

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. DENISA SUCHÁNKOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Chemická derivatizace proteinů a peptidů pro usnadnění jejich
de novo sekvenace**

Bc. Denisa Suchánková

Diplomová práce

2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa Suchánková**
Osobní číslo: **C15636**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Chemická derivatizace proteinů a peptidů pro usnadnění jejich de novo sekvenace**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

Proteomická analýza - její cíle a metody.

Základní hmotnostně-spektrometrické techniky pro analýzu peptidů a proteinů.

De-novo sekvenace peptidů - důvody, způsoby a využití.

Metody derivatizace peptidů - porovnání, výhody a limitace.

Experimentální část:

Příprava modelové směsi tryptických peptidů myoglobinu jako standardního vzorku pro optimalizaci derivatizační metody.

Separace peptidů na kapilárních kolonkách s reverzní fází pomocí mikrogradientového zařízení.

Derivatizace peptidů zachycených na kolonce pomocí vybraných činidel s následnou separací vzorků a hmotnostně-spektrometrickou analýzou.

Optimalizace reakčních podmínek na stacionární fází.

Vyhodnocení získaných experimentálních dat a jejich interpretace.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Recentní odborná literatura dle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.**
Univerzita obrany, Hradec Králové

Ostatní konzultanti: **Mgr. Rudolf Kupčík**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

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 Pardubicích dne

Denisa Suchánková

Poděkování

Touto cestou bych zde ráda poděkovala svému konzultantovi diplomové práce RNDr. Pavlu Řehulkovi, Ph.D. z Katedry molekulární patologie a biologie fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové za jeho odborné vedení při zpracování této diplomové práce. Jeho nadšení pro proteomickou analýzu podnítilo můj zájem o problematiku a jeho odborné rady mi byli neocenitelnou pomocí. Věřím, že zkušenosti získané pod jeho vedením najdou uplatnění v mém dalším profesním životě. Dále bych chtěla poděkovat vedoucí této práce, prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D., za vedení a realizaci této diplomové práce. Další dík patří mému konzultantovi Mgr. Rudolfu Kupčikovi za cenné rady a pomoc při některých experimentech a vyhodnocování výsledků. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému příteli Bc. Martinu Lelkovi, který nám byl cennou pomocí v otázkách organické chemie. Děkuji i své rodině a blízkým za velkou podporu při mé cestě za vzděláním.

ANOTACE

Předložená diplomová práce se zabývá technikami úpravy proteomického vzorku pro snadnější interpretaci tandemových hmotnostních spekter za účelem *de novo* sekvenace proteinů. V experimentální části byly provedeny modifikační reakce tryptických peptidů myoglobinu. Na stacionární fázi v kolonce (s následující separací) byly provedeny reakce s O-methylisomočovinou a 4-sulfofenylisothiokyanátem, dále dimethylace formaldehydem (lehkým a deuterovaným). V roztoku byla provedena reakce s 4-chlorosulfofenylisothiokyanátem a esterifikace peptidických karboxylů ethanolem. Jako efektivní metody se ukázaly být oba typy modifikačních reakcí prováděných na kolonce. Modifikace O-methylisomočovinou a 4-sulfofenylisothiokyanátem poskytovala přehledná fragmentační spektra obsahující γ -ionty, což spolu s protokolem pro aplikaci obohacení peptidů obsahujících sulfonové skupiny usnadňuje hmotnostně spektrometrickou analýzu složitějších směsí. Podobně dimethylace peptidů pomocí formaldehydu po jejich předchozí guanidylaci umožnila identifikovat N-terminální ionty pomocí dvojic píků s konstantním rozdílem a usadnit tak interpretaci MS/MS spekter peptidů.

KLÍČOVÁ SLOVA

De novo sekvenace, chemická derivatizace, hmotnostní spektrometrie, MALDI-TOF/TOF MS

TITLE

Chemical derivatization of proteins and peptides to facilitate their *de novo* sequencing

ANOTATION

Presented diploma thesis deals with sample modification techniques for facilitated interpretation of tandem mass spectra during *de novo* sequencing of proteins. In the experimental part, the modification reactions of tryptic peptides from equine myoglobin were carried out. Modification with O-methylisourea hemisulfate, sodium 4-sulfofenylisothiocyanate and dimethylation with light and heavy formaldehyde were carried out on the stationary phase inside a chromatography column with the optional following separation of modified peptides. Modifications with 4-chlorosulfofenylisocyanate and esterification of peptide carboxyl groups with ethanol were carried out on the stationary phase dispensed in solution. Modification with

O-methylisourea hemisulfate and sodium 4-sulfophenylisothiocyanate yielded with MS/MS spectrum only with γ -ions, which facilitates mass spectrometry analysis of more complex samples especially in combination with a protocol for enrichment of peptides containing sulfonic group. Similarly, peptide dimethylation with formaldehyde after preceding guanidylation reaction, enabled also identification of N-terminal ions due to the presences of peak pairs showing a constant difference and thus facilitated interpretation of MS/MS spectrum of fragmented peptides.

KEY WORDS

De novo sequencing, chemical derivatization, mass spectrometry, MALDI-TOF/TOF MS

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	13
1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	14
2 TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 Proteiny	15
2.1.1 Aminokyseliny	15
2.1.2 Jednotlivé konformace	16
2.2 Proteomika	17
2.2.1 Příprava vzorků pro proteomickou analýzu	18
2.3 Hmotnostní spektrometrie	21
2.3.1. Ionizační techniky	21
2.3.2. Analyzátory	22
2.3.3. Detektory	24
2.3.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie v proteomice	24
2.4 De novo sekvenace	27
2.4.1 Edmanova degradace	27
2.4.2 Sekvenace pomocí MS/MS analýzy	28
2.5 Techniky přípravy peptidových vzorků pro usnadnění de novo sekvanace peptidů	30
3 Experimentální část	39
3.1 Technické a laboratorní vybavení, chemikálie a software	39
3.1.1 Technické vybavení	39
3.1.2 Laboratorní vybavení	39
3.1.3 Použité chemikálie	40
3.1.4 Software	41
3.2 Příprava modelového vzorku tryptických peptidů myoglobinu	41
3.2.1 Tryptické štěpení myoglobinu za přítomnosti deoxycholátu sodného	41

3.2.2 Purifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí extrakce na pevné fázi.	42
3.3 Purifikace a separace tryptických peptidů myoglobinu na stacionární fázi.....	43
3.3.1 Příprava kolonek pro purifikaci a separaci peptidů	43
3.3.2 Purifikace a separace tryptických peptidů myoglobinu na reverzní fázi pomocí kolonky a mikrogradientu	44
3.4 Modifikační reakce	45
3.4.1 Guanidylace tryptických peptidů myoglobinu na stacionární fázi v kolonce	45
3.4.2 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v kolonce	46
3.4.3 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu guanidylací a následně pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v kolonce	47
3.4.4 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí 4-chlorosulfofenylisokyanátu v roztoku	48
3.4.5 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu guanidylací a následně sulfonací pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v roztoku.....	49
3.4.6 Dimethylace tryptických peptidů myoglobinu za použití lehkého a těžkého formaldehydu značeného deuteriem na stacionární fázi v kolonce	51
3.4.7 Esterifikace tryptických peptidů myoglobinu v roztoku.....	52
3.5 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly	52
3.5.1 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na TiO ₂ částicích ve zkumavce	52
3.5.2 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na PolyWAX LP stacionární fázi v kolonce	53
4 Výsledky a diskuze	55
4.1 Příprava modelového vzorku tryptických peptidů myoglobinu	56
4.2 Purifikace a separace peptidů na stacionární fázi	58
4.2.1 Výroba mikrokolonky	58
4.2.2 Výběr stacionární fáze	59
4.3 Modifikační reakce	59

4.3.1 Guanidylace tryptických peptidů myoglobinu na kolonce	60
4.3.2 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v kolonce	63
4.3.3 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu guanidylací a následně pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v kolonce	63
4.3.4 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí 4-chlorosulfofenylisokyanátu v roztoku	67
4.3.5 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu guanidylací a následně sulfonací pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v roztoku.....	68
4.3.6 Dimethylace tryptických peptidů myoglobinu za použití lehkého a těžkého formaldehydu značeného deuteriem na stacionární fázi v kolonce	72
4.3.7 Esterifikace tryptických peptidů myoglobinu v roztoku.....	75
4.4 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly	77
4.4.1 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na TiO ₂ částicích ve zkumavce	77
4.4.2 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na PolyWAX LP stacionární fázi v kolonce	81
ZÁVĚR	83
SEZNAM ZDROJŮ	86
PŘÍLOHY	92
Příloha 1. Přehled teoretických peptidů trypticky naštěpeného myoglobinu	92

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

- ACN – acetonitril
- CID – kolizně indukovaná disociace
- Da – dalton
- DOCS – deoxycholát sodný
- ECD – disociace záchytem elektronu
- EDC – N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
- ESI – ionizace elektrosprejem
- ETD – disociace přenosem elektronu
- ExD – souhrnný název pro ECD a ETD disociační techniky
- HPLC-MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
- CHCA – α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
- MALDI – ionizace laserem za účasti matrice
- MS/MS (také MS²) – tandemová hmotnostní spektrometrie do druhé úrovně
- MudPIT – multidimenzionální proteinová identifikační technologie
- Nic-NHS – nikotinyln-N-hydroxysukcinimid
- OMIMHS – O-methylisomočovina hemisulfát
- PAGE – polyakrylamidová elektroforéza
- pI – izoelektrický bod
- PITC - fenylisothikyanát
- PSD – post-source decay
- PVDF - polyvinylidendifluorid
- QqQ – trojitý kvadrupól
- QTOF – kvadrupól spojený s analyzátozem doby letu
- SPC – 4-chlorosulfofenylisokyanát
- SDS – dodecylsulfát sodný
- SPE – extrakce na pevné fázi
- SPITC – 4-sulfofenylisothiokyanát
- sulfo-NHS-biotin – sulfo-H-hydroxysukcinimid-biotin
- TEA – triethylamin
- TFA – kyselina trifluoroctová
- TOF – analyzátozem doby letu

UV – ultrafialové záření

<Ru>CO – bis(terpyridin) ruthenium (II)

ÚVOD

Proteomika a veškeré zkoumání související s proteiny má v dnešní době čím dál větší pozornost. Je zde stále co objevovat, jelikož proteiny jsou obecně velmi složité a komplexní molekuly. Ačkoliv lidský genom obsahuje něco přes 20 000 kódujících sekvencí, odhaduje se, že by v lidském organismu mohly být statisíce až miliony proteinů (někdy nazývaných proteinových isoform) a peptidů. Tato skutečnost je dána hlavně posttranslačními modifikacemi.

Zkoumání proteinů je důležité pro pochopení jejich funkcí a rolí v organismu. Pokud víme, jak protein správně funguje, lze snáze odhalit patologické pochody a tím zahájit účinnou léčbu či prevenci těchto patologických pochodů.

Proto, abychom pochopili složitost proteinů, musíme jít až k základním kamenům – aminokyselinám. Tyto stavební kameny jsou páteří každého proteinu, stejně jako jednotlivé báze pro DNA. Pořadí těchto aminokyselin (tj. primární struktura) pak určuje následnou sekundární a terciární uspořádání.

V dnešní době existuje již spousta způsobů, jak určit pořadí aminokyselin v proteinu. Díky rozvoji hmotnostní spektrometrie a objevu jemných ionizačních metod je možné provádět *de novo* sekvenování proteinů i pomocí těchto instrumentálních technik. A o metodách přípravy vzorku pro usnadnění interpretace hmotnostně-spektrometrických dat pro *de novo* sekvenaci peptidů a proteinů pojednává tato diplomová práce.

1 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce je podat teoretickou rešerši o proteomické analýze, hmotnostně-spektrometrických technikách pro analýzu peptidů a proteinů, *de novo* sekvenaci peptidů a jejích metodách používaných pro usnadnění analýzy aminokyselinové sekvence.

Experimentální část má za cíl ověřit vybrané metody derivatizace peptidů a převést je do kolonkového uspořádání, kdy jsou peptidy zachyceny na stacionární fázi v kolonce a podrobeny derivatizační reakci. Použití kolonek s reverzní stacionární fází má výhodu v menší spotřebě vzorku, reakčních činidel a ve snadném odstranění činidel pouhým propláchnutím kolonky. Peptidy lze z kolonky s výhodou eluovat elučním činidlem vhodným pro hmotnostně-spektrometrickou analýzu a lze je z kolonky separovat pomocí mikrogradientového zařízení.

Pro tyto metody byl vybrán jako standardní vzorek myoglobin, který bude podroben tryptickému štěpení. Tryptické peptidy budou purifikovány a separovány na kapilárních kolonkách s reverzní fází pomocí mikrogradientového zařízení. Dále budou derivatizovány pomocí vybraných činidel s následnou separací a hmotnostně-spektrometrickou analýzou. Jednotlivé metody budou optimalizovány a získaná data interpretována v diskuzi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Proteiny

Proteiny jsou organické makromolekuly, skládající se z aminokyselin a mající molekulovou hmotnost v řádech tisíců Da a více. Hlavními prvky jsou uhlík, vodík, dusík, kyslík, síra, a dále pak např. fosfor. Proteiny jsou důležitou složkou každého organismu, nacházejí se jak v nejprimitivnějších organismech (např. prokaryota), ale i v těch nejsložitějších organismech, jako jsou savci, včetně člověka. V buňce zaujímají přibližně 50 % sušiny. Mají široké spektrum funkcí a dělíme je na strukturální, zásobní, transportní, hormonální, receptorové, kontraktilní, obranné a enzymatické proteiny. Jsou složeny z jednotlivých aminokyselin v definovaném pořadí, a toto pořadí je klíčovým faktorem pro sekundární, terciární a kvartérní strukturu proteinu. Proteiny mohou být dále modifikovány mnoha různými molekulami (sacharidy, kyselina fosforečná aj.) a tím se opět výrazným způsobem mění funkce daného proteinu [1].

2.1.1 Aminokyseliny

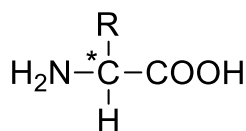
Aminokyseliny jsou základním stavebním kamenem každého proteinu. V lidském organismu je rozlišováno 20 základních L-aminokyselin (*Tabulka 1*), z toho 8 je pro člověka esenciálních, které si lidské tělo nedokáže samo syntetizovat, a proto musí být přijímány v potravě [2].

Tabulka 1. Jednotlivé aminokyseliny, jejich zkratky a monoizotopické molekulové hmotnosti aminokyselinových zbytků [2, 3].

Název aminokyseliny	Zkratky	Monoizotopická hmotnost aminokyselinového zbytku [Da]	Název aminokyseliny	Zkratky	Monoizotopická hmotnost aminokyselinového zbytku [Da]
Glycin	Gly G	57,0215	Lysin*	Lys K	128,0950
Alanin	Ala A	71,0371	Serin	Ser S	87,0320
Valin*	Val V	99,0684	Threonin*	Thr T	101,0477
Leucin*	Leu L	113,0841	Methionin*	Met M	131,0405
Isoleucin*	Ile I	113,0841	Cystein	Cys C	103,0092
Kyselina asparagová	Asp D	115,0269	Fenylalanin*	Phe F	147,0684
Asparagin	Asn N	114,0426	Histidin	His H	137,0589
Kyselina glutamová	Glu E	129,0426	Tyrosin	Tyr Y	163,0633
Glutamin	Gln Q	128,0686	Tryptofan*	Trp W	186,0633
Arginin	Arg R	156,1011	Prolin	Pro P	97,0528

*Esenciální aminokyselina

Každá L-aminokyselina má společné základní složení – centrální uhlík (α uhlík), na kterém je navázána karboxylová skupina a aminoskupina. To, co odlišuje jednotlivé aminokyseliny je postranní řetězec navázaný na centrálním uhlíku; čtvrtá vazba pak náleží vodíku (*Obrázek 1*). Centrální uhlík je tedy chirální (jedinou výjimkou je glycin) [1].



Obrázek 1. Obecný vzorec aminokyseliny [1].

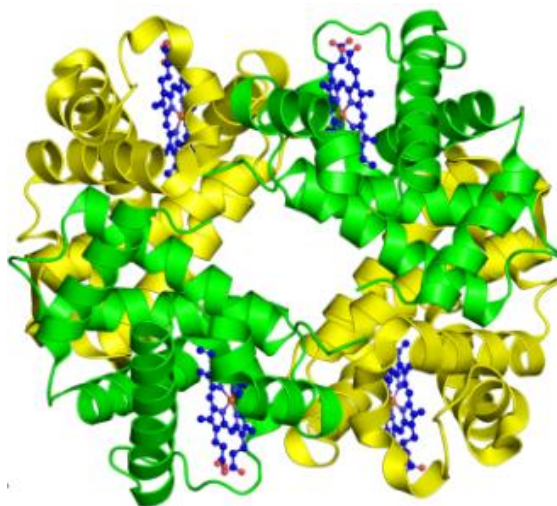
Přítomnost kyselých a bazických funkčních skupin v aminokyselinách dává proteinům důležitou vlastnost nést náboj. Hodnota pH, při které protein má celkově neutrální náboj, se nazývá *izoelektrický bod* (pI) proteinu a je značně ovlivňován složením bočních řetězců (např. kyselina asparagová či arginin). Pokud se protein dostane do prostředí, kdy pH prostředí = pI proteinu, přestane se v případě působení elektrického pole pohybovat [2].

2.1.2 Jednotlivé konformace

Každý protein od samotné syntézy prochází složitou cestou, aby z něj nakonec byla funkční molekula. Nejprve v ribozomech dochází ke spojování jednotlivých aminokyselin v řetězec a vzniká tak primární struktura. Ke spojování dochází kondenzační reakcí za odštěpení vody. Primární struktura je hlavním zájmem *de novo* sekvenace, kdy je zjišťováno pořadí aminokyselin v proteinu [4].

Uspořádání jednotlivých aminokyselin není náhodné. Tato informace je zakódována v DNA organismu, ze které je přepsána do mRNA při transkripci. Následně se mRNA spojí s ribozomy, kde se syntetizuje protein. To, jak aminokyseliny jdou po sobě, je zakódováno v pořadí bází mRNA, kdy každé tři báze (triplet neboli kodon) určují, jaká aminokyselina je navázána. Navázání aminokyseliny se uskutečňuje pomocí tRNA, která ji jedním koncem vyhledá v cytoplasmě a na druhém konci má antikodon komplementární s kodonem na mRNA. Tento proces se nazývá *translace*. Spousta proteinů však potřebuje pro svou funkčnost ještě další úpravy. Tyto děje jsou nazývány *posttranslační modifikace*. Modifikace může být uskutečněna odštěpením konců peptidů (proteolytická aktivita), modifikací N a C konců, hydroxylací, připojením jiných skupin jako je fosfát či sacharid (fosforylace, glykosylace, ubiquitinace či acetylace), nebo oxidací thiolových skupin. Důvodem pro tyto děje může být zvýšení stability výsledného proteinu, mohou složit pro regulaci metabolismu či obranné mechanismy apod. [4–6].

Následně dochází k torbě 3D struktury proteinu, která zajistí jeho vyšší stabilitu a funkčnost. Jako první se tvoří sekundární konformace. Zde jsou rozlišovány dvě struktury a to α -šroubovici a β -skládaný list. Dále je protein sbalován do složitější struktury terciární konformace, kde hrají roli interakce aminokyselinových zbytků pomocí disulfidických můstků, elektrostatických či van der Waalsových interakcí, hydrofobicitě a také pomocí vodíkových můstcích mezi bočními řetězci aminokyselinových zbytků. Poslední úpravou je spojování více proteinů v jeden celek, zde hrají roli stejné interakce jako u terciární struktury. Tato struktura je nazývána kvartérní a zajišťuje, že protein je již ve své funkční podobě. *Obrázek 2* ukazuje kvartérní strukturu lidského hemoglobinu, skládající se ze 4 podjednotek a každá podjednotka obsahuje navíc hemovou skupinu [4].



Obrázek 2. Kvartérní struktura lidského hemoglobinu [7].

2.2 Proteomika

Soubor všech proteinů přítomných v organismu se nazývá *proteom* a je výsledkem procesu genové exprese daného organismu. *Proteomika* je pak vědní obor, který se zabývá studiem proteomu. V praxi se pak jedná především o identifikaci proteinů, jejich funkcí a množství v daném místě a čase. Znat pouze gen daného proteinu totiž nestačí. Protein prochází mnoha úpravami a nelze určit, kdy a jaká funkční molekula proteinu bude v jaké formě a kvantitě syntetizována, kde bude lokalizována a jaká bude její úloha. Spousta proteinů může mít stejnou sekvenci aminokyselin, ale následnou úpravou může vzniknout více *izoforem*. Tímto procesem vzniká mnohonásobně větší množství proteinů, než je kódujících genů [8, 9].

Výzkum proteomiky byl odstartován díky vývoji nových metod, které umožňovaly jednodušší, rychlejší, a hlavně hromadnou analýzu. Především to bylo vyvinutí měkkých

ionizačních metod ve hmotnostní spektrometrii, které zachovávají celistvost molekuly při ionizaci. Další metody, které posunuly výzkum dopředu, jsou 2D gelová elektroforéza, separační techniky a vzhledem k velkému množství dat také bioinformatika. Více o jednotlivých metodách bude pojednáno v kapitole 2.2.1 [10].

Přístup k proteomické analýze se liší dle toho, jakou informaci chceme získat. Jednotlivé přístupy pak z celého oboru vyčleňují analytickou, strukturní, funkční, diferenční, high-throughput, high-coverage, bottom-up, shotgun a top-down proteomiku. Podrobnější informace lze nalézt např. v článku Proteomický průvodce, Chmelík, 2006 [8].

Cílem proteomiky je mimo jiné zjištění, jak jednotlivé proteiny fungují, jakou mají roli v organismu a jak vzájemně interagují, v jaké míře jsou syntetizovány a má-li to vztah k určitému biologickému procesu. Tyto informace pomáhají nejen zjistit, jak tyto procesy probíhají fyziologicky, ale lze od toho odvodit, jak bude vypadat patologický proces, jaký protein bude exprimován při chorobných stavech nebo co znamená jeho absence [8, 10].

