** *Nature.* 2006, **442**: p. 374-380.
94. **Dittrich, P.S., Tachikawa, K., Manz, A.** *Anal. Chem.* 2006, **78**: p. 3887-3907.
95. **Sun, Y., Xin, X.F.** *J. Chromatogr.* 2006, **1117**: p. 228-233.
96. **Sandlin, Z.D.** *Anal. Chem.* 2005, **77**: p. 7702-7708.
97. **Emmer, A., Roeraade, J.** *Anal. Chim. Acta.* 2005, **542**: p. 137-143.
98. **Plenert, M.L., Shear, J.B.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, **100**: p. 3853–3857.
99. **Carru, C., Zinellu, A., Sotgia, S., Marongiu, G., Farina, M.G., Usai, M.F., Pes, G.M., Tadolini, B., Deiana, L.** *J. Chromatogr. A.* 2003, **1017**: p. 233–238.
100. **Riekkola, M.L.** *Electrophoresis.* 2002, **23**: p. 3865–3883.

101. **Popa, T.V., Mant, C.T., Chen, Y., Hodges, R.S.** *J. Chromatogr. A.* 2004, **1043**: p. 113– 122.
102. **Popa, T.V., Mant, C.T., Hodges, R.S.** *Electrophoresis.* 2007, **28**: p. 2181-2190.
103. **Kenseth, J.R., He, Y., Tallman, D., Pang, H.M., Coldiron, S.J.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, **8**: p. 327–333.
104. **Pang, H.M., Kenseth, J., Coldiron, S.** *Drug Discovery Today.* 2004, **9**: p. 1072–1080.
105. **Wada, Y.** *J. Mass Spectrom.* 1996, **31**: p. 263-266.
106. **Mikulíková, K., Mikšík, I., Deyl, Z.** *J. Chromatogr. B* 2005, **815**: p. 315–331.
107. **Garlick, R.L., Mazer, J.S.** *J. Biol. Chem.* 1983, **258**: p. 6142–6146.
108. **Gadgil, H.S., Bondarenko, P.V., Treuheit, M.J., Ren, D.** *Anal. Chem.* 2007, **79**: p. 5991–5999.
109. **Fanali, S., D’Orazio, G., Foret, F., Kleparnik, K., Aturki, Z.** *Electrophoresis* 2006, **27**: p. 4666–4673.