2.2.1 Příprava vzorků pro proteomickou analýzu

Primární zpracování

Ve většině případů začíná analýza získáním určité tkáně nebo jiné formy biologického vzorku, který má být podroben proteomické analýze. Podle toho, jaké proteiny či peptidy jsou hledány, je buď rozrušena buněčná stěna (u bakterií či rostlin) a cytoplasmatická membrána (pokud je cílem zájmu proteiny v cytosolu) či také buněčné organely (pokud je cílem obsah těchto organel, či celkový proteom buňky). Pro homogenizaci tkáně je používáno např. třepání se skleněnými kuličkami, ultrazvuk či tekutý dusík. Následně jsou buňky lyzovány pomocí vhodného detergentu, popř. přidavkem močoviny nebo jiných látek. Jsou používány také fyzikální metody lýzy – ultrazvuk, osmotický šok, kombinace mrazení a rozmrazování či roztření tloučkem v třecí misce. Metody jsou také vybírány dle toho, je-li zapotřebí analyzovat protein v nativní konformaci či nikoliv [11].

Odstranění nízkomolekulárních látek

Po homogenizaci vzorku je získána velmi složitá směs látek různé povahy a různé molekulové hmotnosti. Nejčastějším způsobem, jak oddělit vysokomolekulární látky (proteiny) od nízkomolekulárních (sole, oligosacharidy, lipidy aj.) je pomocí dialýzy, precipitace nebo lze použít membránový filtr, například s cutoff 10 kDa, kdy by molekuly větší jak 10 kDa neměly membránou projít [12].

Afinitní chromatografie

Po získání frakce s vysokomolekulárními látkami je někdy vhodné zařadit afinitní chromatografii, abychom si obohatili složku proteinů, na kterou je zaměřena pozornost (fosfoproteiny, glykoproteiny aj.), nebo pro odstranění abundantních proteinů ze vzorku (typicky ze séra nebo plasmy). Může být zařazena buď před samotnou 2D elektroforézu (kapitola Gelová elektroforéza) nebo před multidimenzionální kapalinovou chromatografií (MudPIT – Multidimensional Protein Identification Technology). Princip dělení je založen na afinitě požadovaného proteinu k ligandu navázaném na stacionární fázi [13].

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří k základním metodám klasické proteomiky. Pokud není vzorek velice komplexní, lze jej s výhodou analyzovat pomocí SDS-PAGE; komplexnější vzorky jsou pak separovány pomocí 2D gelové elektroforézy [11, 13].

SDS-PAGE, neboli polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) s dodecylsulfátem sodným (SDS) je založena na dělení molekul podle elektroforetické mobility komplexů proteinů s SDS v prostředí polyakrylamidové gelové matrice. Tato elektroforetická mobilita koreluje s velikostí a tím pádem molekulovou hmotností proteinů, a tak se tato technika používá k přibližnému stanovení molekulové hmotnosti podle elektroforetické mobility standardů o známe molekulové hmotnosti. Vzorek proteinů je před samotným dělením v gelu smíchán (a následně zahřát na vysokou teplotu) s pufrům obsahujícím SDS, v jehož důsledku vzniknou komplexy s celkovým záporným nábojem, které pak migrují gelovou maticí směrem k anodě. V určitých případech lze provádět PAGE za nativních podmínek (bez detergentu SDS a bez přísady redukcí činidel) [11, 12].

2D elektroforéza zahrnuje dva kroky. Prvním krokem je izoelektrická fokusace. Dělení vzorku obvykle probíhá v pH gradientu na komerčně dodávaném gelovém proužku a proteiny se dělí na základě rozdílných izoelektrických bodů. V druhém kroku je tento proužek ekvilibrován s pufrům obsahujícím SDS, přiložen k polyakrylamidovému gelu a následně probíhá PAGE ve směru kolmém na směr prvního dělení. Je tak získána proteinová mapa na gelu [11, 13–15].

Digestce proteinů

Primárním důvodem pro štěpení proteinů na peptidy je jednodušší práce s peptidy jak z hlediska separace (např. kapalinovou chromatografií), tak z pohledu analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie (snazší ionizace, analýza v hmotnostních analyzátoch, citlivější

detekce apod.) V případě gelové elektroforézy se naopak snáze separují intaktní proteiny, které se však samotné špatně eluují z gelu a pro jejich identifikaci nestačí zjištěné parametry z 2D gelové elektroforézy (molekulová hmotnost, pI). Proto je i zde protein v gelu naštěpený na jednotlivé peptidové fragmenty, ze kterých lze v hmotnostním spektrometru získat takzvaný proteinový *fingerprint* (neboli otisk prstu), díky kterému je možné provést jeho identifikaci pomocí databázového vyhledávání. Digescce proteinů spočívá ve specifickém štěpení proteinu na jednotlivé peptidy nejčastěji za pomoci enzymu, lze ale použít i jiné chemické látky [9, 14, 16].

Nejčastěji používaným enzymem pro digesci je trypsin. Tato proteáza je poměrně specifická, štěpí proteiny za lysinem či argininem, které jsou v proteinu frekventované (přibližně každá 10 aminokyselina). Tím jsou získány peptidy o molekulové velikosti vhodné pro analýzu na hmotnostním spektrometru. Digescce často probíhá za přítomnosti vhodného detergentu, např. deoxycholátu sodného, ovšem pouze do koncentrace, kdy aktivita enzymu není výrazně snížena. Tyto detergenty mohou snižovat ionizaci v hmotnostním spektrometru, proto je obvykle nutné tyto detergenty následně odstranit, například vysrážením, extrakcí nebo chromatograficky. Štěpení proteinů lze obecně provádět v roztoku, v gelu nebo na také kolonce s imobilizovaným enzymem [17].

Příprava vzorku pro hmotnostní spektrometrii

Pokud je jakýkoliv vzorek měřen na hmotnostním spektrometru, je zapotřebí již od samého začátku zvážit způsob zpracování vzorku. Při zpracování vzorku je vše prováděno v rukavicích, aby vzorek nebyl kontaminován keratinem z pokožky. Veškeré reagenty musí být vysoké čistoty, nejlépe HPLC-MS grade. Hmotnostní spektrometrie je klíčová pro proteomickou analýzu. Dává navíc specifickou informaci o hmotnosti analytu (na rozdíl od UV detekce), v případě tandemové hmotnostní spektrometrie i část informace o struktuře. Tato metoda je velmi citlivá. Citlivost je však podmíněna správnou přípravou vzorku, především s ohledem na jeho čistotu od látek rušících separaci a ionizaci peptidů.

Před aplikací vzorku do hmotnostního spektrometru je vhodné zařadit purifikaci pro zvýšení čistoty vzorku, což zajistí lepší citlivost měření. K tomuto účelu je využívána *purifikace na pevné fázi* (SPE – *solid phase extraction*), kdy je podstatná část nežádoucích látek a příměsí odstraněna a vzorek je převeden do vhodného roztoku pro analýzu v hmotnostním spektrometru. Nejčastěji purifikace probíhá na stacionární fázi C₁₈, kde se uplatňují hydrofobní interakce, dále je však využíváno normálních či iontově výměnných stacionárních fází.

Stacionární fáze může být zakotvena v SPE kolonkách či v pipetovacích špičkách přizpůsobených k této metodě. Principem použití SPE kolonky je obvykle nastavení podmínek tak, aby byl analyt zachycen na stacionární fázi a aby se kontaminanty odplavily v co největší míře při promývání stacionární fáze. Vhodně zvoleným elučním činidlem je poté analyt vyeluován ze stacionární fáze a dále analyzován na hmotnostním spektrometru [18, 19].

2.3 Hmotnostní spektrometrie

Jednou z široce aplikovaných metod se stala *hmotnostní spektrometrie*. Díky jejímu objevu se analytická chemie a další obory posunuly o velký krok kupředu. Touto metodou je určována hodnota poměru hmotnosti molekuly a jejího náboje uděleného při ionizaci analytu (zkráceně m/z hodnota). Existuje množství upořádání a typů hmotnostních spektrometrů, ale princip mají společný. Analyt je pomocí iontového zdroje převeden na nabitou molekulu, přičemž někdy při tomto procesu dojde k částečné fragmentaci. Nabité částice jsou poté převedeny do analyzátoru, kde jsou rozděleny na základě rozdílných m/z hodnot a následně detekovány na detektoru [20].

Klíčovým prvkem pro aplikaci hmotnostní spektrometrie v proteomické analýze byl rozvoj jemných ionizačních technik, především *elektrosprejové ionizace* (ESI – *electrospray ionisation*) a *ionizace laserem za účasti matrice* (MALDI – *matrix asisted laser desorption ionisation*). Jemné ionizační techniky mají tu výhodu v tom, že nedochází k fragmentaci molekulárního iontu a lze tak poměrně přesně zjistit jejich skutečnou molekulovou hmotnost. Nevýhodou těchto jemných ionizačních metod je absence knihovny spekter, jako tomu je u elektronové ionizace [21].

2.3.1. Ionizační techniky

Prvním krokem v hmotnostně-spektrometrické analýze je tvorba iontů. Úspěšnost tvorby iontů souvisí pak s citlivostí měření a dalšími možnostmi hmotnostně-spektrometrické analýzy.

Ionizace elektrosprejem

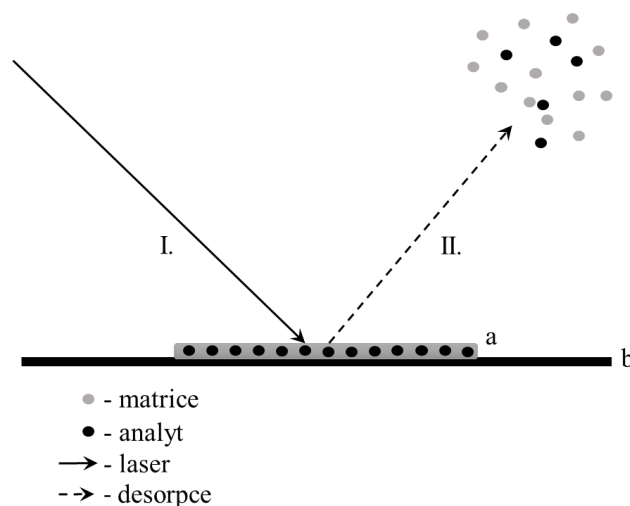
Ionizace pomocí elektrospreje (ESI – *Electrospray ionisation*) je široce používaná jemná metoda pro ionizaci molekul s vysokou molekulovou hmotností, v řádech až několika stovek kDa. Principem je sprejování analytu pomocí kapiláry, na jejíž špičku je vloženo elektrické napětí. Toto uspořádání způsobuje tvorbu nabitých kapiček, které se po smísení s inertním plynem začnou vypařovat. Povrchový náboj kapky je tím zvyšován do té doby, než je překročen takzvaný *Rayleighův limit* a dojde ke Coulombické explozi, při které je kapka rozdělena na

menší kapky. Tento proces je opakován do té doby, dokud není z kapky uvolněna samotná ionizovaná molekula, která poté putuje do analyzátoru. Molekuly jsou často vícekrát nabitě, kladný nebo záporný náboj iontů je určen napětím vloženém na kapiláru. Tato metoda byla poprvé publikována roku 1984 autory M. Yamashita a J.B. Fenn. Znamenalo to revoluci v online spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem [21, 22].

Ionizace laserem za účasti matrice

Při ionizaci laserem za účasti matrice (MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) je analyt nanášen na kovovou desku a smísen s matricí, nejčastěji se slabou organickou kyselinou, která je v nadbytku vůči analytu. Ionizace obvykle probíhá ve vakuu, kdy krátký laserový puls udeří do směsi analyt-matrice. Matrice má zde za úkol absorbovat většinu energie z laseru tak, aby nebyl analyt laserem fragmentován, a dojde k jejímu vypaření spolu s analytem. Matrice se zároveň chová jako donor nebo akceptor protonu a způsobuje tak pozitivní nebo negativní ionizaci molekuly analytu, nejčastěji jednou nabitě. Tato metoda byla poprvé představena týmem M. Karas a F. Hillenkamp roku 1988. Podobně jako ESI, tak i zde lze analyzovat molekuly v řádu až několika stovek kDa.

Obrázek 3 ukazuje princip ionizace laserem za účasti matrice [23, 24].



Obrázek 3. Princip ionizace laserem za účasti matrice (I. Laser udeří do směsi matrice-analyt (a) na kovové desce (b); II. Analyt je desorbován spolu s matricí přítomnou v nadbytku) [25].

2.3.2. Analyzátorů

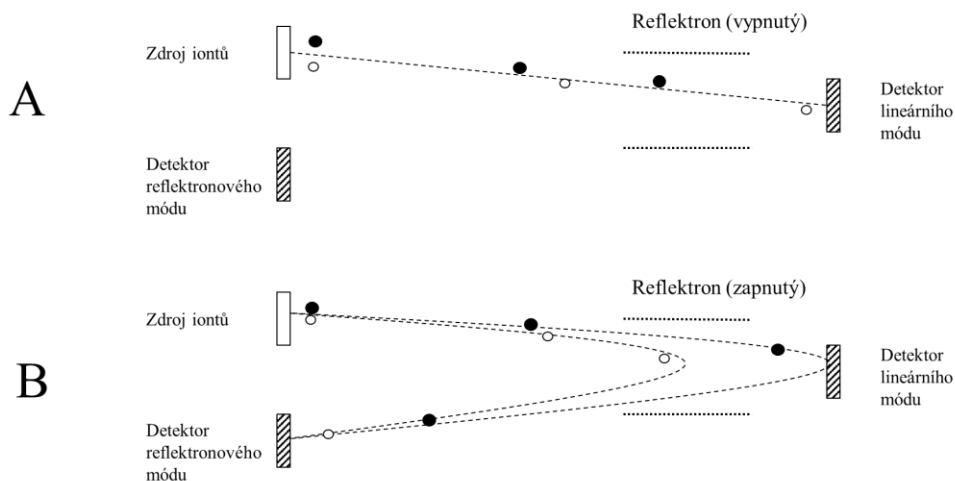
Úkol hmotnostních analyzátorů je měřit některé fyzikální veličiny za konstantních nebo měnících se parametrů elektrického a/nebo magnetického pole za účelem měření m/z hodnoty vytvořených iontů.

Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor (kvadrupól) je složen ze čtyř paralelně uspořádaných kovových tyčí, na které je vkládáno napětí složené z konstantního stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. V jednom časovém okamžiku je na jeden pár protilehlých tyčí vloženo kladné konstantní napětí a na druhý pár záporné konstantní napětí, přičemž je toto napětí v průběhu času střídáno. U střídavého napětí je postupně měněna frekvence. Toto alternující elektrické pole způsobí, že vstupující ionty začnou oscilovat mezi tyčemi, a jen ty, které při dané frekvenci mají stabilní oscilace, projdou kvadrupólem až na detektor. Střídáním frekvence je tedy postupně skenován zvolený rozsah hodnot m/z . Tento analyzátor sám vykazuje nízké rozlišení při měření m/z hodnot. Proto je často používán jako filtr nebo vodič iontů, spojován s více kvadrupóly (trojitý kvadrupól – QqQ) nebo s jinými analyzátory, například s analyzátorem doby letu (QTOF) či iontovou pastí [26].

Analyzátor doby letu

V *analyzátoru doby letu (TOF – time-of-flight)* jsou ionty děleny podle jejich rychlosti ve vakuové trubici, tj. podle doby jejich letu k detektoru. Ionty jsou na počátku urychleny pulsem elektrického pole a dostávají tak kinetickou energii, která se projeví v různé rychlosti iontů, jež je nepřímo úměrná jejich m/z hodnotě. Malé ionty (o nižší m/z hodnotě) mají větší rychlost než ionty o větší m/z hodnotě, a proto dopadnou na detektor dříve. Existují dvě uspořádání analyzátoru, a to lineární TOF a TOF s reflektorem. Lineární mód slouží pro přibližné určení molekulové hmotnosti, postrádá potřebné rozlišení, lze jimi sledovat velké ionty, jako jsou proteiny o velikosti několika desítek kDa. Reflektrom slouží pro vyrovnání vnitřních kinetických energií molekul se stejnou m/z , díky čemuž následně dopadají na detektor ve stejný čas a pík je tak ostřejší. Zároveň slouží jako iontové zrcadlo obracející trajektorii letících částic, čímž prodlouží délku analyzátoru. Často je také používána zpožděná extrakce iontů, která na několik set nanosekund pozdrží ionty před vstupem do analyzátoru a tím je spolu s vhodným uspořádáním urychlovacích napětí v iontovém zdroji dosaženo vyššího rozlišení analýzy. *Obrázek 4* znázorňuje schéma TOF analyzátoru v lineárním módu a s reflektorem [27].



Obrázek 4. Analyzátor doby letu v lineárním módu (A) a v módu s reflektroem (B) [20].

Orbitrap

Orbitrap je složen ze tří elektrod: vnější, centrální a koncové. Na centrální a vnější elektrodu je vloženo napětí, což vytvoří elektrické pole lineární s osou analyzátoru udávající iontům harmonické oscilace. Ionty často nejprve projdou jinými analyzátorů pro lepší selekci požadované m/z (kvadrupól, iontová past) a až poté jsou vpuštěny mezi vnější a vnitřní elektrodu *Orbitrapu* pomocí tzv. C-pasti. Ionty získají následně tři typy oscilací. První jsou oscilace podél centrální elektrody, dále jsou zde oscilace okolo této elektrody a poslední sledovanou veličinou je poloměr kruhové (elipsovité) trajektorie neboli vzdálenost iontu od centrální elektrody. Pro určení m/z je sledována oscilace podél elektrody, je měřena doba, za jakou iont urazí vzdálenost od jednoho konce elektrody k druhému [28].

2.3.3. Detektory

Detektor je posledním oddílem každého hmotnostního spektrometru. *Orbitrap* a iontová cyklotronová rezonance s Furierovou transformací nevyžadují samostatný detektor, samotný analyzátor slouží také k detekci iontů. Mezi nejčastěji používané detektory se řadí elektronové násobiče, fotonásobiče a mnoho dalších. Podrobnější informace o detektorech v hmotnostní spektrometrii lze najít v článku autorů James H. Barnes IV, Gary M. Hieftje – Recent advances in detector-array technology for mass spectrometry z roku 2004 [29].

2.3.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie v proteomice

Tandemová hmotnostní spektrometrie, zkráceně MS/MS či MS^2 , slouží získání informací o struktuře dané molekuly, která je podrobena fragmentaci, což zde znamená, že dochází ke štěpení vazeb analyzovaných iontů. V proteomice se může jednat o rozštěpení

peptidické vazby, odštěpení neutrálních částí molekuly nebo ztráta vody či amoniaku. Každý fragment má pak svou hodnotu m/z , která nese informaci o struktuře fragmentovaného iontu (tzv. *prekurzoru*). Odečítání rozdílu m/z hodnot mezi jednotlivými fragmentovými ionty, které odpovídají molekulové hmotnosti aminokyselinových zbytků, pomáhá určovat aminokyselinovou sekvenci peptidů. Při *de novo* sekvenaci jsou vyhledávány ve spektru ionty stejného typu a odečítány rozdíly mezi těmito ionty, které jsou následně přiřazeny aminokyselinovým zbytkům a jejichž pořadí ve spektru odpovídá jejich reálné sekvenci [20].

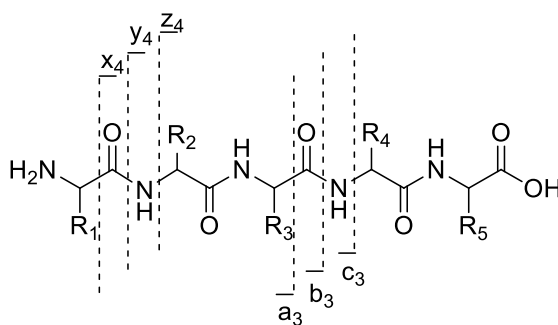
Existuje několik mechanismů fragmentace iontů. Kolizně indukovaná fragmentace (CID – *collision induced dissociation*) patří mezi jedny z nejčastějších metod fragmentace a jejím principem je kolize prekurzoru (primární molekuly) vybraného v první dimenzi měření s molekulami reakčního plynu (například helium, dusík, argon) v kolizní cele a vzniklé fragmentové ionty jsou vpuštěny do dalšího analyzátoru (druhá dimenze), kde je určena jejich m/z . Kolizně indukovaná fragmentace je používána u spektrometrů typu trojitý kvadrupól, QTOF, iontová past nebo TOF/TOF s kolizní celou [10].

Dalším typem fragmentace je *post-source decay* (PSD), kdy vznikají fragmentové ionty již při letu TOF analyzátozem. K rozpadu využitelnému pro fragmentační analýzu dochází ještě v první části letu (před otočkou v reflektoru), kde na ionty nepůsobí žádné pole. Tyto tzv. metastabilní ionty vznikají jako minoritní složka po ionizaci, které však ve spektru z MS módu obvykle nejsou vidět. Nastavením parametrů tzv. iontové brány dochází k výběru prekurzoru, jehož produkty metastabilního rozpadu jsou v TOF analyzátozem měřeny pro výsledné MS/MS spektrum. V některých případech je v určité části analyzátozem odstraňován nadbytek prekurzoru tak, aby na detektor dopadly převážně fragmentové ionty [30, 31].

Jedny z nejnovějších fragmentačních metod se souhrnně nazývají ExD techniky, zahrnující *disociaci záchytem elektronu* (ECD – *electron capture dissociation*) a *disociaci přenosem elektronu* (ETD – *electron transfer dissociation*). Principem je přemístění elektronu o nízké energii na několikanásobně nabitý peptid (obvykle 3 až 6 krát), získaný především ESI ionizací. Elektron je přenesen přímo (ECD) nebo z radikálového aniontu (ETD), což vede k okamžitému radikálovému štěpení aminokyselinového řetězce, mající vliv převážně na vazbu mezi uhlíkem a dusíkem aminokyselinového zbytku. Metoda je komplementární k CID fragmentaci, vznikají zde ionty typu *c*- a *z*- (viz *Obrázek 5*) a je velice vhodná pro sekvenování posttranslačně modifikovaných peptidů [30].

Fragmentové ionty peptidů při MS/MS analýze

Při MS/MS analýze je peptid disociován na jednotlivé fragmenty, kdy jsou štěpeny převážně peptidické vazby nebo vazby sousedící s peptidickou vazbou za vzniku různých fragmentů, například N- nebo C-koncový fragment o několik aminokyselinových zbytků kratší apod. Vznikne tak složitá směs různých typů iontů a různých počtů aminokyselinových zbytků. Místo štěpení je mimo jiné určováno lokalizací náboje, který může být přesměrován do okolí štěpného místa. Jedno z možných vysvětlení tohoto jevu dává *model mobilního protonu*, kdy je potřeba přenosu protonu (protonů) v rámci molekuly pro rozštěpení vazeb. Podle toho, na jakém konci po disociaci peptidu zůstane náboj a vznikne pak příslušný fragmentový iont, jsou rozlišovány různé typy iontů. Nejčastějšími ionty jsou ionty *b*- a *y*-, kdy dochází ke štěpení peptidické vazby; *b*-ionty pocházejí z N-konce a *y*-ionty z C-konce peptidu. Tyto ionty jsou k sobě komplementární, ale ne vždy ve stejné intenzitě z důvodu rozdílné stability nebo rozdílně ionizovatelnosti. Tyto ionty vznikají převážně při CID nebo PSD fragmentaci. Je-li však použita ECD nebo ETD fragmentace, ve spektrech vidíme převážně *c*-ionty nebo *z*-ionty, vznikající štěpením vazby mezi uhlíkem a dusíkem aminokyselinového zbytku (netýká se to přímo peptidické vazby). Dalšími možnými ionty jsou pak *a*- (vznikající někdy z *b*-iontů odštěpením karboxylové skupiny) nebo *x*-ionty. Souhrnem, ionty pocházející z N-konce peptidu se označují *a*-, *b*- nebo *c*-ionty pocházející z C-konce peptidu se označují *x*-, *y*- a *z*-ionty (Obrázek 5) [30, 32].



Obrázek 5. Schéma štěpení peptidu v tandemové hmotnostní spektrometrii [30].

Při použití ESI ionizace vykazují peptidy z tryptického štěpení s lysinem či argininem na C-konci obvykle náboj 2+, 3+ a 4+, výjimečně pak i vyšší. Pokud např. prekurzor s nábojem 2+ s bazickým lysinem/argininem na C-konci zvolíme pro MS/MS analýzu, ve spektru se zobrazí převážně *y*-ionty, a lze tak snadno odečítat rozdíly *m/z* hodnot mezi jednotlivými píky a přiřazovat je jednotlivým aminokyselinovým zbytkům. Zde se ESI ionizace využívá pro *de novo* sekvenaci peptidů. Při použití MALDI ionizace a následné MS/MS analýzy, jsou ve spektru pozorovány jak *y*-ionty, ale také *b*-ionty, což sice poskytuje větší množství informací,

ale také zvyšuje obtížnost interpretace spekter. V případě některých peptidů (obvykle obsahujících arginin na C-konci) jsou však obvykle ve spektru dominantní pouze *y*-ionty. Nevýhodou pak v případě MALDI zůstává menší kompletnost fragmentačních spekter ve srovnání s ESI [33].

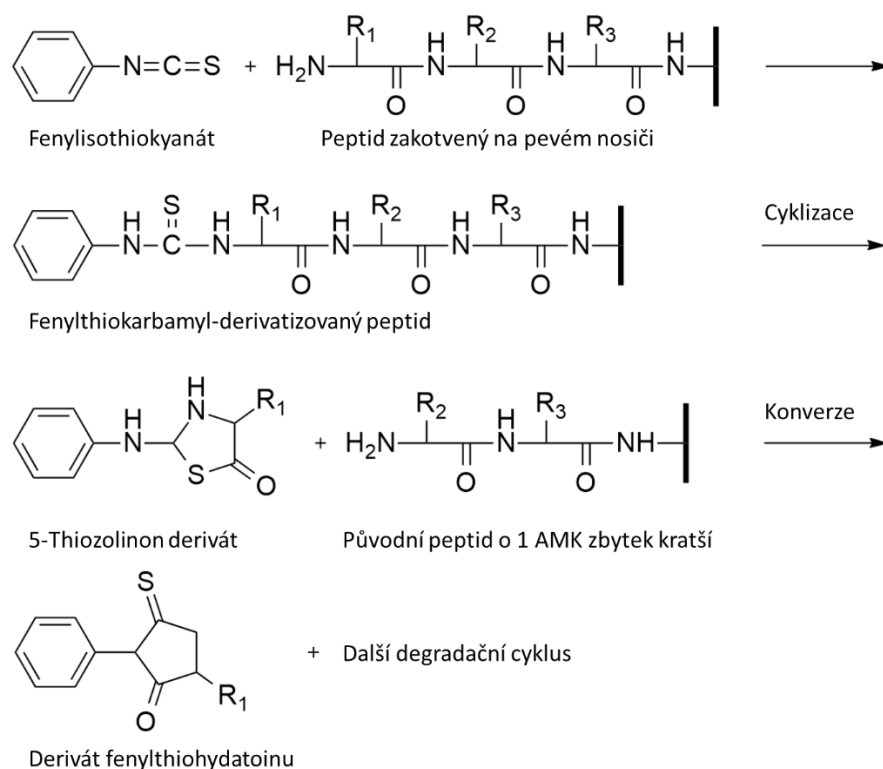
Pokud je analyzován známý vzorek, rozlišit jednotlivé typy iontů není problém díky množství dostupných softwarů pro sekvenční identifikaci iontů. Pokud je však vzorek neznámý peptid, který ještě nebyl osekvenován, rozlišit jednotlivé typy iontů (např. *b*-ionty od *y*-iontů) je obtížné, a někdy nemožné. Pro manuální interpretaci spekter je však možnost odlišit typy iontů velmi užitečná, a proto je možné využívat různé modifikace vzorku před vlastní analýzou, které by tuto informaci o jednotlivých fragmentových iontech poskytly. Pro zjednodušení MALDI-MS/MS spekter byly proto vyvinuty způsoby úpravy vzorku modifikující peptidy tak, aby bylo možné určit typ iontu, případně potlačit zobrazení *b*-iontů ve prospěch *y*-iontů, což pak ve svém důsledku výrazně zjednoduší interpretaci takových spekter [33].

2.4 *De novo* sekvenace

Zjistit aminokyselinovou sekvenci proteinu je důležité pro jeho správnou identifikaci, resp. také pro lokalizaci posttranslační modifikace. Primární sekvence proteinů lze obvykle získat z experimentů genomového sekvenování, jejichž výsledky jsou uloženy ve veřejně dostupných databázích. V některých případech (protein nebyl sekvenován, obsahuje posttranslační modifikaci) však může vzniknout potřeba sekvenace experimentálně izolovaných peptidů. Proto určení primární sekvence je také zjišťováno metodami nevyžadující genomové informace – tzv. *de novo* sekvenace [34].

2.4.1 Edmanova degradace

Již v minulosti byla intenzivní snaha zjistit pořadí aminokyselin, tehdejší metody byly však náročné především na čas, ne příliš citlivé a získané informace obsahovaly sekvenci přibližně 20 aminokyselin. Nejznámější metodou byla Edmanova degradace, jež je na některých místech využívána dodnes. Reakční činidlo fenylisothiokyanát (PITC) je navázáno na N-konec peptidu/proteinu uchyceného kovalentně na pevném nosiči, kde vytvoří cyklus s první aminokyselinou, při čemž je tato aminokyselina odštěpena od peptidového řetězce, který je volný pro další navázání PITC. Jednotlivé aminokyseliny jsou postupně chromatograficky detekovány. *Obrázek 6* znázorňuje schéma Edmanovy degradace [35].



Obrázek 6. Edmanova degradace [36].

2.4.2 Sekvence pomocí MS/MS analýzy

V dnešní době je možné díky hmotnostní spektrometrii zjistit sekvence peptidů (resp. proteinů) rychleji a citlivěji. Díky měkké ionizaci pomocí ESI a MALDI lze snadno identifikovat protein již v MS módu pomocí peptidového mapování, bez nutnosti fragmentace peptidů v MS/MS (za předpokladu existence proteinové sekvence v prohledávané databázi). Jedná se o již zmíněný otisk prstu, kdy jednotlivé hmoty peptidů z enzymaticky naštěpeného proteinu jsou vyhledávacím programem porovnány s vypočtenými teoretickými hmotami peptidů odvozených z proteinů uložených v databázi. Pokud vzorek obsahuje neznámý protein, který nebyl ještě zanesen do elektronické databáze, tak se tímto způsobem nezíská ani identita proteinu, ani informace o jeho primární sekvenci. Pro získání informace o aminokyselinové sekvenci je nutné podrobit jednotlivé peptidy fragmentaci – tandemové hmotnostní spektrometrii. Nejčastěji je pro tandemovou spektrometrii v proteomice využívána ESI a MALDI ionizace spojená s trojitým kvadrupólem, Q-TOF nebo TOF/TOF analyzátozem. Fragmentace peptidových prekurzorů je provedena pomocí kolizně indukované disociace, PSD nebo ExD techniky [33, 37].

Spektra chemicky nemodifikovaného peptidu získána tandemovou hmotnostní spektrometrii jsou obvykle složitá a pro jejich manuální vyhodnocení je zapotřebí zkušeného

pracovníka. Tento způsob vyhodnocení je časově náročný, přistupuje se k němu tehdy, pokud je potřeba vyhodnotit menší množství spekter. Proto je někdy využíváno chemických modifikací peptidů pro usnadnění manuálního vyhodnocení. Druhým přístupem, který je vhodný pro laboratoře s potřebou vyhodnotit velké množství dat, je použití softwaru, který na základě pravděpodobnostních kritérií stanoví sekvenci peptidu. I tento přístup však vyžaduje zkušeného pracovníka v této oblasti [38, 39].

Vyhodnocení MS/MS spekter

Vyhodnotit spektrum získané tandemovou hmotnostní spektrometrií je nejdůležitější částí *de novo* sekvenace. Často je potřeba vyhodnotit pouze pár MS/MS spekter, proto postačí jejich manuální vyhodnocení. Pokud je fragmentován peptid postrádající jakoukoliv modifikaci, nebo jeho modifikace nezpůsobuje výskyt pouze jednoho typu iontů, postup identifikace jednotlivých iontů a následná sekvenace aminokyselinových zbytků je velice pracná, pokud je však spektrum čitelné, je s trochou praktických zkušeností možné určit celou aminokyselinovou sekvenci [40].

Podle molekulové hmotnosti prekursoru lze zjistit přibližný počet aminokyselin prostým vydělením jeho hmotnosti číslem 110, což je průměrná hodnota aminokyseliny. Výsledné číslo by mělo odpovídat přibližnému počtu aminokyselin. V oblasti nízkých m/z hodnot lze najít b_2 -iont (b_1 -iont se málokdy objevuje), jeho m/z hodnota odpovídá součtu prvních dvou aminokyselinových zbytků plus jedna (proton). Obecně lze někdy najít b -iont podle doprovázejícího a -iontu, který je 28 hmotnostních jednotek menší (ztráta karbonylu). Po nalezení b_2 -iontu, je vhodné najít y_{n-1} -iont, jeho určení usnadňuje zúžený počet možností díky správnému určení b_2 -iontu. Tyto dva ionty (b_2 -iont a y_{n-1} -iont) dají informaci o prvních dvou aminokyselinách peptidu (vždy čteme od N-konce). Jako následující je vyhledán y_1 -iont, jeho hodnota odpovídá hmotnosti poslední aminokyseliny plus číslo 19 (voda + proton). Pokud je protein štěpen trypsinem, obvykle se objevuje y_1 -iont s hodnotou $m/z = 147$ (odpovídající lysinu) a $m/z = 175$ (odpovídající argininu) [40].

Po úspěšném určení těchto iontů lze následně dohledávat buď b -iontovou či y -iontovou sérii, kdy rozdíly mezi jednotlivými ionty zpravidla odpovídají aminokyselinovým zbytkům. Nejmenší rozdíl odpovídající jednomu aminokyselinovému zbytku je 57,02 hmotnostních jednotek (glycin) a největší rozdíl je 186,08 hmotnostních jednotek (tryptofan). Větší rozdíly již odpovídají kombinaci dvou a více aminokyselin. Jejich přesné určení spolu s jejich pořadím v sekvenci je obtížné, existují však tabulky s pravděpodobnými kombinacemi

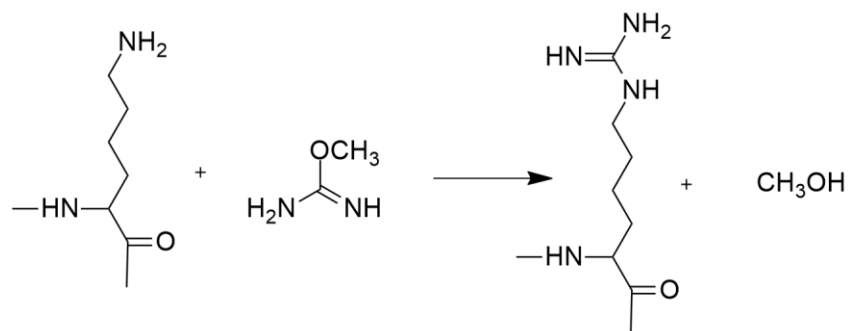
aminokyselinových zbytků. Další překážkou je obvykle nemožné rozlišení leucinu od isoleucinu, protože jejich monoizotopická hmotnost je totožná. Obtížné je také rozlišit lysin od glutaminu, jejich monoizotopická hmotnost se liší o pouhé čtyři setiny hmotnostní jednotky, přičemž lze tento rozdíl spolehlivě identifikovat s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem. Informace získané z *b*-iontové série jsou doplňujícím k informacím z *y*-série, platí pravidlo, že $b_m + y_{n-m} = \text{hmotnost peptidu} + 2$ (dva protony). Po identifikaci veškerých aminokyselinových zbytků je vhodné ověřit zjištěnou teoretickou hmotnost peptidu ze spektra s hmotností prekurzoru, neboť při správném určení sekvence se hodnoty musí shodovat [40].

Vhodnou modifikací peptidu lze usnadnit identifikaci jednotlivých typů iontů. Ideálním případem je MS/MS spektrum obsahující pouze jeden typ kompletní iontové série (například pouze *y*-iontová série), a pak lze velmi jednoduše přečíst aminokyselinovou sekvenci. Dalším způsobem je odlišit jednu iontovou sérii modifikací daného peptidového konce, kdy příslušné fragmentové ionty modifikovaného peptidu vykazují posun *m/z* hodnoty o hmotnost modifikačního činidla (modifikací N-konce se posune např. *b*-iontová série), dále lze ionty příslušné série rozlišit použitím směsi běžného a izotopicky značeného modifikačního činidla, kdy nastane posun obvykle o několik hmotnostních jednotek [40].

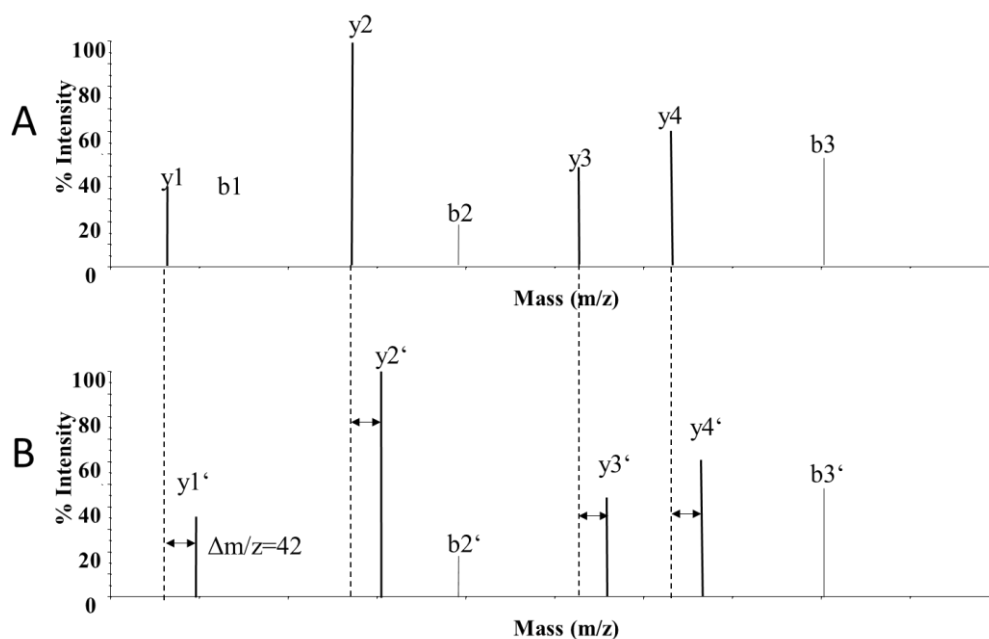
2.5 Techniky přípravy peptidových vzorků pro usnadnění *de novo* sekvenace peptidů

Guanidylace

Sekvenování pomocí guanidylace spočívá v selektivní, a hlavně téměř kompletní modifikaci ϵ -amino skupiny lysinu (obvykle vyskytujícího se na C-konci peptidu) pomocí vysokého molárního nadbytku *O*-methylisomočoviny při vysokém pH ($\text{pH} > 10$). Dochází tak ke konverzi lysinu na homoarginin, který je o 42 Da těžší než lysin, avšak nedochází k modifikaci amino skupiny na N-konci peptidu. Protein obvykle bývá štěpen trypsinem, polovina vzorku je inkubována s činidlem a druhá zůstává nemodifikovaná. V MS/MS analýze peptidů s lysinem na C-konci potom *y*-ionty modifikovaného peptidu vykazují hodnotu *m/z* o 42 jednotek větší oproti nemodifikovanému peptidu. Porovnáním MS/MS spekter modifikovaného a nemodifikovaného peptidu tak lze velice snadno určit *y*-ionty, jelikož *b*-ionty zůstávají stejné v obou spektrech. *Obrázek 7* ukazuje schéma průběhu guanidylační reakce a *Obrázek 8* obsahuje porovnání schémata MS/MS spekter nemodifikovaného (spektrum A) a modifikovaného peptidu (spektrum B) usnadňující identifikaci typů fragmentových iontů [41].



Obrázek 7. Schéma guanidylační reakce [41].

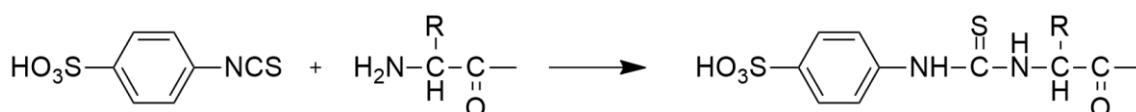


Obrázek 8. Schéma MS/MS spekter nemodifikovaného (schéma A) a modifikovaného (schéma B) peptidu pomocí Guanidylace [41].

Metoda je vhodná pro velice nízké koncentrace vzorku (až femtomoly), vzorky mohou být komplexní. Její nevýhodou je omezení pouze pro peptidy končící lysinovým zbytkem. Překážkou pro vyhodnocení může také být lysin uprostřed peptidové sekvence (důvodem může být vynechané štěpné místo), což způsobuje posun i *b*-iontů a nelze je tak přímo odlišit od *y*-iontů. Tohoto jevu se však hojně využívá při jiných modifikačních reakcích, které jsou cílené na N-konce peptidu, avšak reakční činidlo také reaguje s ϵ -aminovou skupinou lysinových zbytků. Guanidylací lze snadno zablokovat boční řetězce lysinu a následná modifikace poté probíhá pouze na N-konci [41].

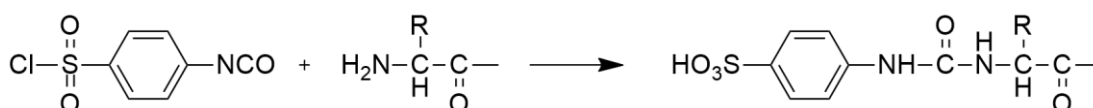
Reakce se sulfonovanými činidly

Modifikace sulfonovanými činidly má za cíl vnesení sulfonové skupiny na N-konec peptidu. Typickým příkladem takového činidla byla kyselina sulfonová, jejíž aplikaci popsal Keough *et al.* v roce 1999, a dále vylepšil v roce 2003 [42, 43]. Výsledkem bylo MS/MS spektrum složené výhradně z γ -iontů, což bylo způsobeno neutralizací náboje b -iontů přítomností sulfonové kyseliny. Na tuto práci navázala spousta dalších týmu, se snahou zvolit alternativní vhodnější sulfonační činidlo. Nejčastěji používaným činidlem se tak stal 4-sulfofenylisothiokyanát (SPITC). *Obrázek 9* zobrazuje schéma reakce peptidu s SPITC [43–45].



Obrázek 9. Schéma sulfonační reakce pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu (SPITC).

Hlavním problémem této metody je horší citlivost pro peptidy získané v nízkém množství tryptickým štěpením s nízkou ionizovatelností. Dalším problémem je několikanásobná modifikace trypticky štěpených peptidů s vynechanými štěpnými místy. Řešením může být zařazení guanidylace před samotnou sulfonací, kdy O-methylisomočovina zablokuje ϵ -amino skupiny peptidu a pro sulfonaci tak zůstává pouze amino skupina N-konce. Alternativou k SPITC by také mohl být 4-chlorosulfofenylisokyanát (SPC). Záměnou síry v thiokarbamoylové skupině SPITC za kyslík dochází k zvýšení intenzit γ -iontů. Schéma reakce je znázorňuje *Obrázek 10* [46, 47].

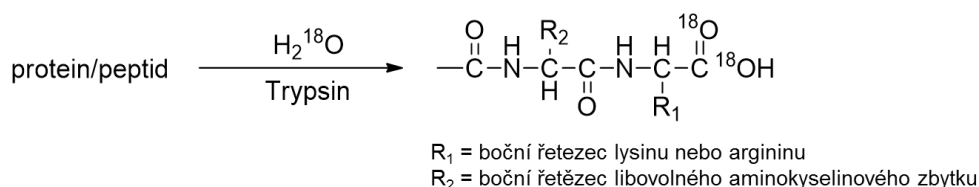


Obrázek 10. Schéma modifikace pomocí 4-chlorosulfofenylisokyanátu (SPC).

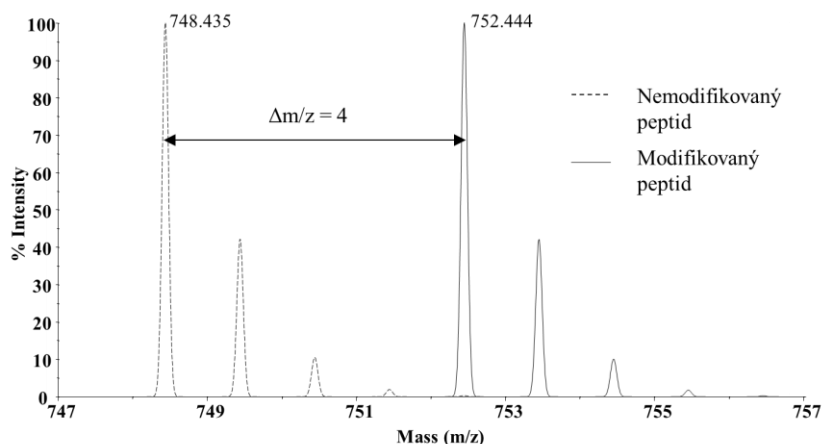
Izotopické značení pomocí ^{18}O

Modifikačních reakcí využívajících různých izotopů je spousta, často jsou používány pro kvantifikaci proteinů. Těchto typů značení je také možné využít pro usnadnění interpretace dat při *de novo* sekvenaci, jelikož opět dochází k identifikaci některých typů iontů přítomných v MS/MS spektrech. Pro značení atomem kyslíku ^{18}O pomocí trypsinu existují dva postupy. První zahrnuje použití těžké vody H_2^{18}O během digesce proteinu trypsinem, kdy je ^{18}O zabudován do C-konce vznikajících peptidů. Druhým postupem je ^{18}O zabudován působením trypsinu již do naštěpených peptidů. Zde je využito schopnosti trypsinu katalyzovat

výměnu kyslíků v karboxylové skupině C-konce u produktů digesce, kdy reakce probíhá v přítomnosti H_2^{18}O . Zbudování 2 atomů ^{18}O do karboxylové skupiny C-konce způsobí posun ve hmotnosti o 4 Da (*Obrázek 11* zobrazuje schéma reakce a schéma MS spektra zobrazuje *Obrázek 12*). V MS/MS spektru jsou pak y -ionty také posunuty o 4 jednotky m/z (pro jednonásobně nabitě ionty), lze je tedy odlišit od b -iontů, a snadněji tak interpretovat aminokyselinovou sekvenci [48, 49].



Obrázek 11. Schéma modifikace proteinu či peptidu pomocí těžké vody [49].



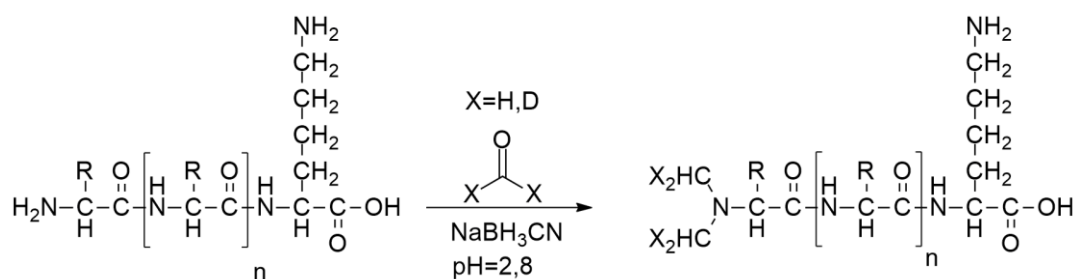
Obrázek 12. Teoretické schéma hmotnostního spektra směsi nemodifikovaného a modifikovaného peptidu značeného těžkou vodou [49].

Dimethylace

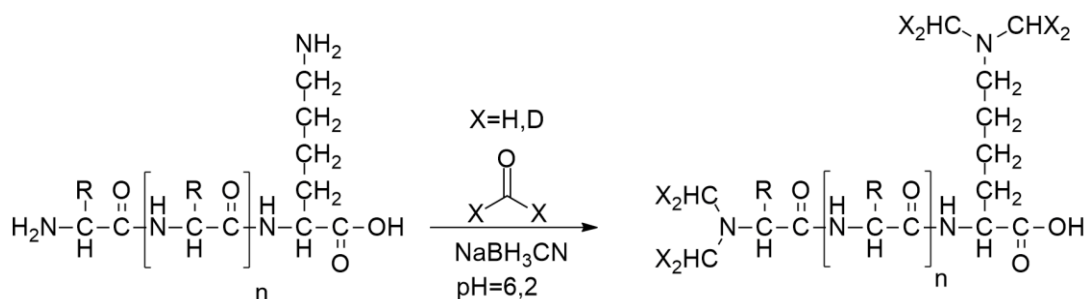
Dimethylace je často využívána k relativní kvantifikaci peptidů a proteinů, kdy je dimethylací značen jak N-konec, tak i ϵ -aminová skupina C-koncového lysinu. Peptidy se smísí s formaldehydem za vzniku Shiffovy báze, která je následně redukována kyanoborohydridem sodným za vzniku sekundárního aminu. Ten pak dále reaguje s formaldehydem a vzniká tak dimethylaminová skupina [50].

Hsu *et al.* v roce 2003 naznačili, že použití dimethylace lze vhodně využít pro sekvenování peptidů. Qin *et al.* v roce 2012 podrobně vysvětlují, že vhodným nastavením pH reakční směsi je možné docílit specifické dimethylace pouze na N-konci (použitím 1% kyseliny octové); úplného značení jak N-konce, tak i lysinu na C-konci je pak docíleno při

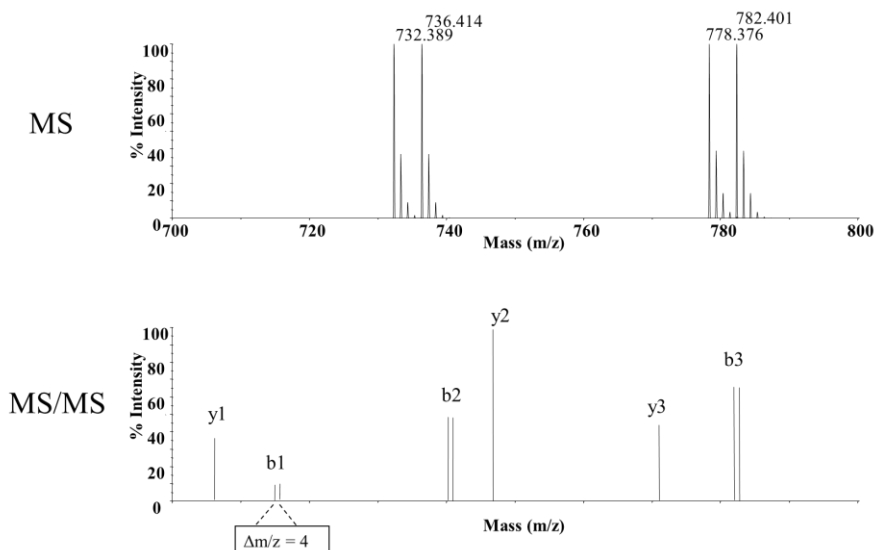
pH 6,2. Zabránit nechtěné dimethylaci lysinu na C-konci lze také např. guanidylací ϵ -aminové skupiny lysinu. Vyřešen je tak i problém s vynechanými štěpnými místy a všechny peptidy budou vykazovat konstantní nárůst o 28 hmotnostních jednotek, a totožně se tak posunou i b -ionty v MS/MS spektru. Pro další usnadnění vyhodnocování MS/MS spektra lze použít směs modifikovaných peptidů lehkým a těžkým formaldehydem (značeným deuteriem) v poměru 1:1. Peptidy budou v MS spektru zobrazeny jako dublety oddělené o 4 hmotnostní jednotky, v MS/MS spektru jsou tak b -ionty snadno detekovány také jako dublety se stejným rozdílem. Dimethylační reakci znázorňuje *Obrázek 13* a *Obrázek 14*, kde jsou rozlišeny reakce při různém pH. *Obrázek 15* zobrazuje schéma jak MS spektra, tak i MS/MS spektra směsi modifikovaných peptidů lehký a těžkým formaldehydem v poměru 1:1 [50, 51].



Obrázek 13. Dimethylace cílená pouze na N-konec peptidu při pH = 2,8 [50].



Obrázek 14. Cílená dimethylace na N-konec peptidu a současně na ϵ -amino skupinu lysinu při pH = 6,2 [50].

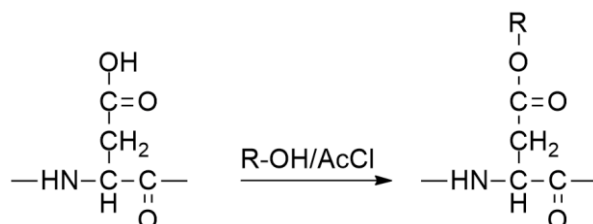


Obrázek 15. Schéma MS a MS/MS spektra směsi peptidů dimethylovaných lehkým i těžkým formaldehydem v poměru 1:1 [50, 51].

Esterifikace

Esterifikace alkoholem může být doplňující metodou pro *de novo* sekvenaci peptidů. Peptidy jsou podrobeny esterifikaci se zvoleným alkoholem v alkoholické kyselině chlorovodíkové, kdy cílovou skupinou je COOH skupina C-konce peptidu a bočního řetězce kyseliny asparagové a glutamové. Vhodným alkoholem pro tuto reakci je methanol či ethanol, jelikož obě činidla vykazují vysokou schopnost kompletně esterifikovat volné COOH skupiny. Ačkoliv methanol je v esterifikaci účinnější, dochází zde k nežádoucí reakci, kdy boční řetězce asparaginu a glutaminu mění na odpovídající alkoholické estery. Ethanol, ačkoliv jeho reaktivita je nižší, boční reakci způsobuje jen ve velmi malé míře, a proto je optimálním reakčním činidlem. Obecně tedy platí, že čím delší řetězec alkoholu, tím je nižší účinnost esterifikace ale také méně nežádoucích bočních reakcí. Esterifikaci lze využít jak k identifikaci počtu COOH skupin peptidu, tak i pro částečné usnadnění *de novo* sekvenace peptidů. MS/MS spektra jsou sice složitější pro interpretaci než u ostatních modifikačních reakcích, částečnou strukturní informaci nám však dají. Ideálním případem je peptid bez kyseliny asparagové a glutamové, kdy porovnáním MS/MS spekter identifikujeme *y*-ionty posunuté modifikací o danou hodnotu *m/z* (+14 Da nebo +28 Da pro methanol, resp. ethanol) zatímco *b*-ionty zůstávají stejné (to je podobný způsob porovnávání MS/MS spekter modifikovaného a nemodifikovaného peptidu jako u guanidylace, s tím rozdílem, že *y*-ionty mají odlišnou hodnotu o 14 či 28 Da; viz. Obrázek 8). Problém nastává, když peptid obsahuje více COOH skupin, některé *b*-ionty poté také vykazují posun ve spektru, a pak se stává interpretace složitější. Schéma esterifikace zobrazuje Obrázek 16, znázorněna je esterifikace COOH

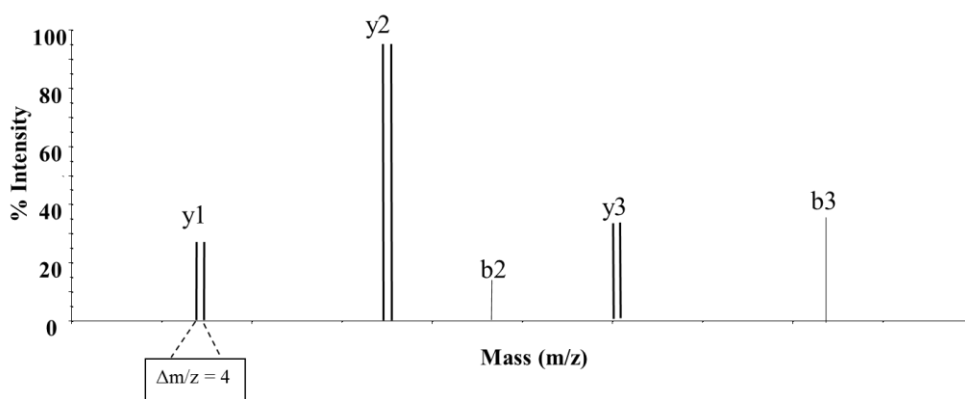
skupiny kyseliny asparagové, princip reakce je totožný pro karboxylovou skupinu kyseliny glutamové a C-konce [52].



Obrázek 16. Schéma esterifikace kyseliny asparagové; princip reakce je totožný pro karboxylovou skupinu kyseliny glutamové a C-konce [52].

Značení lysinu deuteriem

Další metodou je značení pomocí deuterovaného lysinu. Při kultivaci bakterií, které jsou cílem proteomické analýzy, je do kultivačního média přidán lysin značený deuteriem. Bakterie následně značený lysin začlení do svého proteomu. Pro digesci proteinů se značeným lysinem je pak vhodné použít štěpící enzym Lys-C, který zajistí, že téměř všechny peptidy budou mít lysin na C-konci; trypsin lze použít, ale musí být bráno v úvahu, že některé produkty štěpení mající na C-konci arginin nemusí obsahovat lysin vůbec. V MS/MS spektru peptidů s lysinem na C-konci se potom y -ionty identifikují jako dublety oddělené 4 hmotnostními jednotkami (schéma MS/MS spektra znázorňuje *Obrázek 17*) [53].

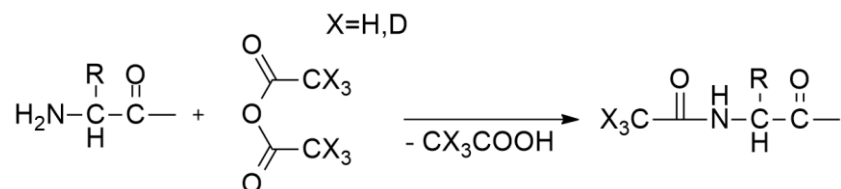


Obrázek 17. Schéma MS/MS spektra směsi nemodifikovaného peptidu a peptidu se značeným lysinem pomocí deuteria [53].

Acetylace

Acetylace N-konce peptidů lze provádět acetanhydridem. Po enzymatickém štěpení jsou peptidy vystaveny působení směsi lehkého a deuteriem značeného acetanhydridu (v poměru 1:1). V MS/MS spektru se opět objeví dublety píků b -iontů oddělených o 3 hmotnostní jednotky a lze je tak rozlišit od y -iontů (MS/MS spektrum vypadá charakterově

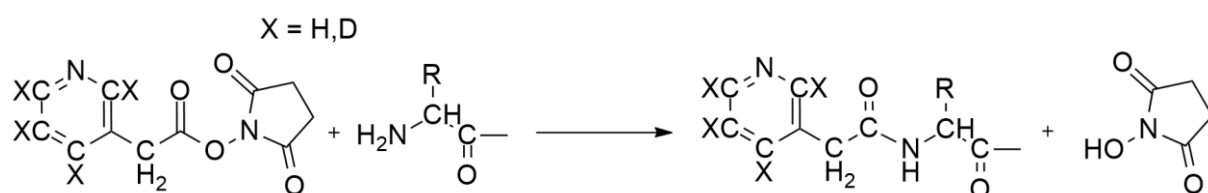
obdobně jako spektrum dimetylovaného peptidu, viz *Obrázek 15*). Tato metoda má výhodu, že není nutné blokovat ϵ -amino skupiny lysinových zbytků, jelikož s činidlem nereagují. *Obrázek 18* znázorňuje schéma acetylace N-konce peptidu lehkým nebo těžkým acetanhydridem [54].



Obrázek 18. Schéma acetylace peptidu acetanhydridem [54].

Nikotinylace

Zlepšení kvality MS/MS spektra je možné pozorovat u použití nikotinylace, kdy s N-koncem reaguje nikotinyl-N-hydroxysukcinimid (Nic-NHS) nesoucí pozitivní náboj. Modifikace samotným činidlem však není kvantitativní a úplná, proto se před reakcí využívá sukcinylace lysinových zbytků zvyšující úspěšnost kompletní nikotinylace; jedinou boční reakcí je sukcinylace a nikotinylace tyrosinových zbytků, což však lze odstranit použitím hydroxylaminu. Pokud je pro značení N-konce použita směs H_4 a D_4 Nic-NHS, v tandemovém spektru se potom *b*-ionty jeví jako dublety oddělené 4 hmotnostními jednotkami a zásaditá povaha nikotinylové skupiny zvyšuje intenzitu vznikajících *b*-iontů; *y*-ionty se jeví jako singletové píky a jejich intenzita je nízká. MS/MS spektrum vypadá opět obdobně jako spektrum dimetylovaných peptidů lehkým a těžkým formaldehydem (viz. *Obrázek 15*). *Obrázek 19* znázorňuje schéma nikotinylace lehkým, resp. těžkým Nic-NHS [55].

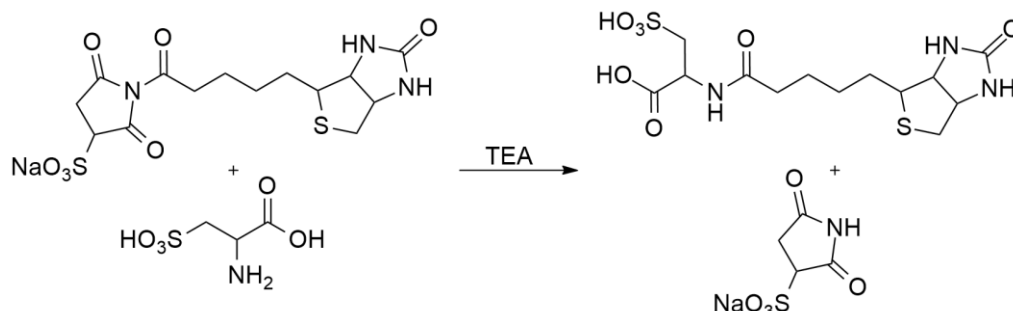


Obrázek 19. Schéma nikotinylace N-konce peptidu pomocí Nic-NHS [55].

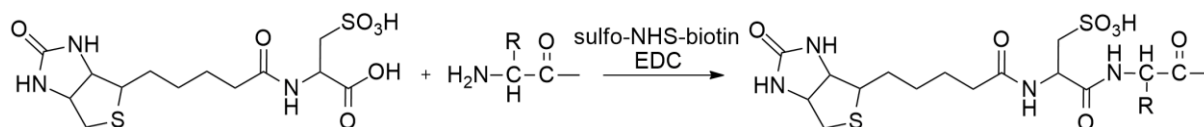
Biotinylace

Další metodou, jak zjednodušit interpretaci spekter je biotinylace N-konce peptidu biotinylcysteovou kyselinou. Toto reakční činidlo lze syntetizovat v laboratoři smísením kyseliny cysteové, sulfo-N-hydroxysukcinimido-biotinu a triethylaminu, kdy reakce probíhá při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Metoda je byla zavedena pro identifikaci a sekvenování N-konce proteinu. V proteinu izolovaném na PVDF membráně byla nejprve provedena redukce a alkylace cysteinových zbytků, boční řetězce lysinových zbytků byly guanidylovány

a následně byla navázána biotinylcysteová kyselina. Protein byl naštěpen trypsinem a afinitní purifikací byly izolovány peptidy s navázanou biotinylcysteovou kyselinou, které byly analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií. V získaném spektru takto modifikovaných peptidů jsou pozorovány výhradně γ -ionty (analogicky jako spektrum peptidů modifikovaných pomocí SPITC), které usnadňují jejich *de novo* sekvenaci a tím snadnou identifikaci N-konce analyzovaného proteinu. *Obrázek 20* znázorňuje schéma výroby biotinylcysteové kyseliny a *Obrázek 21* znázorňuje schéma modifikace peptidu pomocí biotinylcysteové kyseliny [56].



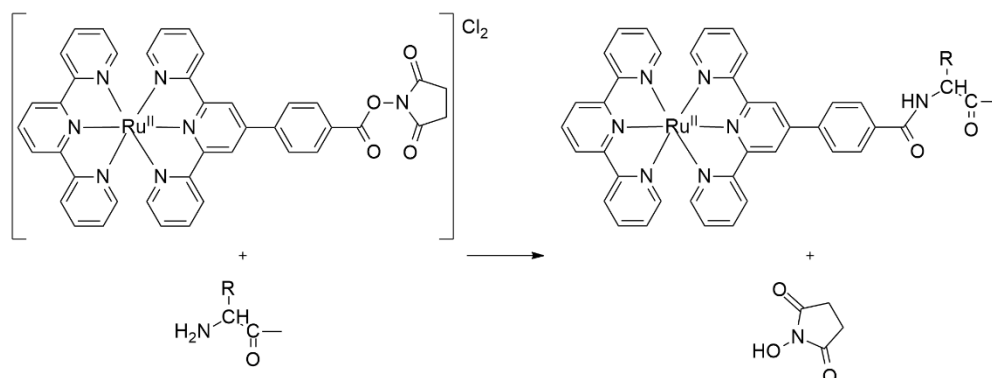
Obrázek 20. Schéma výroby biotinylcysteové kyseliny [56].



Obrázek 21. Schéma biotinylace N-konce peptidu [56].

Značení rutheniovým komplexem

Při této modifikaci je využíváno značení N-konce peptidů pomocí činidla bis(terpyridin)ruthenium (II) ($\langle Ru \rangle$ -CO). Činidlo má charakteristickou izotopickou obálku a tvoří vysoce intenzivní píky b -iontů v tandemovém spektru. Jak bylo již zmiňováno u jiných metod, i zde je zapotřebí zablokovat reaktivní ϵ -amino skupiny, a guanidylace je pro to velice vhodná. *Obrázek 22* znázorňuje schéma modifikace peptidu pomocí $\langle Ru \rangle$ CO [57].



Obrázek 22. Schéma modifikace peptidu pomocí činidla bis(terpyridin)ruthenium (II) [57].

3 Experimentální část

3.1 Technické a laboratorní vybavení, chemikálie a software

3.1.1 Technické vybavení

- Hmotnostní spektrometr 4800 MALDI-TOF/TOF Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, USA; pozitivní reflekttronový mód
- Analytická váha Excellence Plus XP, Mettler Toledo, Švýcarsko
- Biologický inkubátor Binder BD53, Binder GmbH, Tuttlingen, Německo
- Blokový termostat ThermoShaker TS-100C, Biosan, Riga, Lotyšsko
- Membránová vakuová pumpa/vývěva (typ MZ 2C), Vacuumbrand GmbH + CO KG, Wertheim, Německo
- Minicentrifuga/vortex Combi-Spin FVL-2400N, Biosan, Riga, Lotyšsko
- přístroj na přípravu deionizované vody PURELAB Classic IV, Elga, Marlow, Velká Británie

3.1.2 Laboratorní vybavení

- Mikropipety 2,5, 10, 20, 100, 200 a 1000 μ l, Reaserch plus, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Pipetovací špičky, 0,1-10 μ l, 0,2-20 μ l, 2-200 μ l, 200-1000 μ l, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Mikrostríkačka, 25 μ l objem, SGE, Austrálie
- Zkumavky 0,5 a 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Německo
- SPE-kolonka, Empore C18-SD 4 mm / 1 ml, 3M, Minnesota, USA
- MALDI destička, 384 Opti-TOF 123 mm x 81 mm SS Rev E, Applied Biosystems, Framingham, USA
- Volná stacionární fáze, suspendovaná v ACN
 - Ascentis ES-C18, 2,7 μ m částice (typ core-shell), Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
 - Kinetex EVO-C18, 2,6 μ m částice (typ core-shell), Phenomenex, Torrance, USA
 - Aeris Peptide XB-C18, 3,6 μ m částice (typ core-shell), Phenomenex, Torrance, USA
 - Porosil Gold 300 C18, Dr. Maisch, Německo

- Hypercarb, porézní grafitický uhlík, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- POROS R2 Applied Biosystems, Foster City, USA
- POROS R3 OLIGO Applied Biosystems, Foster City, USA
- PolyWAX LP, PolyLC Inc., Columbia, USA
- Titansphere TiO₂, 5 µm částice, GL Sciences, Tokyo, Japonsko
- Mikrogradientové zařízení
 - Laboratorní stojan
 - Dvojitě křížové svorky
 - Plastový půlkruhový držák
 - Závaží
 - Korek pro upevnění mikrostříkačky, přilepený do plastového stojanu
- Sada pro výrobu kapilární kolonky
 - Polymerní kapilára pro výrobu kolonek, Tubing FEP, 1,16“ x 0,25 mm ID, 10 m, Vici AG International, Švýcarsko
 - Filtr ze skleněných vláken, GF/C, Whatman, Velká Británie
 - Kombinované kleště
 - Skalpel, Martor Solingen, Německo
 - Špendlík
 - Jehla se zabroušeným koncem
 - Měděný drátek
- Univerzální indikátorové pH papírky, 0-14, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Testovací pH papírky, 0-6, 7-14, Macherey-Nagel, Düren, Německo

3.1.3 Použité chemikálie

- 4-chlorosulfofenylisokyanát, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Acetonitril ≥ 99,9 %, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Acetylchlorid, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Deoxycholát sodný, sodná sůl, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Ethanol, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Formaldehyd – lehký a značený deuteriem, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Fosforečnan sodný, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Hydrogenuhlíčan amonný Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Hydrogenuhlíčan sodný, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

- Hydroxid amonný, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Kalibrační směs 6 standardních peptidů pro MALDI-TOF MS; des-arg1-bradykinin, angiotensin I, Glu1-fibrinopeptide B, ACTH (1-17), ACTH (18-39), ACTH (7-38); Applied Biosystems, Foster City, USA
- Kyanoborohydrid sodný, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Kyselina mravenčí, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Kyselina trifluoroctová, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Kyselina α -kyano-4-hydroxy skořicová, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Monohydrát 4-sulfofenylisothiokyanátu sodného, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Mravenčan amonný, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Myoglobin z koňského srdce, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Octan sodný, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- O-methylisomočovina hemisulfát, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Pyridin, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Trypsin, sequencing grade, 200 ng, Promega Corporation, Wisconsin, USA
- Uhlíčitán sodný, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

3.1.4 Software

- 4000 Series Explorer (řídicí software k přístroji MALDI-TOF/TOF MS), Applied Biosystems
- mMass, verze 5.5.0, <http://mmass.org/>
- Data Explorer, verze 4.10, Applied Biosystems

3.2 Příprava modelového vzorku tryptických peptidů myoglobinu

3.2.1 Tryptické štěpení myoglobinu za přítomnosti deoxycholátu sodného

Chemikálie a materiál:

- Koňský myoglobin
- Trypsin
- 2 M NH_4HCO_3 , rozpuštěno v deionizované vodě
- 50 mM NH_4HCO_3 , rozpuštěno v deionizované vodě
- 4% roztok deoxycholátu sodného (DOCS), rozpuštěno v deionizované vodě
- 5% a 0,5% kyselina trifluoroctová (TFA)

Postup:

- V 1,5 ml zkumavce bylo smícháno 250 μ l roztoku myoglobinu o koncentraci 1,6 mg/ml, 25 μ l 2 M NH_4HCO_3 a 125 μ l 4% DOCS.
- Zkumavka byla inkubována 10 minut v blokovém termostatu při teplotě 70 °C.
- Víálka s 200 ng trypsinu byla rozpuštěna ve 100 μ l 50 mM NH_4HCO_3 .
- Po ochlazení zkumavky na pokojovou teplotu bylo ke směsi napipetováno 33,3 μ l roztoku trypsinu.
- Zkumavka byla inkubována 15 hodin při teplotě 37°C.
- Zkumavka byla vložena do ledu na 10 minut.
- Ke směsi bylo napipetováno 100 μ l vychlazené 5% TFA a zkumavka byla protřepána na vortexu; bylo ověřeno $\text{pH} < 4$.
- Zkumavka byla vložena do ledu na 5 minut.
- Směs byla stočena při 13 400 g po dobu 3 minut, pokud byla sedimentace neúplná, sraženina byla lehce sklepnuta na dno a znovu stočena při 13 400 g po dobu 3 minut.
- Supernatant byl odebrán do čisté zkumavky.
- K sedimentu bylo přidáno 400 μ l vychlazené 0,5% TFA, zkumavka byla protřepána na vortexu a vložena do ledu na 5 minut.
- Zkumavka byla stočena při 13 400 g po dobu 3 minut a supernatant byl přidán k již odebranému supernatantu.
- Odebrané supernatanty byly purifikovány na SPE kolonce.

3.2.2 Purifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí extrakce na pevné fázi

Chemikálie a materiál:

- SPE kolona, C18-SD (standard density) 4 mm/1 ml
- 80% acetonitril (ACN) s 0,1% TFA
- 60% ACN s 0,1% TFA
- 0,1% TFA
- Roztok tryptických peptidů myoglobinu (z experimentu v kapitole 3.2.1)
- Matrice: kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), 3 mg v 1 ml 70% ACN s 0,1% TFA

Postup:

- SPE kolonka byla smočena 150 μ l 80% ACN s 0,1% TFA a následně 150 μ l 60% ACN s 0,1% TFA.
- Kolonka byla ekvilibrována 300 μ l 0,1% TFA.

- Po ekvilibraci byl napipetován veškerý vzorek z experimentu 3.2.1 a kolonka byla poté propláchnuta 300 μ l 0,1% TFA.
- Eluce byla provedena 150 μ l 60% ACN s 0,1% TFA do čisté zkumavky.
- Pro kontrolu správnosti digesce byl odebrán 1 μ l eluentu a zředěn 99 μ l 60% ACN s 0,1% TFA. Z této směsi byl napipetován 1 μ l na MALDI destičku a smícháno s 1 μ l CHCA matrice na destičce. Poté byla provedena analýza v MALDI-TOF hmotnostním spektrometru.
- Zbytek koncentrovaného eluentu byl rozpipetován po 15 μ l (10 μ g peptidů) do 0,5 ml zkumavek, které byly vloženy do vakuového koncentrátoru a vysušeny. Takto připravené alikvoty vzorku štěpeného myoglobinu byly uchovávány v mrazáku při -4 °C a připraveny pro následující experimenty.

3.3 Purifikace a separace tryptických peptidů myoglobinu na stacionární fázi

3.3.1 Příprava kolonek pro purifikaci a separaci peptidů

Chemikálie a materiál:

- Plastová kapilára o vnitřním průměru 250 μ m
- Kombinované kleště
- Skalpel nebo břit
- Úzký a silný špendlík
- Jehla se zabroušeným koncem nasazená na injekční stříkačku
- Skleněný filtr
- Měděný drátek o průměru < 250 μ m
- Mikrostríkačka
- Stacionární fáze dle potřeby experimentu, resuspendována v ACN
- MALDI destička

Postup:

- Skalpelem bylo uříznuto přibližně 5 cm plastové kapiláry.
- Kombinačními kleštěmi byl vytáhnut jeden konec kapiláry (aby se zúžil vnitřní průměr pro zavedení skleněné frity) a seříznut skalpelem, tak aby vytažený konec byl přibližně 1 cm dlouhý.
- Na druhém konci kapiláry byl vnitřní průměr rozšířen nejprve úzkým, a poté širokým špendlíkem pro snadné zavedení špičky či mikrostríkačky.

- Zabroušenou jehlou byla vykrojena skleněná frita, a vyfouknutím vzduchu jehlou zavedena do kapiláry. Frita byla usazena měděným drátkem tak, aby zůstala na přechodu širšího a užšího vnitřního průměru.
- Pipetou bylo nabráno potřebné množství stacionární fáze, zasazeno do rozšířené části kapiláry, špička byla oddělena od pipety a pomocí injekční stříkačky byla fáze tlakem převedena do kapiláry. Tento krok byl opakován, dokud nebylo potřebné množství stacionární fáze v kapiláře.
- Pokud nebyla stacionární fáze v kapiláře homogenně usazena, byla kapilára vložena do ultrazvuku na pár sekund a následně pomocí špičky napojené na injekční stříkačku (pipeta nevyvolá dostatečný tlak) vtačován ACN pro lepší usazení stacionární fáze.
- Hrdlo kolonky bylo vyčištěno od stacionární fáze pomocí ultrazvuku.

3.3.2 Purifikace a separace tryptických peptidů myoglobinu na reverzní fázi pomocí kolonky a mikrogradientu

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: tryptické peptidy myoglobinu, 10 µg rozpuštěno ve 200 µl 0,1% TFA
- Kolonka s reverzní stacionární fází
 - Ascentis ES-C18, 2,7 µm částice
 - Kinetex EVO-C18, 2,6 µm částice
 - Aeris Peptide XB-C18 3,6 µm částice
- ACN o koncentracích 2, 8, 16, 24, 32, 40 a 80% s 0,1% TFA
- Matrice: kyselina α -kyano-4-hydroxysořicová (CHCA) 3 mg/1 ml 70% ACN s 0,1% TFA
- Mikrostríkačka o objemu 25 µl
- Stojan, upravený pro zavěšení mikrostríkačky
- Závaží – dvě velikosti pro kontrolu průtoku mobilní fáze
- MALDI destička

Postup:

- Mikrostríkačka byla třikrát propláchnuta 80% ACN s 0,1% TFA, poté bylo natáhnuto přibližně 20 µl 80% ACN s 0,1% TFA, mikrostríkačka byla napojena na kolonku a vložena do stojanu. Na píst bylo vloženo menší závaží (aby průtok mobilní fáze byl přibližně 3 µl/min) a kapalina byla protlačena skrz kolonku pro smočení stacionární fáze.

- Mikrostríkačka byla třikrát propláchnuta 2% ACN s 0,1% TFA, poté bylo natáhnuto přibližně 20 μ l 2% ACN s 0,1% TFA a kapalina byla protlačena kolonkou stejným způsobem jako v předchozím kroku pro ekvibraci stacionární fáze. Bylo použito větší závaží.
- Do mikrostríkačky bylo postupně natáhnuto 7 μ l 2% ACN s 0,1% TFA, 10 μ l vzorku a zakončeno 7 μ l 2% ACN s 0,1% TFA. Obsah mikrostríkačky byl protlačen kolonkou pro nanesení vzorku na stacionární fázi.
- Po tomto kroku lze zařadit modifikační reakci s následným proplachem kolonky 20 μ l 2% ACN s 0,1% TFA.
- Mikrostríkačka byla třikrát propláchnuta 40% ACN s 0,1% TFA. Následně bylo po 4 μ l natáhnuto postupně 40, 32, 24, 16, 8 a 2% ACN s 0,1% TFA pro vytvoření gradientu. Mikrostríkačka byla napojena na kolonku.
- Pro pouhou purifikaci byla kapalina protlačena kolonkou a eluát byl posbírán do zkumavky a protřepán. Z něj bylo odebráno 0,5 μ l na MALDI destičku a překryto 0,8 μ l matrice.
- Pro separaci bylo nejprve 6 μ l protlačeno do odpadu a následně byly zachytávány kapky po 0,75 μ l na MALDI destičku a překryty 0,8 μ l matrice.
- Po eluci byla kolonka propláchnuta 20 μ l 80% ACN s 0,1% TFA.
- Byla provedena analýza na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru.

3.4 Modifikační reakce

3.4.1 Guanidylace tryptických peptidů myoglobinu na stacionární fázi v kolonce

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: tryptické peptidy myoglobinu, 10 μ g rozpuštěno ve 200 μ l 0,1% TFA
- ACN o koncentracích 2, 8, 16, 24, 32, 40 a 80% s 0,1 % TFA
- Matrice: kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) 3 mg/1 ml 70% ACN s 0,1% TFA
- Roztok O-methylisomočoviny hemisulfát (OMIMHS) – 50 mg bylo rozpuštěno v 51 μ l deionizované vody (dH₂O)
- 0,72 M roztok Na₃PO₄
- Kolonka s reverzní stacionární fází Kinetex EVO-C18, 2,6 μ m částice
- Mikrostríkačka o objemu 25 μ l
- Stojan, upravený pro zavěšení mikrostríkačky
- Závaží – dvě velikosti pro kontrolu průtoku mobilní fáze

- MALDI destička

Postup:

- Na kolonku bylo nanášeno 0,5 µg (10 µl) směsi tryptických peptidů myoglobinu dle postupu v kapitole 3.3.2.
- Byl vytvořena reakční směs smísením 88 µl zásobního roztoku Na₃PO₄ a 24 µl zásobního roztoku OMIMHS.
- Do mikrostříkačky bylo natakaeno 14 µl reakční směsi a protlačeno kolonkou; mikrostříkačka následně ihned propláchnuta dH₂O a 2% ACN s 0,1% TFA pro odstranění reakční směsi ze stříkačky.
- Kolonka byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
- Po inkubaci byla kolonka propláchnuta 10 µl 0,1% TFA a následně 20 µl 2% ACN s 0,1% TFA.
- Modifikované peptidy byly vyeluovány gradientem ACN přímo do zkumavky, směs byla po 0,5 µl nanášena na MALDI destičku a spoty byly překryty 0,8 µl matrice. Alternativně byla provedena separace na MALDI destičku (frakce po 0,75 µl) a spoty taktéž překryty 0,8 µl matrice.
- Byla provedena analýza na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru.

3.4.2 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v kolonce

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: tryptické peptidy myoglobinu, 10 µg rozpuštěno ve 200 µl 0,1% TFA
- ACN o koncentracích 2, 8, 16, 24, 32, 40 a 80% s 0,1% TFA
- Matrice: kyselina α-kyano-4-hydroxysořicová (CHCA) 3 mg/1 ml 70% ACN s 0,1% TFA
- Roztok 4-sulfofenylisothiokyanátu (SPITC) – 1 mg rozpuštěn ve 100 µl 20 mM NaHCO₃ rozpuštěného v dH₂O
- Kolonka s reverzní stacionární fází Kinetex EVO-C18, 2,6 µm částice
- Mikrostříkačka o objemu 25 µl
- Stojan, upravený pro zavěšení mikrostříkačky
- Závaží – dvě velikosti pro kontrolu průtoku mobilní fáze
- MALDI destička

Postup:

- Na kolonku bylo naneseno 0,5 µg (10 µl) směsi tryptických peptidů myoglobinu dle postupu v kapitole 3.3.2.
- Do mikrostříkačky bylo nataženo 15 µl roztoku SPITC a protlačeno kolonkou.
- Kolonka byla inkubována při 55 °C po dobu 120 minut v termostatu.
- Po inkubaci byla kolonka propláchnuta 10 µl 0,1% TFA a následně 20 µl 2% ACN s 0,1% TFA.
- Modifikované peptidy byly vyeluovány gradientem ACN přímo do zkumavky, směs byla po 0,5 µl nanesena na MALDI destičku a spoty byly překryty 0,8 µl matrice. Alternativně byla provedena separace na MALDI destičku (frakce po 0,75 µl) a spoty také překryty 0,8 µl matrice.
- Byla provedena analýza na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru.

3.4.3 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu guanidylací a následně pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v kolonce

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: tryptické peptidy myoglobinu, 10 µg rozpuštěno ve 200 µl 0,1% TFA
- ACN o koncentracích 2, 8, 16, 24, 32, 40 a 80% s 0,1% TFA
- Matrice: kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) 3 mg/1 ml 70% ACN s 0,1% TFA
- Roztok O-methylisomočoviny hemisulfát (OMIMHS) – 50 mg rozpuštěno v 51 µl deionizované vody (dH₂O)
- 0,72 M roztok Na₃PO₄
- Roztok 4-sulfofenylisothiokyanátu (SPITC) – 1 mg byl rozpuštěn ve 100 µl 20 mM NaHCO₃ rozpuštěného v dH₂O
- Kolonka s reverzní stacionární fází Kinetex EVO-C18, 2,6 µm částice
- Mikrostříkačka o objemu 25 µl
- Stojan, upravený pro zavěšení mikrostříkačky
- Závaží – dvě velikosti pro kontrolu průtoku mobilní fáze
- MALDI destička

Postup:

- Na kolonku bylo naneseno 0,5 µg (10 µl) směsi tryptických peptidů myoglobinu dle postupu v 3.3.2.
- Byl vytvořena reakční směs smísením 88 µl zásobního roztoku Na₃PO₄ a 24 µl zásobního roztoku OMIMHS.
- Do mikrostříkačky bylo nataženo 14 µl reakční směsi a protlačeno kolonkou; mikrostříkačka následně ihned propláchnuta dH₂O a 2% ACN s 0,1% TFA pro odstranění reakční směsi ze stříkačky.
- Kolonka byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Po inkubaci byla kolonka propláchnuta 10 µl 0,1% TFA.
- Do mikrostříkačky bylo nataženo 15 µl roztoku SPITC a protlačeno kolonkou a kolonka byla inkubována při 55°C po dobu 120 minut v termostatu.
- Po inkubaci byla kolonka propláchnuta 10 µl 0,1% TFA a následně 20 µl 2% ACN s 0,1% TFA.
- Modifikované peptidy byly vyeluovány gradientem ACN přímo do zkumavky, směs byla po 0,5 µl nanesena na MALDI destičku a spoty byly překryty 0,8 µl matrice. Alternativně byla provedena separace na MALDI destičku (frakce po 0,75 µl) a spoty taktéž překryty 0,8 µl matrice.
- Byla provedena analýza na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru.

3.4.4 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí 4-chlorosulfofenylisokyanátu v roztoku

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: tryptické peptidy myoglobinu, 1 µg vysušený v 0,5 ml zkumavce
- Pyridin/dH₂O, 1:1 (v/v)
- ACN
- 4-chlorosulfofenylisokyanát – 10 mg rozpuštěno v 1 ml v ACN
- 5%, 1% a 0,1% TFA
- SPE kolonka EMPORE C18
- Matrice: kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) 3 mg/1 ml 70% ACN s 0,1% TFA
- MALDI destička

Postup:

- Do zkumavky s vysušeným 1 µg tryptických peptidů myoglobinu bylo napipetováno 5 µl směsi pyridin/voda v poměru 1:1.
- Ke směsi bylo dále přidáno 5 µl roztoku SPC.
- Zkumavka byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
- Po inkubaci bylo přidáno 190 µl 0,1% TFA, následně bylo přidáváno po 10 µl 5% TFA, dokud nebylo pH < 2
- Zkumavka byla vložena do ultrazvuku, stočena na odstředivce a supernatant byl odebrán.
- Ke krystalkům ve zkumavce bylo přidáno 200 µl 1% TFA, promícháno, vloženo do ultrazvuku, stočeno a supernatant byl přidán k prvnímu podílu.
- Supernatanty byly odsoleny na SPE kolonce a eluát byl nakapán po 0,5 µl na MALDI destičku, spoty byly převrstveny 0,8 µl matrice a analyzovány pomocí MALDI-TOF MS.

3.4.5 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu guanidylací a následně sulfonací pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v roztoku

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: tryptické peptidy myoglobinu, 10 µg rozpuštěno v 50 µl 0,1 % TFA
- ACN
- 80 a 2% ACN s 0,1% TFA
- 5% TFA
- Roztok O-methylisomočoviny hemisulfát (OMIMHS) – 50 mg rozpuštěno v 51 µl deionizované vody (dH₂O)
- 0,72 M roztok Na₃PO₄
- Roztok 4-sulfofenylisothiokyanátu (SPITC) – 10 mg bylo rozpuštěno v 1 ml 20 mM NaHCO₃ rozpuštěném v dH₂O
- Suspenze stacionární fáze POROS R2 nebo POROS R3 Oligo, 100 mg částic resuspendováno v 500 µl ACN
- Matrice: kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) 3 mg/1 ml 70% ACN s 0,1% TFA
- MALDI destička

Postup:

- Do 0,5 ml zkumavky byl napipetován 1 μ l stacionární fáze.
- Ke stacionární fázi byl napipetováno 100 μ l ACN, zatřepáno, odstředěno a odsáto. Dále bylo ke stacionární fázi napipetováno 100 μ l 2% ACN s 0,1% TFA, zatřepáno, odstředěno a odsáto. Tento krok byl znovu zopakován.
- K promyté stacionární fázi bylo přidáno 50 μ l vzorku, 10 minut třepáno vodorovně na třepačce (fáze se tak lépe promíchá) při pokojové teplotě. Zkumavka byla poté centrifugována.
- Supernatant byl odstraněn a stacionární fáze byla opláchnuta 100 μ l 2% ACN s 0,1% TFA tak, že zkumavka byla protřepána, odstředěna a supernatant byl odsán.
- V jiné zkumavce byla připravena guanidylační reakční směs, smísením 88 μ l roztoku Na_3PO_4 a 24 μ l roztoku OMIMHS.
- Do zkumavky se stacionární fázi bylo napipetováno 30 μ l guanidylační reakční směsi a zkumavka byla za třepání inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
- Reakce byla zastavena přidáním 5 μ l 5 % TFA, zkumavka byla třepána 5 minut při pokojové teplotě, stočena a tekutina odsáta.
- Stacionární fáze byla dvakrát opláchnuta 2% ACN s 0,1% TFA.
- Ke stacionární fázi bylo napipetováno 30 μ l roztoku SPITC, zkumavka byla za neustálého třepání inkubována při 55 °C po dobu 2 hodin.
- Reakce byla zastavena přidáním 5 μ l 5% TFA, zkumavka byla třepána 5 minut při pokojové teplotě, stočena a tekutina odsáta.
- Stacionární fáze byla dvakrát opláchnuta 2% ACN s 0,1% TFA.
- Eluce byla provedena napipetováním 20 μ l 80% ACN s 0,1% TFA, zkumavka byla třepána 10 minut při pokojové teplotě, odstředěna a eluát odebrán do čisté zkumavky. Ke stacionární fázi bylo znovu přidáno 20 μ l 80% ACN s 0,1% TFA zkumavka byla třepána 10 minut při pokojové teplotě, odstředěna a eluát přidán k prvnímu podílu eluátu.
- Směs eluátů byla poté adekvátně zředěna, napipetován na MALDI destičku po 0,5 μ l a spoty byly převrstveny 0,8 μ l matrice.
- Byla provedena analýza pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

3.4.6 Dimethylace tryptických peptidů myoglobinu za použití lehkého a těžkého formaldehydu značeného deuteriem na stacionární fázi v kolonce

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: tryptické peptidy myoglobinu, 10 µg rozpuštěno ve 25 µl 0,1% TFA
- 2% a 80% ACN s 0,1 % TFA
- Roztok O-methylisomočoviny hemisulfát (OMIMHS) – 50 mg rozpuštěno v 51 µl deionizované vody (dH₂O)
- 0,72 M roztok Na₃PO₄
- 0,1 % TFA
- 260 mM NaBH₃CN (16,3 mg rozpuštěno v 1 ml 0,1 M octanu sodném o pH 5,2)
- 4% lehký a deuterovaný formaldehyd (koncentrovaný formaldehyd byl zředěn 0,1 M octanem sodným o pH 5,2)
- Matrice: kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), 3 mg/1 ml 70% ACN s 0,1% TFA
- Kolonka s reverzní stacionární fází Kinetex EVO-C18, 2,6 µm částice
- Mikrostříkačka o objemu 25 µl
- Stojan, upravený pro zavěšení mikrostříkačky
- Závaží – dvě velikosti pro kontrolu průtoku mobilní fáze
- Digestoř
- MALDI destička

Postup:

- Na kolonce byla provedena guanidylace peptidů podle návodu z 3.4.1, bez eluce, modifikované peptidy zachycené na kolonce byly po reakčním kroku propláchnuty 10 µl 0,1 % TFA.
- Následující kroky (tj. práce s formaldehydem a kyanoborohydridem sodným) byly prováděny v digestoři!
- Mikrostříkačka byla propláchnuta NaBH₃CN a následně bylo nejprve natáhnuto 5 µl NaBH₃CN a hned za to 4% formaldehyd (lehký či deuterovaný), tudíž formaldehyd byl jako první v kolonce.
- Mikrostříkačka s kolonkou byla zavěšena do stojanu a byl nastaven takový průtok, aby reakční směs protékla za 5–10 minut.
- Kolonka byla propláchnuta 10 µl 0,1% TFA a následně 20 µl 2% ACN s 0,1% TFA.
- Eluce byla provedena 10 µl 80% ACN s 0,1% TFA do 0,5 ml zkumavky.

- Eluát byl adekvátně zředěn ACN na koncentraci 0,5 µg/24 µl , nejprve byly na MALDI destičku naneseny po 0,5 µl separátně peptidy modifikované lehkým a deuterovaným formaldehydem. Poté byly oba eluáty smíseny v poměru 1:1 a také naneseny po 0,5 µl na destičku. Spoty byly překryty 0,8 µl matrice a analyzovány pomocí MALDI-TOF MS.

3.4.7 Esterifikace tryptických peptidů myoglobinu v roztoku

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: tryptické peptidy myoglobinu, 1 µg vysušený v 0,5 ml zkumavce
- Ethanol
- Acetylchlorid
- 2% ACN s 0,1% TFA
- Matrice: kyselina α-kyano-4-hydroxysořicová (CHCA), 3 mg/1 ml 70% ACN s 0,1% TFA
- MALDI destička

Postup:

- Reakční směs byla vytvořena smísením 125 µl ethanolu s 20 µl acetylchloridu. Bylo nutné pracovat v digestoři, ethanol s acetylchloridem bouřlivě reaguje.
- Do zkumavky s vysušeným 1 µg tryptických peptidů myoglobinu (získáno rozpipetováním původního 10 µg vzorku, zkumavky byly vysušeny v koncentrátoru) bylo napipetováno 50 µl reakční směsi.
- Směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 2 hodin.
- Směs byla vysušena v koncentrátoru a následně rozpuštěna v 50 µl 2% ACN s 0,1% TFA a nanesena na MALDI destičku po 0,5 µl. Spoty byly překryty 0,8 µl matrice.
- Spoty byly následně analyzovány pomocí MALDI-TOF MS.

3.5 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly

3.5.1 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na TiO₂ částicích ve zkumavce

Chemikálie a materiál:

- Vzorek: Modifikované tryptické peptidy myoglobinu dle protokolu 3.4.3
- 1% NH₄OH

- 80% ACN s 0,1% TFA
- 5% TFA
- Titansphere TiO₂ beads, 5 µm částice, 100 mg resuspendováno v 500 µl ACN
- Kolonka s reverzní stacionární fází Kinetex EVO-C18, 2,6 µm částice
- Mikrostříkačka o objemu 25 µl
- Stojan, upravený pro zavěšení mikrostříkačky
- Závaží – dvě velikosti pro kontrolu průtoku mobilní fáze
- Vakuový koncentrátor
- MALDI destička

Postup:

- Do 0,5 ml zkumavky byl napipetován 1 µl TiO₂ částic.
- Částice byly opláchnuty nejprve 100 µl 1% NH₄OH (zkumavka protřepána, odstředěna a tekutina odsáta) a poté dvakrát 80% ACN s 0,1% TFA.
- K opláchnutým částicím bylo přidáno 80 µl 80% ACN s 0,1% TFA.
- Peptidy (10 µg) modifikované dle protokolu 3.4.3 na kolonce s reverzní fází C18 byly vyeluovány 20 µl 80% ACN s 0,1% TFA přímo do zkumavky s připravenými TiO₂ částicemi.
- Zkumavka s TiO₂ částicemi byla inkubována za stálého třepání po dobu 10 minut při pokojové teplotě, zkumavka byla následně odstředěna a tekutina odsáta.
- Částice byly opláchnuty dvakrát 100 µl 80% ACN s 0,1% TFA, zbytek neodsáté tekutiny byl vysušen v koncentrátoru.
- K suchým částicím bylo napipetováno 50 µl 1% NH₄OH, protřepáno, stočeno a eluát byl odebrán do čisté zkumavky.
- Eluát byl okyselen přibližně 20 µl 5% TFA (aby bylo pH<5) a odsolen na kolonce s reverzní stacionární fází.
- Peptidy byly z kolonky vyeluovány 5 µl 80% ACN s 0,1% TFA, eluát byl adekvátně zředěn a nanesen po 0,5 µl na MALDI destičku. Spoty byly převrstveny 0,8 µl matrice.
- Vzorky byly analyzovány pomocí MALDI-TOF MS.

3.5.2 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na PolyWAX LP stacionární fází v kolonce

Chemikálie a pomůcky:

- Vzorek: Modifikované tryptické peptidy myoglobinu dle protokolu 3.4.3

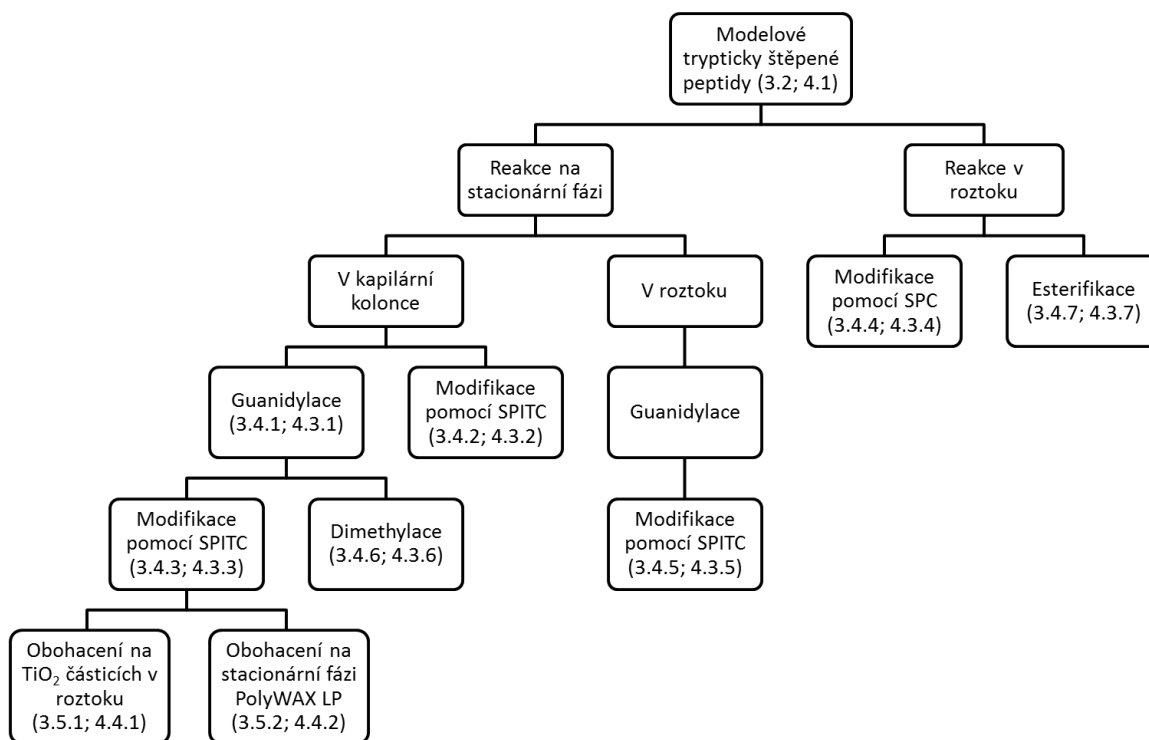
- Roztok A: 20 mM mravenčan amonný se 80% ACN, připraven smísením 280 μ l dH₂O, 20 μ l 1 M mravenčanu amonného (pH 2,2) a 800 μ l ACN
- Roztok B: 900 mM mravenčan amonný s 10 % ACN, připraven smísením 900 μ l 1 M mravenčanu amonného (pH 2,2) a 100 μ l ACN
- Kolonka se stacionární fází PolyWAX LP
- Mikrostríkačka o objemu 25 μ l
- Stojan, upravený pro zavěšení mikrostríkačky
- Závaží – dvě velikosti pro kontrolu průtoku mobilní fáze
- MALDI destička

Postup:

- Peptidy modifikované na kolonce (10 μ g) s reverzní fází C18 podle protokolu 3.4.3 byly vyeluovány 10 μ l roztoku A do 0,5 ml zkumavky; před elucí byla kolonka profouknuta vzduchem, pro odstranění nadbytečné vody.
- Celý eluát byl natažen do stríkačky a protlačen kolonkou se stacionární fází PolyWAX LP.
- Proplach kolonky byl proveden 8 μ l roztoku A.
- Eluce byla provedena protlačením 8 μ l roztoku B kolonkou, eluát byl sbírán do 0,5 ml zkumavky.
- Eluát byl adekvátně zředěn a nanesen na MALDI destičku, spoty byly překryty 0,8 μ l matrice a destička byla analyzována pomocí MALDI-TOF MS.

4 Výsledky a diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vyzkoušet vybrané modifikační metody pro snadnější *de novo* sekvenaci peptidů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie a pokusit se tyto metody dle možností převést do formátu derivatizace peptidů zachycených na stacionární fázi v kolonce. Tuto kolonku si lze velice snadno připravit v laboratorních podmínkách, její náklady jsou výrazně nižší než cena běžně komerčně dodávaných kapilárních kolonek. Mezi hlavní výhody tohoto formátu provedení modifikační reakce se řadí menší spotřeba vzorku a reagensů, snazší odstranění reakčních činidel prostým propláchnutím kolonky a možnost chromatografické separace modifikovaných peptidů pomocí mikrogradientu elučního činidla z této kolonky rovnou na MALDI destičku. Tyto kolonky mohou obsahovat širokou paletu dostupných stacionárních fází, ať už je naším cílem modifikace a separace peptidů na fázi C18, nebo chceme obohatit již modifikované peptidy pro dosažení lepší odezvy v hmotnostním spektrometru. Posloupnost a souvislost experimentů provedených v této práci popisuje *Obrázek 23* kde je práce rozdělena na experimenty prováděné na stacionární fázi zakotvené v kolonce, na experimenty prováděné na volné stacionární fázi v roztoku a experimenty prováděné v roztoku. Je zde také vidět, jakou mají jednotlivé experimenty mezi sebou návaznost a jsou uvedena čísla kapitol protokolu a diskuze konkrétního experimentu.



Obrázek 23. Posloupnost provedených experimentů a čísla kapitol protokolů a diskuze v této práci

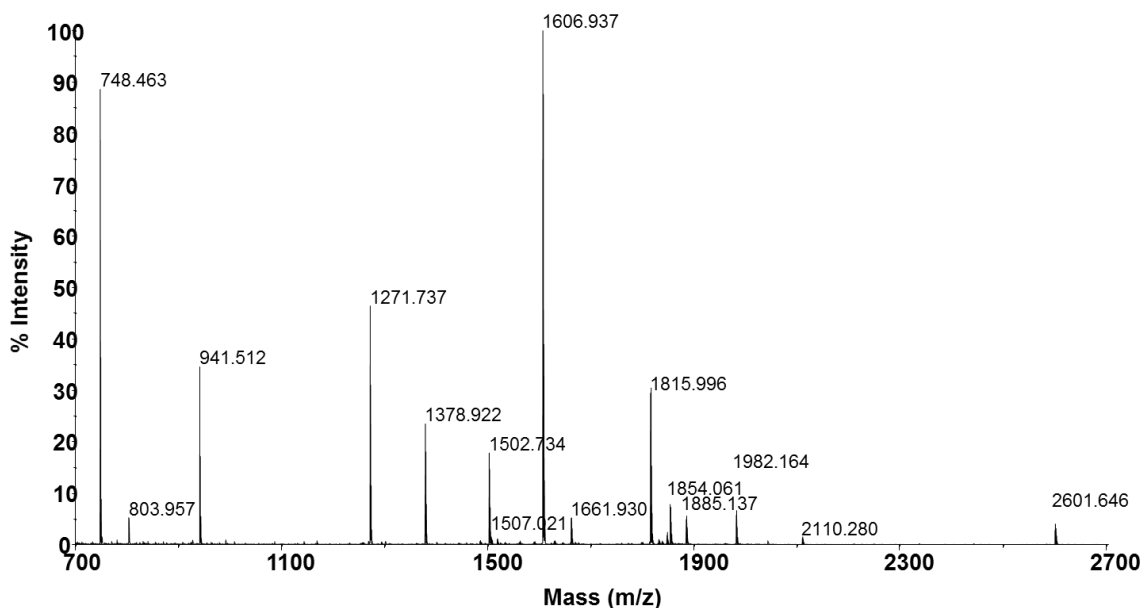
4.1 Příprava modelového vzorku tryptických peptidů myoglobinu

Pro přípravu modelového vzorku tryptických peptidů myoglobinu byl použit optimalizovaný postup z diplomové práce Bc. Jitky Vítové, která vycházela z prací Lin et al. z roku 2008 a 2010 [17, 20, 58]. V tomto protokolu byla po digesci přidána vychlazená 5% TFA, která usnadnila vysrážení a sedimentaci deoxycholátu sodného (DOCS), jež je třeba odstranit ze vzorku před hmotnostně-spektrometrickou analýzou.

Další nečistoty (např. soli) byli ze směsi peptidů po digesci myoglobinu odstraněny pomocí SPE purifikace na reverzní fázi. Purifikovaný roztok peptidů myoglobinu byl rozpipetován do 0,5 ml zkumavek po 10 µg, zkumavky vysušeny ve vakuovém koncentrátoru a vzorky byly uchovávány při -20°C . Byla provedena kontrola průběhu digesce pomocí analýzy na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. Jak je patrné ze spektra (*Obrázek 24*), m/z hodnoty píků odpovídali teoreticky zjištěným hodnotám peptidů získanými pomocí softwaru mMass ze sekvence myoglobinu (UniProtKB: P68082). *Tabulka 2* obsahuje teoretické m/z hodnoty peptidů (pro náboj 1+) pozorovaných ve spektru směsi tryptických peptidů myoglobinu spolu s aminokyselinovou sekvencí peptidů. Do této tabulky byly taky zaznamenány teoretické hodnoty m/z peptidů modifikovaných námi zvolenými modifikačními činidly. Celou tabulku se všemi teoretickými m/z hodnotami možných tryptických peptidů z myoglobinu s maximálně dvěma vynechanými štěpnými místy lze nalézt v příloze (*Příloha 1*).

Tabulka 2. Přehled pozorovaných tryptických peptidů myoglobinu. Tabulka obsahuje aminokyselinové sekvence peptidů, počet vynechaných štěpných míst a teoretické m/z hodnoty peptidů (1+) bez modifikace i po modifikaci různými činidly použitých v prováděných experimentech.

Aminokyselinová sekvence peptidu	Počet vynechaných štěpných míst	Hodnoty m/z (1+)						
		Bez modifikace	Typ reakčního činidla					
			OMIMHS	SPITC	OMIMHS a SPITC	SPC	OMIMHS a CH ₂ O+ NaBH ₃ CN	CH ₃ CH ₂ OH
ALELFR	0	748,4352	748,4352	963,4063	963,4063	947,4291	776,4665	804,4978
YKELGFQG	1	941,4727	983,4945	1156,4438	1198,4656	1140,4666	1011,5258	997,5353
LFTGHPETLEK	0	1271,6630	1313,6848	1486,6341	1528,6559	1470,6569	1341,7161	1355,7569
HGTVVLTALG GILK	0	1378,8417	1420,8635	1593,8128	1635,8346	1577,8356	1448,8948	1406,8730
HPGDFGADAQ GAMTK	0	1502,6693	1544,6911	1717,6404	1759,6622	1701,6632	1572,7224	1586,7632
KHGTVVLTAL GGILK	1	1506,9366	1590,9802	1721,9077	1805,9513	1705,9305	1619,0115	1534,9679
VEADIAGHGQ EVLIR	0	1606,8547	1606,8547	1821,8258	1821,8258	1805,8486	1634,8860	1718,9799
LFTGHPETLEK FDK	1	1661,8533	1745,8969	1876,8244	1960,8680	1860,8472	1773,9282	1773,9785
GLSDGEWQQV LNVWGK	0	1815,9024	1857,9242	2030,8735	2072,8953	2014,8963	1885,9555	1899,9963
GHHEAELKPL AQSHATK	0	1853,9617	1895,9835	2068,9328	2110,9546	2052,9556	1924,0148	1938,0556
YLEFISDAIIHV LHSK	0	1885,0218	1927,0436	2099,9929	2142,0147	2084,0157	1955,0749	1969,1157
KGHHEAELKP LAQSHATK	1	1982,0566	2108,1220	2197,0277	2323,0931	2181,0505	2136,1533	2066,1505
KKGHHEAELK PLAQSHATK	2	2110,1516	2236,2170	2325,1227	2451,1881	2309,1455	2264,2483	2194,2455
HKIPKYLEFIS DAIIHVLHSK	2	2601,4915	2727,5569	2816,4626	2942,5280	2800,4854	2755,5882	2685,5854



Obrázek 24. Hmotnostní spektrum tryptických peptidů myoglobinu

4.2 Purifikace a separace peptidů na stacionární fázi

Pro veškeré experimenty v této diplomové práci prováděné na stacionární fázi v kolonce byly použity v laboratoři vyrobené kolonky naplněné zvolenou stacionární fází. Prvotní investice může být vyšší, jelikož je třeba mít vhodně upravený stojan pro zavěšení mikrostříkačky, dále upravené závaží, které lze použít v tomto stojanu, a potom také potřeba stacionární fáze získané ze zakoupené chromatografické kolony (toto je největší finanční investice). Dále je nutné mít plynotěsnou stříkačku s vhodným zakončením jehly a teflonovou kapiláru, ze které se kolonky vyrobí. Některé věci se běžně v biochemické laboratoři vyskytují (mikrostříkačka, skleněný filtr, jehla, špendlík) a proto je tento systém relativně snadno přenositelný a zavést jej do laboratoře není časově náročná záležitost. Z dlouhodobého hlediska se jedná o výhodnou investici, jelikož celkové náklady na výrobu jedné kolonky jsou v rámci několika málo korun.

4.2.1 Výroba mikrokolonky

Při samotné výrobě kolonky je třeba dbát na určitý postup. Jelikož se na kolonku nasazuje mikrostříkačka, na kterou je vyvíjen tlak, je nutné hrdlo rozšířit špendlíkem tak, aby šlo pevně mikrostříkačku spojit s kolonkou, aniž by došlo k rozpojení v průběhu protlačování reagensů. Na druhém konci kolonky je důležité vytáhnout kapiláru kombinačními kleštěmi, aby se koncový vnitřní průměr kolonky zúžil a šel tak snadno usadit skleněný filtr. Tento filtr je důležitou součástí, neboť zabraňuje úniku částic stacionární fáze. Dalším důležitým krokem je správně zvolené množství stacionární fáze, které je dáno do připravené kapiláry. To se odvíjí

od velikosti jejích částic a zamýšlené délce připravované kolonky. Různě velké částice kladou různý odpor mobilní fázi a je potřeba zajistit, aby s daným závažím byl dosažen přiměřený průtok okolo 3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Například pro dosažení tohoto průtoku u stacionární fáze Kinetex EVO-C18, kdy částice mají průměr 2,6 μm , je zapotřebí, aby fáze zabírala přibližně 15–20 mm kapiláry, naopak u fáze Titansphere či PolyWAX bylo zapotřebí, aby fáze zabírala alespoň 40 mm kapiláry. Rychlost průtoku je ovlivnitelná také velikostí použitého závaží. Při nanášení stacionární fáze je mj. důležité, aby stacionární fáze byla na počátku kapiláry zarovnaná a homogenně usazená, neboť nerovně usazená fáze může vést k horší chromatografické separaci.

4.2.2 Výběr stacionární fáze

Jako další krok bylo zapotřebí vybrat vhodnou stacionární fázi. V předchozí práci Bc. Jitky Vítové byla používána fáze Ascentis ES-C18 s velikostí částic 2,7 μm . Naším cílem bylo se pokusit tuto fázi nahradit fází Kinetex EVO-C18 s velikostí částic 2,6 μm . Důvodem pro změnu stacionární fáze byla vyšší odolnost fáze Kinetex EVO-C18 vůči bazickému prostředí, kterému bude v následujících experimentech často vystavována. Pro porovnání byla ještě k testování přidána fáze Aeris Peptide XB-C18 s velikostí částic 3,6 μm . Pro samotný experiment byly použity tři kolonky, každá s jinou testovanou fází, a byla provedena separace na MALDI destičku podle protokolu 3.3.2.

Nové kolonky s všemi 3 stacionárními fázemi byly před použitím propláchnuty 20 μl methanolu. Následná separace peptidů ukázala, že fáze Ascentis ES-C18 a Kinetex EVO-C18 vykazují velice podobnou účinnost. Spektra získaná separací na fázi Aeris XB-C18 však postrádala některé píky. Z tohoto důvodu byl pro následující experimenty prováděné na stacionární fázi C18 v kolonce zvolen typ fáze Kinetex EVO-C18, jež by také měl být nejdolnější vůči působení roztoků s vyšším pH.

4.3 Modifikační reakce

Modifikace peptidů za účelem dosažení snadnější interpretace tandemových hmotnostních spekter pro *de novo* sekvenaci proteinů je jedním z účinných způsobů, jak stanovit pořadí aminokyselin proteinu. V této diplomové práci byla zaměřena pozornost především na guanidylaci, modifikaci sulfonovanými činidly a dimethylaci. Cílem bylo zopakovat již optimalizované postupy, a vyzkoušet nové alternativy, jak peptidy modifikovat. Dále bylo také vyzkoušeno obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly dvěma

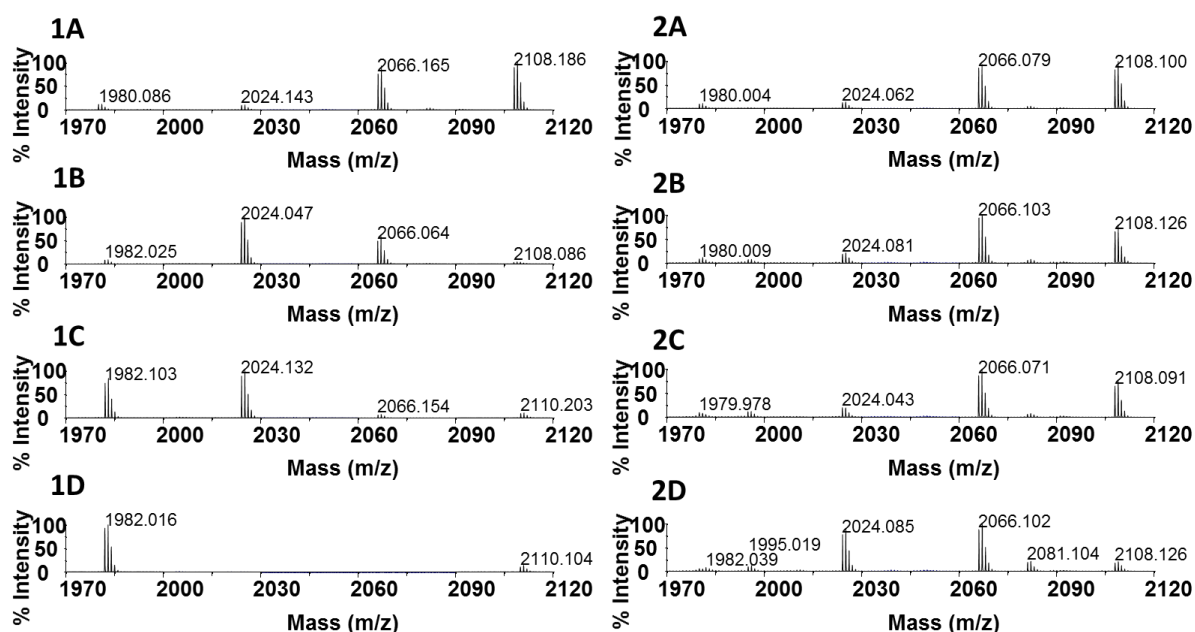
různými metodami a modifikaci ethylesterifikací. Obecnou snahou bylo převést veškeré reakční kroky z mikrozkušavky na stacionární fázi se zachycenými peptidy.

4.3.1 Guanidylace tryptických peptidů myoglobinu na kolonce

Prvotní pokusy byly provedeny dle postupu v diplomové práci Bc. Jitky Vítové [58], která vycházela z publikace autorů Beardsley a Reilly z roku 2002 [59]. V tomto postupu byl použit jako pufr pro guanidylační směs 14 % NH_4OH . Nejprve byla pomocí tohoto experimentu ověřena funkčnost nové stacionární fáze Kinetex EVO-C18. Následnou analýzou v hmotnostním spektrometru bylo zjištěno, že se peptidy účinně zachytávají na stacionární fázi, průtok reakční směsi je neuvolňuje ze stacionární fáze a po eluci nedochází k zanášení kolony vzorkem z předchozí reakce.

Dále byla provedena série experimentů pro optimalizaci reakční doby, kdy byly použity reakční doby 10, 30 a 60 minut. Spektra takto modifikovaných peptidů napovídala, že reakční činidlo, které bylo použito pro všechny tři reakce, podléhá rychlé degradaci již po pár desítkách minut a jeho účinnost se tím snižuje. Proto vznikla potřeba najít vhodnější pufr, který by dostatečně zajistil zásadité prostředí o $\text{pH} > 10$ a neobsahoval primární aminovou skupinu (ve srovnání s doporučenými hydroxidem amonným v publikaci [59]), která by reagovala s OMIMHS. Těmto podmínkám vyhovoval 0,5 M roztok Na_2CO_3 (použitý též v [59]) a 0,72 M roztok Na_3PO_4 . Ve spektrech peptidů modifikovaných reakční směsí s pufrům Na_2CO_3 se ve zvýšené míře objevovali nežádoucí píky +15 m/z jednotek oproti původní m/z hodnotě modifikovaného peptidu, proto byl tento pufr z následujících experimentů vyloučen. Pufry NH_4OH a Na_3PO_4 byly dále porovnány s ohledem na jejich stabilitu v čase. Oba roztoky byly připraveny čerstvé těsně před začátkem reakčního kroku první modifikace a byla provedena modifikace peptidů na stacionární fázi v kolonce, která trvala 15 minut. Následně byly obě reakční směsi ponechány stát 1,5 hodiny při pokojové teplotě na laboratorním stole a znovu s nimi byla provedena modifikace peptidů. Modifikační reakce byla dále provedena 3,5 h a 23 h po přípravě reakční směsi. Porovnáním spekter (*Obrázek 25.*) lze sledovat účinnosti reakce za použití jednotlivých pufrů v závislosti na stáří připravené reakční směsi. Pro ukázkou byl vybrán peptid KGHHEAELKPLAQSHATK s $m/z = 1982,0566$, který má 2 vynechaná štěpná místa a pro úplnou modifikaci potřebuje přeměnu všech 3 lysinových zbytků (očekávaná m/z po modifikaci všech lysinových zbytků je 2108,1220); peptidy s teoretickými $m/z = 2024,0784$ a s $m/z = 2066,1002$ jsou pouze produkty částečné modifikace. Na spektrech 1A až 1D je porovnána degradace reakční směsi s pufrům NH_4OH (1A – čerstvá reakční směs; 1B – 1,5 h stará směs; 1C – 3,5 h stará směs; 1D – 23 h stará směs), kde bylo potvrzeno, že tato reakční směs

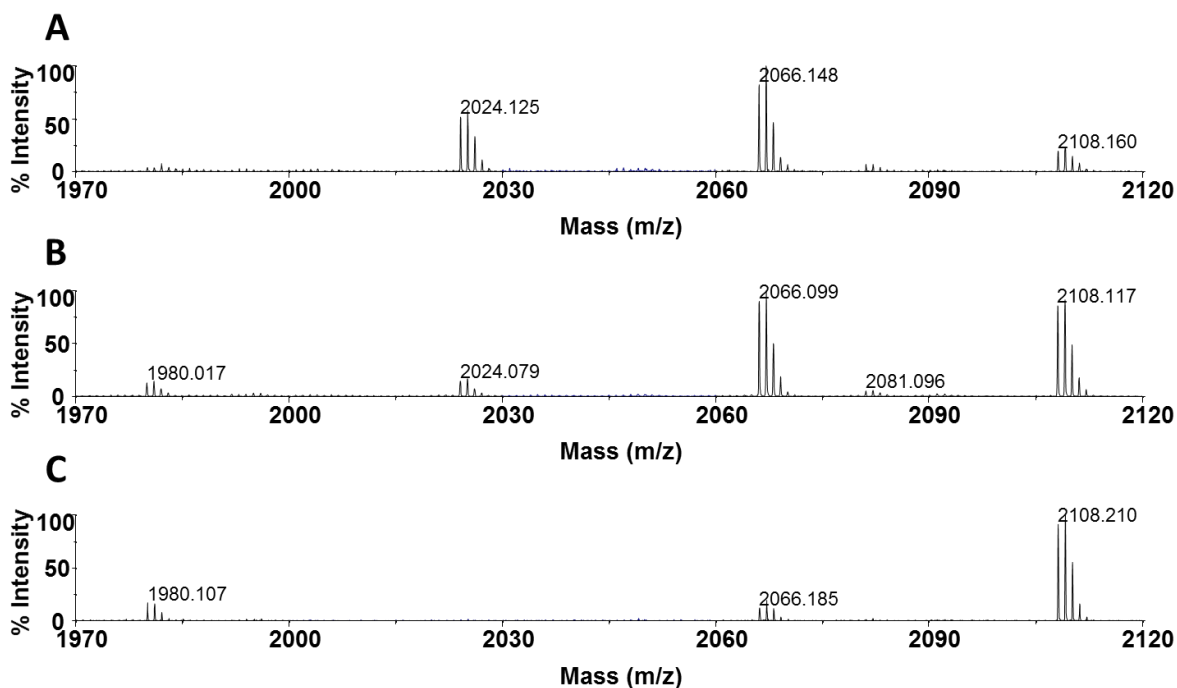
podléhala velmi rychlé degradaci již v první hodině a po 23 hodinách nevykazovala téměř žádnou reaktivitu, protože sledovaný peptid nebyl vůbec modifikovaný. Na spektrech 2A až 2D je analogicky porovnána reaktivita reakční směsi obsahující pufr Na_3PO_4 (2A – čerstvá reakční směs; 2B – 1,5 h stará směs; 2C – 3,5 h stará směs; 2D – 23 h stará směs). Zde je patrné, že reakční směs vykazovala mnohem vyšší stabilitu v čase, byť reakce s čerstvě připravenou směsí v NH_4OH probíhá o něco rychleji než v Na_3PO_4 pufru (Obrázek 25, část 1A a 2A). Nicméně v porovnání s amonným pufrem je stabilita této reakční směsi stále lepší a i po 23 hodinách má reakční směs stále schopnost alespoň částečně modifikovat peptid, což je výhodné obzvláště pro reakce probíhající delší dobu než několik minut. Proto byl roztok 0,72 M Na_3PO_4 zvolen jako vhodný pufr pro guanidylační směs.



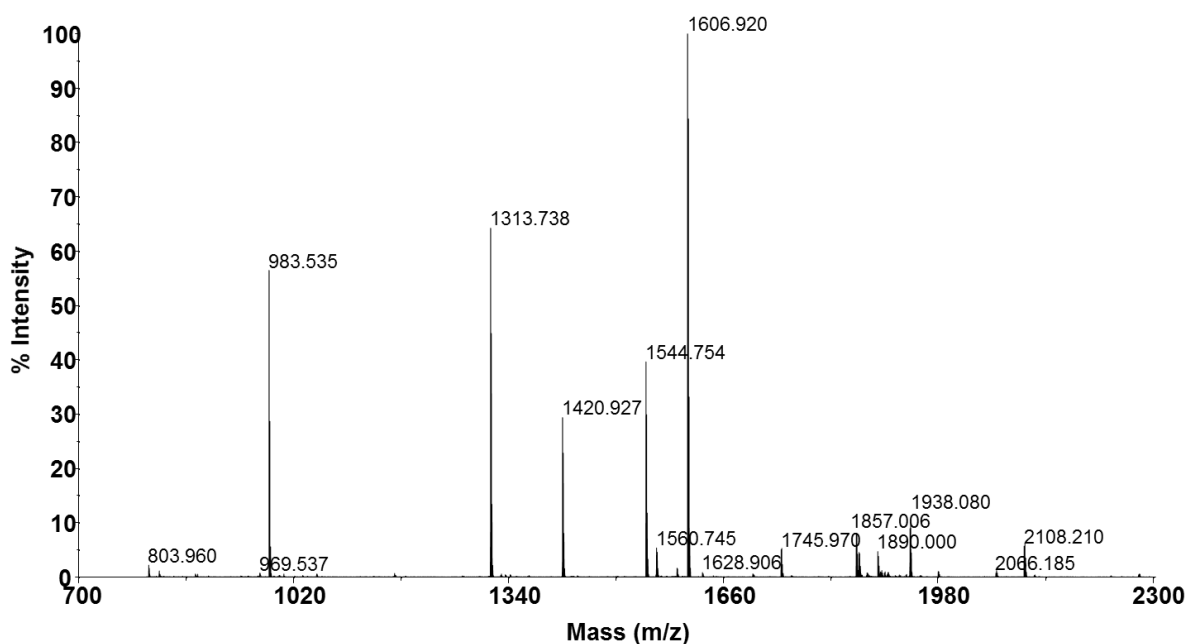
Obrázek 25. Porovnání pufrů pro guanidylaci v kolonce. Spektra 1A – 1D jsou pro reakční směs s pufrem NH_4OH ; spektra 2A – 2D jsou pro reakční směs s pufrem Na_3PO_4 . Stáří reakčních směsí: spektra 1A a 2A jsou čerstvé reakční směsi, 1B a 2B jsou 1,5 h staré reakční směsi, 1C a 2C jsou 3,5 h staré reakční směsi a 1D a 2D jsou 23 hodin staré reakční směsi.

Pro pufr Na_3PO_4 byla následně provedena optimalizace reakční doby, kdy byly zvoleny doby inkubace 10, 15 a 30 minut. Porovnání spekter stejného vzorového píku (viz Obrázek 25) ukázalo průběh reakce v čase (Obrázek 26; spektrum A – 10 minut; spektrum B – 15 minut; spektrum C – 30 minut). Z porovnání spekter je patrné, že reakční doba 30 minut je optimální a dostačující pro většinu peptidů – viz spektrum peptidů po reakci trvající 30 minut (Obrázek 27); píky ve spektrech s $m/z = 1980$ pochází z jiného peptidu. Proto byla tato reakční doba zvolena pro všechny následující experimenty, kde bylo třeba guanidylace postranních lysinových řetězců. Delší působení reakční směsi na peptidy není vhodné, neboť by docházelo

k nežádoucí modifikaci N-konců peptidů. Ve srovnání s původním spektrem nemodifikovaných tryptických peptidů myoglobinu (Obrázek 24), došlo u peptidů obsahujících lysin (viz Tabulka 2) ke zvýšení hmotnosti peptidu o 42,022 Da za každý obsažený aminokyselinový zbytek lysinu.



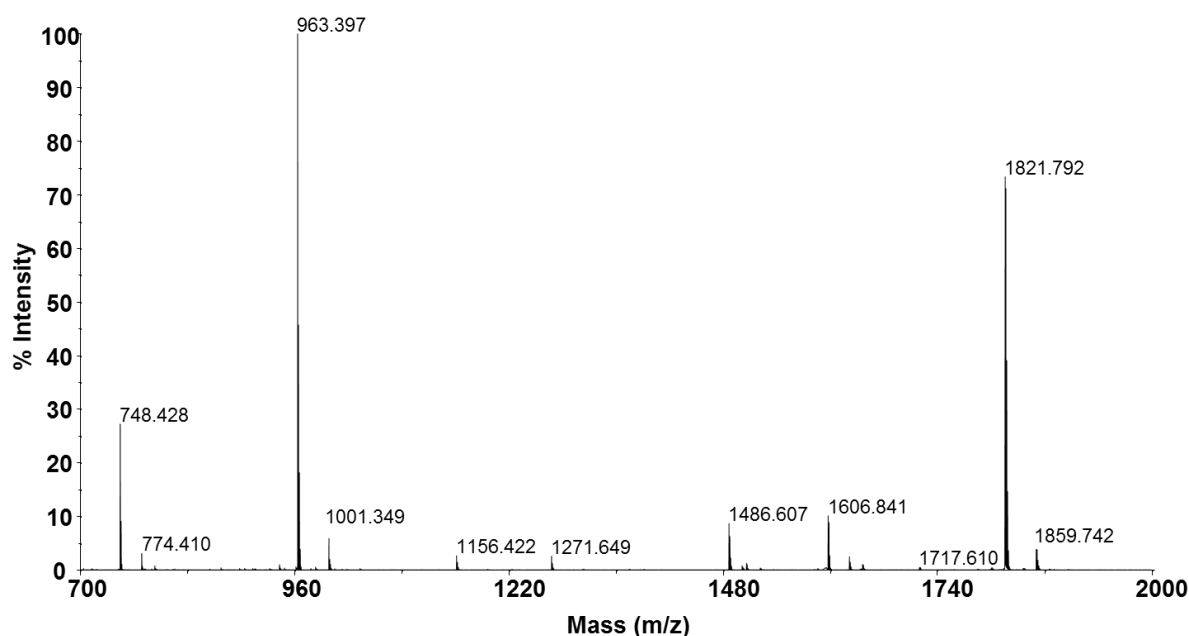
Obrázek 26. Porovnání účinnosti guanidylní směsi při reakci na stacionární fázi v kolonce. Spektra ukazují závislost reakce v čase s pufrům Na_3PO_4 na peptidu GHHEAELKPLAQSHATK. Spektrum A – inkubace 10 minut, spektrum B – inkubace 15 minut, spektrum C – inkubace 30 minut.



Obrázek 27. Spektrum tryptických peptidů myoglobinu guanidylovaných 30 minut na stacionární fázi v kolonce.

4.3.2 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v kolonce

V tomto kroku bylo cílem ověřit, že derivatizace peptidů pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu bude probíhat i na nově zvolené stacionární fázi. Byl proto aplikován optimalizovaný postup z diplomové práce Bc. Jitky Vítové [58], která dále vycházela z práce Wang et al. z roku 2004 [45]. Použitá reakční doba pro reakci na kolonce byla 120 minut při teplotě 55 °C. Podle posunu m/z hodnot píků ve spektru peptidů modifikovaných pomocí SPITC o hodnotu 214,9711 Da oproti původní m/z hodnotě je patrné, že reakce proběhla úspěšně. Nicméně některé peptidy (např. s m/z 1271 a 1606) nebyly kompletně modifikované a některé nemodifikované peptidy byly ve spektru stále přítomny (Obrázek 28).



Obrázek 28. Spektrum peptidů trypticky štěpeného myoglobinu modifikovaných pomocí SPITC po dobu 120 minut při 55 °C na stacionární fázi v kolonce.

Drobnou modifikací původního protokolu byla výměna 5% TFA za 0,1% TFA, používané pro proplach po reakčním kroku. Důvod je podrobněji rozebrán v kapitole 4.4.1, kdy bylo pozorováno, že 5% TFA nám po určité době způsobuje částečnou Edmanovu degradaci peptidů modifikovaných SPITC.

4.3.3 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu guanidylací a následně pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v kolonce

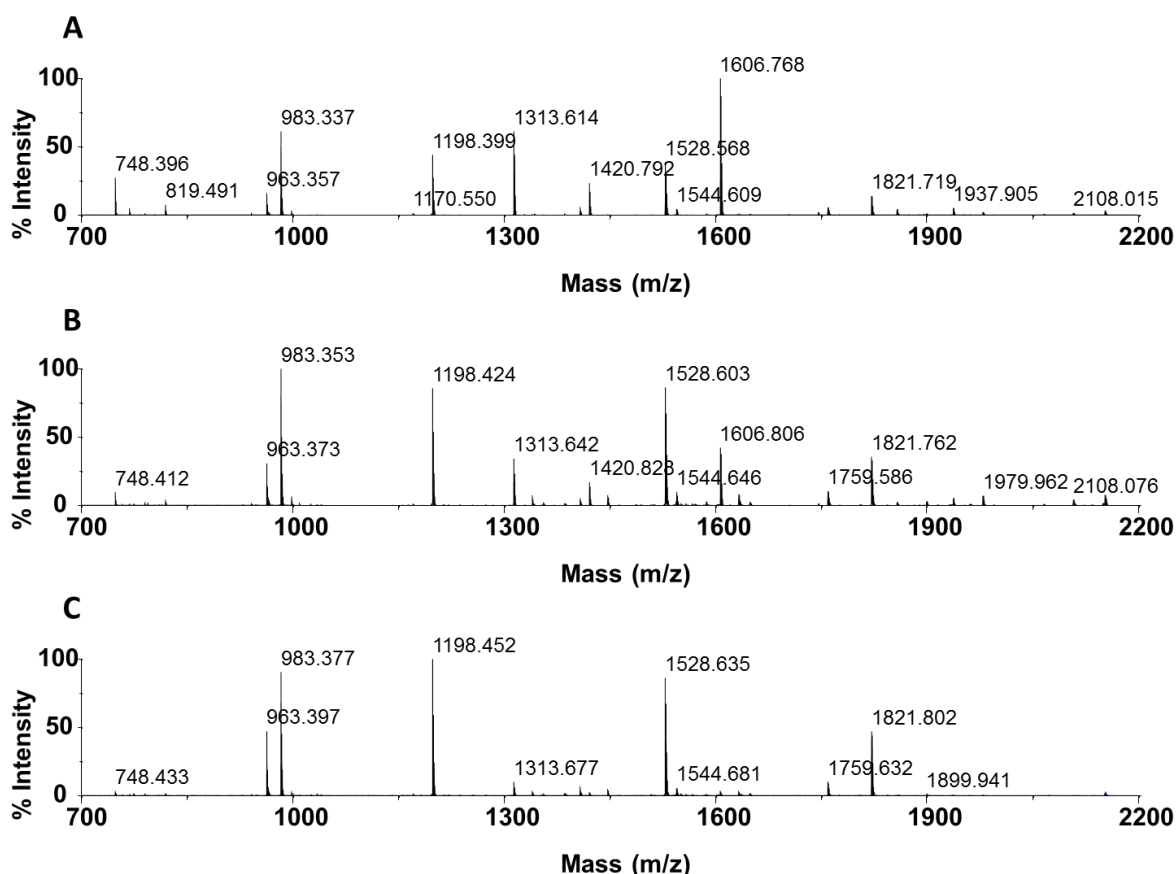
Další částí experimentů bylo spojit za sebou guanidylační reakci s modifikací pomocí SPITC na peptidech zachycených na stacionární fázi v kolonce tak, aby nejprve došlo

k zablokování ϵ -aminových skupin lysinů pomocí guanidylylace a následně k modifikaci N-konců peptidů pomocí SPITC. Spojení guanidylylace a modifikace pomocí SPITC je popsáno mj. v článku Chen *et al.* z roku 2004 [46]. V této diplomové práci byly tyto modifikace provedeny v kapilární kolonce naplněné stacionární fází Kinetex EVO-C18 (2,6 μ m, typ core-shell). Po modifikačních reakcích by měly téměř všechny peptidy vykazovat m/z hodnotu vyšší o $|L| \cdot 42,0218 + 214,9711$, kdy $|L|$ je počet lysinů v peptidu. *Tabulka 2* obsahuje tyto teoretické hodnoty.

Nejprve byla provedena optimalizace reakční doby pro modifikační krok s SPITC pro ověření skutečnosti, že 120 minut při 55 °C je dostačující. Byly vybrány časy 30, 60 a 120 minut při teplotě 55 °C a pro SPITC derivatizaci byly použity peptidy guanidylované na stacionární fázi v kolonce po dobu 30 minut v Na₃PO₄ pufru. *Obrázek 29* zobrazuje spektra modifikovaných peptidů po různě dlouhou reakční dobu. Spektrum A ukazuje modifikaci peptidů pomocí SPITC po dobu 30 minut, spektrum B po dobu 60 minut a spektrum C po dobu 120 minut. Lze pozorovat, že v případě reakční doby SPITC 30 a 60 minut jsou guanidylované peptidy derivatizovány podstatně méně než po 120 minutách, kdy ve spektru převládají peptidy modifikované pomocí SPITC. Tato skutečnost je např. vidět na guanidylovaných peptidech s teoretickou m/z hodnotou 1313,6848 a 1606,8547, které se po modifikaci s SPITC mění na píky s teoretickou m/z hodnotou 1528,6559 a 1821,8258.

To, že se ve spektru stále vyskytují některé píky odpovídající nederivatizovaným peptidům pomocí SPITC, nemusí nutně znamenat málo účinnou modifikaci s SPITC, ale může to též být způsobeno horší ionizovatelností peptidů majících sulfoskupinu (v pozitivním módu) ve srovnání s ionizovatelností peptidů postrádajících navázanou sulfoskupinu. Snížení ionizovatelnosti peptidů modifikovaných pomocí SPITC bylo vyhodnoceno pro peptidy modifikované pomocí SPITC, které nepodléhaly guanidylylaci, neboť pro peptidy mající lysinový zbytek podléhající guanidylylaci nebyl k dispozici definovaný přídatek standardních guanidylovaných tryptických peptidů myoglobinu. V provedeném porovnání byly změřeny plochy píky původního nemodifikovaného a komplementárního modifikovaného peptidu ze vzorku po provedené guanidylylační reakci a modifikaci pomocí SPITC. Dále byl změřen stejný vzorek s přidavkem stejného molárního množství nemodifikovaných peptidů jako bylo peptidů vstupujících do derivatizačních reakcí, a byly spočteny poměry ploch nemodifikovaných a modifikovaných píků. Ukázalo se, že modifikace peptidů pomocí SPITC probíhá téměř kvantitativně (99,0 % pro peptid ALELFR a 99,8 % pro peptid VEADIAGHGQEVLR), ačkoliv to tak při prvním pohledu na spektrum (*Obrázek 29*, část C) nevypadá. Může za to právě

snížená ionizovatelnost modifikovaných peptidů, které mají slabší intenzitu píků než původní peptidy, a proto se nemodifikované peptidy jeví stále relativně intenzivní. Poměr ionizovatelnosti modifikovaného peptidu ALELFR vůči nemodifikovanému peptidu vyšla 19.1 %, a v případě peptidu VEADIAGHGQEVLR vyšlo 3,9 %. Výsledné hodnoty účinnosti modifikace a ionizovatelnosti shrnuje *Tabulka 3* a jsou průměrem 6 hodnot vyhodnocených ze 12 spekter, kdy 6 spekter bylo měřeno pro vzorek modifikovaných peptidů a 6 spekter pro vzorek modifikovaných peptidů s definovaným přídatkem nemodifikovaných peptidů.

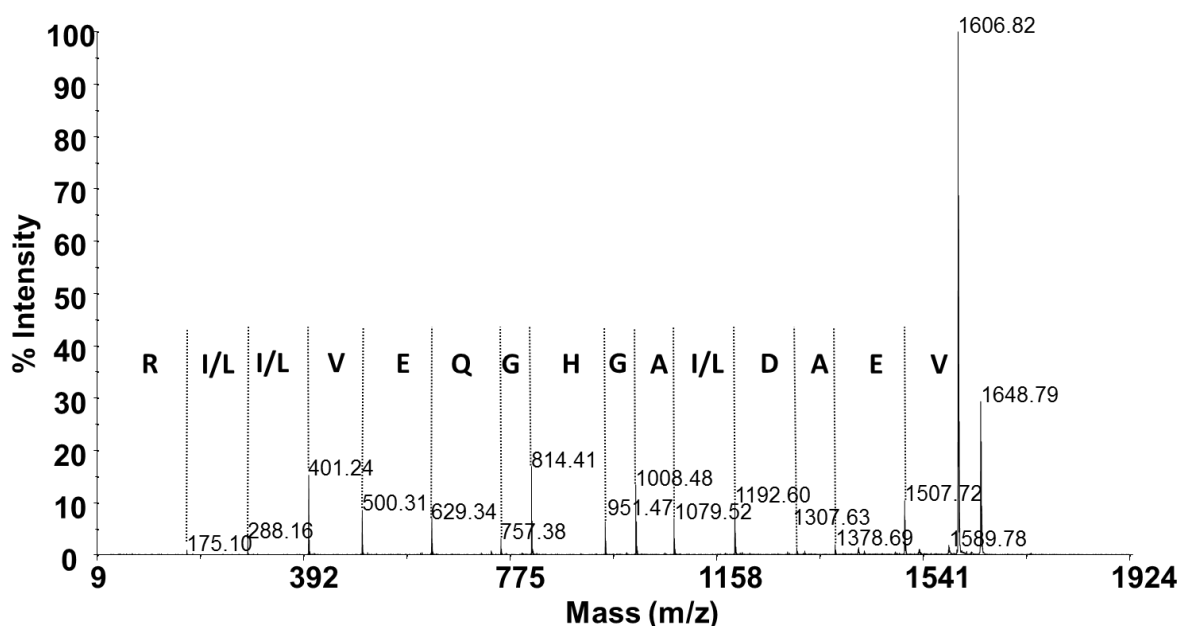


Obrázek 29. Porovnání spekter modifikovaných peptidů guanidylací a následně pomocí SPITC s různou dobou reakce s SPITC (spektrum A – reakce s SPITC 30 minut, spektrum B – reakce s SPITC 60 minut, spektrum C – reakce s SPITC 120 minut; vše při 55 °C)

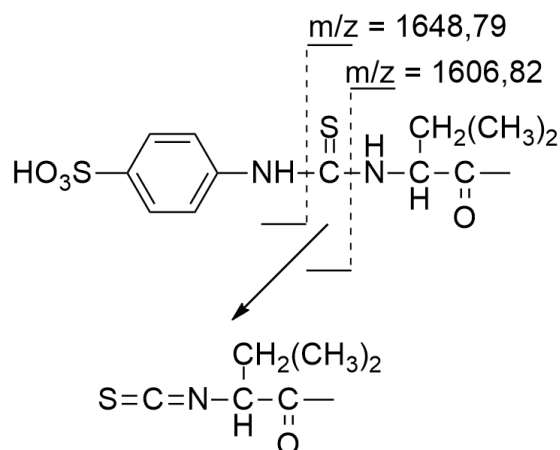
Tabulka 3. Vyhodnocení účinnosti modifikace pomocí SPITC pro peptidy nepodléhající guanidylaci, a jejich ionizovatelnosti.

Aminokyselinová sekvence peptidu	Monoizotopická molekulová hmotnost peptidu bez modifikace	Monoizotopická molekulová hmotnost peptidu po modifikaci pomocí SPITC	Průměrná účinnost reakce	Průměrná ionizovatelnost modifikovaného peptidu oproti peptidu bez modifikace
ALELFR	748,4352	963,4063	90,0 %	19,1 %
VEADIAGHGQEVLR	1606,8547	1821,8258	99,8 %	3,9 %

Modifikace pomocí SPITC peptidů je prováděna pro zjednodušení následného MS/MS spektra derivatizovaného prekurzoru. Proto bylo pro ukázkou *de novo* sekvenace vybráno MS/MS spektrum peptidu s $m/z = 1821.8$ (Obrázek 30) odpovídající peptidu VEADIAGHGQEVLR. Spektrum je snadno interpretovatelné a jak bylo předpokládáno, objevují se zde pouze y -ionty. Typickým jevem pro MS/MS spektrum peptidu modifikovaného pomocí SPITC je intenzivní pík se ztrátou 215 Da vůči prekurzoru, který odpovídá ztrátě modifikačního činidla (zde pík s $m/z = 1606,82$). To má za důsledek snížení intenzity iontů pocházejících z fragmentace peptidického řetězce a spektrum se stává obtížněji vyhodnotitelným, protože některé fragmentové ionty pak mohou zcela chybět. Dalším intenzivním fragmentem v těchto spektrech bývá se ztrátou 173 Da (zde s $m/z = 1648,79$), který odpovídá ztrátě části modifikačního činidla. Obrázek 31 znázorňuje schéma štěpení vazeb v místě navázání SPITC činidla na peptid a vysvětluje vznik fragmentových iontů s výše uvedenými ztrátami (ionty s $m/z = 1606,82$ a s $m/z = 1648,79$).



Obrázek 30. MS/MS spektrum tryptického peptidu myoglobinu (VEADIAGHGQEVLR) modifikovaného pomocí SPITC (m/z prekurzoru 1821,8).



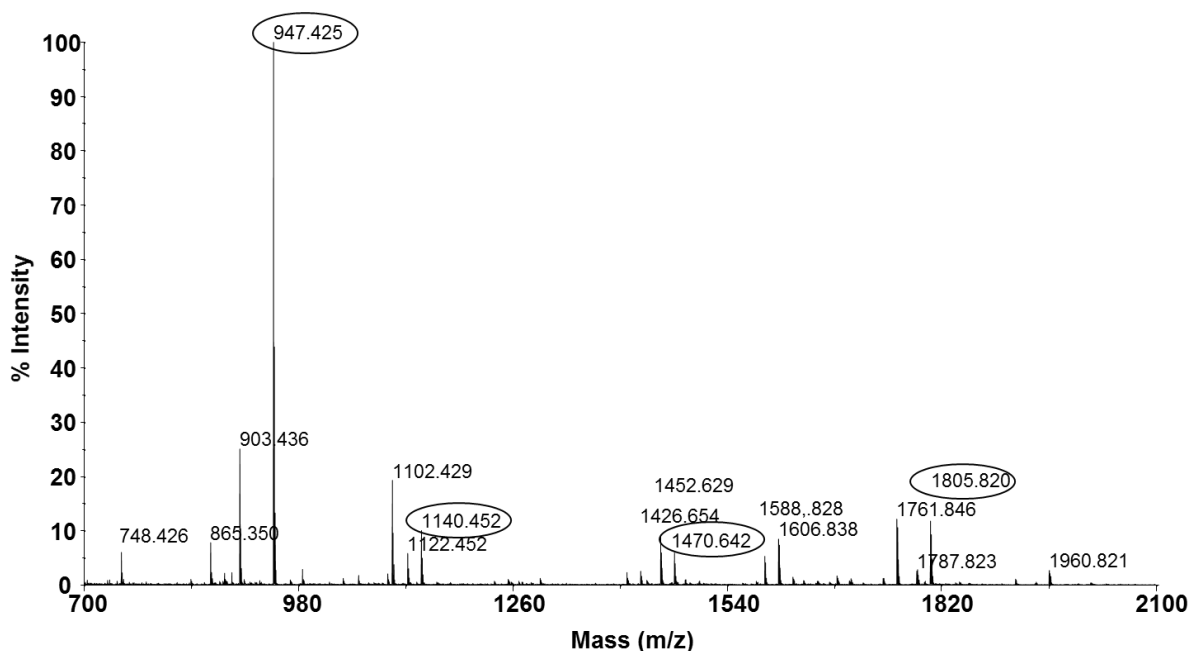
Obrázek 31. Schéma znázorňující místa štěpení vazeb mezi peptidem a navázaným modifikačním činidlem SPITC.

4.3.4 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu pomocí 4-chlorosulfofenylisokyanátu v roztoku

V předchozí kapitole bylo uvedeno, že SPITC derivatizované peptidy se nejnáze fragmentují odštěpením SPITC činidla (Obrázek 30). To v důsledku způsobuje menší intenzitu informativních fragmentových iontů vznikajících štěpením peptidických vazeb v molekule peptidu a tím snížení kvality MS/MS spektra. V publikaci Shin *et al.* z roku 2007 bylo pro modifikaci peptidů použito činidlo SPC, které modifikuje peptidy analogickým způsobem jako činidlo SPITC (viz Obrázek 10) [47]. MS/MS spektra takto modifikovaných peptidů neobsahovala tolik intenzivní fragmentový pík odpovídající ztrátě modifikační skupiny (4-sulfofenylisokyanát), což vedlo k domněnce, že by použití tohoto činidla pro zavedení modifikace na N-konec peptidu zvýšilo intenzitu fragmentových iontů relevantních pro *de novo* sekvenaci. Cílem tedy bylo tuto skutečnost ověřit a převést danou reakci do formátu modifikace peptidů na stacionární fázi.

Podle protokolu v publikaci [47] bylo SPC rozpuštěno v ACN a přidáno k vodnému roztoku peptidů s pyridinem. ACN (podobně jako jiná organická rozpouštědla) však způsobují eluci peptidů z kolonky (obsahující reverzní stacionární fázi) spolu s proteklým činidlem, a proto je tato varianta nevhodná pro formát reakce na stacionární fázi. Prvotní pokusy rozpustit SPC ve vodě byly neúspěšné, látka je silně hydrofobní a ani zvýšený podíl ACN, který by ještě neeluoval peptidy (přibližně do 10 %), nestačil k rozpuštění tohoto činidla. To je výrazný rozdíl ve srovnání s SPITC, které je ve vodě rozpustné, v čistém ACN nikoliv, ale v ACN s menším podílem vody (např. 15%) se stále rozpouští. Proto dalším postupem bylo vyzkoušení původního protokolu reakce podle publikace alespoň pro případnou modifikaci peptidů v roztoku. Spektrum (Obrázek 32) získané touto modifikací peptidů v roztoku však nebylo

uspokojivé. Některé peptidy byly sice správně modifikované, ale zároveň se ve spektru objevily signály peptidů vykazujících například ztrátu 18 Da (teoreticky připadá v úvahu ztráta vody), dále pak ztrátu 38 a 44 Da. Tyto vedlejší produkty se nepodařilo spolehlivě identifikovat. Nespecifické reakce SPC činidla výrazně snižují signál modifikovaných peptidů a výrazně komplikují interpretaci. Obzvláště v případě komplexnějších vzorků je tento způsob modifikace peptidů nepoužitelný.



Obrázek 32. Spektrum tryptických peptidů myoglobinu modifikovaných pomocí SPC v roztoku, správně modifikované peptidy jsou zakroužkované.

4.3.5 Modifikace tryptických peptidů myoglobinu guanidylací a následně sulfonací pomocí 4-sulfofenylisothiokyanátu na stacionární fázi v roztoku

Přes vysoký podíl modifikovaných peptidů ve vzorku po derivatizaci na stacionární fázi v kolonce, zůstal v eluátu stále malý podíl nemodifikovaných peptidů. Proto byl hledán způsob, jak docílit ještě kompletnější konverze. První domněnkou, proč nedochází k úplné modifikaci, bylo to, že je v kolonce omezená výměna reakčního roztoku na povrchu stacionární fáze, kde jsou zachycené peptidy. Dalším důvodem byla snaha zavést protokol pro zpracování většího množství směsi peptidů (řádově stovky μg). Proto cílem dalšího experimentu bylo provést reakci s peptidy na stacionární fázi volně suspendované v roztoku ve zkumavce. Převedením stacionární fáze použité v kolonce (Kinetex EVO-C18) do roztoku však bylo zjištěno, že tato stacionární fáze v prostředí 2 % ACN s 0,1 % TFA nezůstává ve vznosu, ale lepí se na stěny zkumavky, tvoří shluky a tento stav nebylo možné změnit ani třepáním či ultrazvukem. To, aby fáze byla neustále ve vznosu, bylo důležité praktické kritérium pro

správné navázání peptidů, pro dobrou přístupnost pro reakční činidla a pro snadný oplach. Proto bylo otestováno několik dalších typů stacionární fáze pro jejich možné použití derivatizace na stacionární fázi v roztoku.

Testování stacionární fáze Hypercarb

Prvním kandidátem na vhodnou stacionární fázi se stala stacionární fáze porézního grafitického uhlíku s názvem Hypercarb s velikostí částic 5 μm . Tato fáze zůstávala ve vztahu i ve 2% ACN s 0,1% TFA a manipulace s ní byla snadná, proto byla tato fáze podrobena dalšímu testování. Jelikož byla očekávána univerzálnost použití stacionární fáze jak v roztoku, tak i v kolonce, byla nejprve vyzkoušena separace nemodifikovaných peptidů na kolonce. Separace probíhala dobře, jen ve srovnání s fází Kinetex EVO-C18 byla separační účinnost nižší a eluce peptidů probíhala až s vyšším podílem ACN (vhodný gradient byl složen z frakcí 12, 20, 28, 36, 44 a 52% ACN s 0,1% TFA). Dále byl ověřen průběh guanidylační reakce na peptidech zachycených na stacionární fázi Hypercarb. Modifikace peptidů byla úspěšná, ale peptidy bylo možné vyeluovat až s použitím vyššího podílu ACN, což posouvalo gradient nutný pro eluci až k 85% ACN s 0,1% TFA. Poté byla provedena guanidylace peptidů na této stacionární fázi v kolonce i s následnou modifikací pomocí SPITC. Při eluci gradientem ACN se ale ve spektru derivatizovaného vzorku neobjevili žádné píky. Při aplikaci separace se sice objevili signály peptidů, ale také se ve spektrech objevovaly píky, které neodpovídaly ani původním ani modifikovaným peptidům. Píky byly navíc vidět i v eluční frakci 95% ACN s 0,1% TFA. Pro ověření, že žádné peptidy nejsou odplaveny během nanášení sulfonačního činidla, byla zachycena a na reverzní fázi C18 purifikována použitá reakční směs, která po nanesení protekla kolonkou, spolu s proplachy po reakční fázi. Spektra však neprokázala žádné ztráty peptidů.

Vše tak naznačovalo, že peptidy po modifikaci vykazují vyšší afinitu ke stacionární fázi Hypercarb a je obtížné je pak eluovat. Ukázalo se, že peptidy tak zůstávají stále zachyceny na stacionární fázi v kolonce a v čase degradují, což vysvětluje píky s jinými naměřenými m/z hodnotami, než byly očekávány. Skutečnost, že je kolonka zanášena peptidy, potvrdil experiment, kdy byla dříve použitá kolonka propláchnuta gradientem ACN s 0,1% TFA bez předchozího nanesení vzorku a byla provedena „separace na čisto“ přímo na MALDI destičku. Bez proplachu po předchozím gradientu ACN byl na stejnou kolonu použit gradient ACN s 1% TFA, popř. eluční roztok 80% ACN s 1% NH_4OH . Nutno podotknout, že kolonka byla před těmito proplachy použita pouze jednou pro guanidylaci peptidů s následnou modifikací pomocí SPITC a po ukončení tohoto experimentu byla řádně propláchnuta 80% ACN

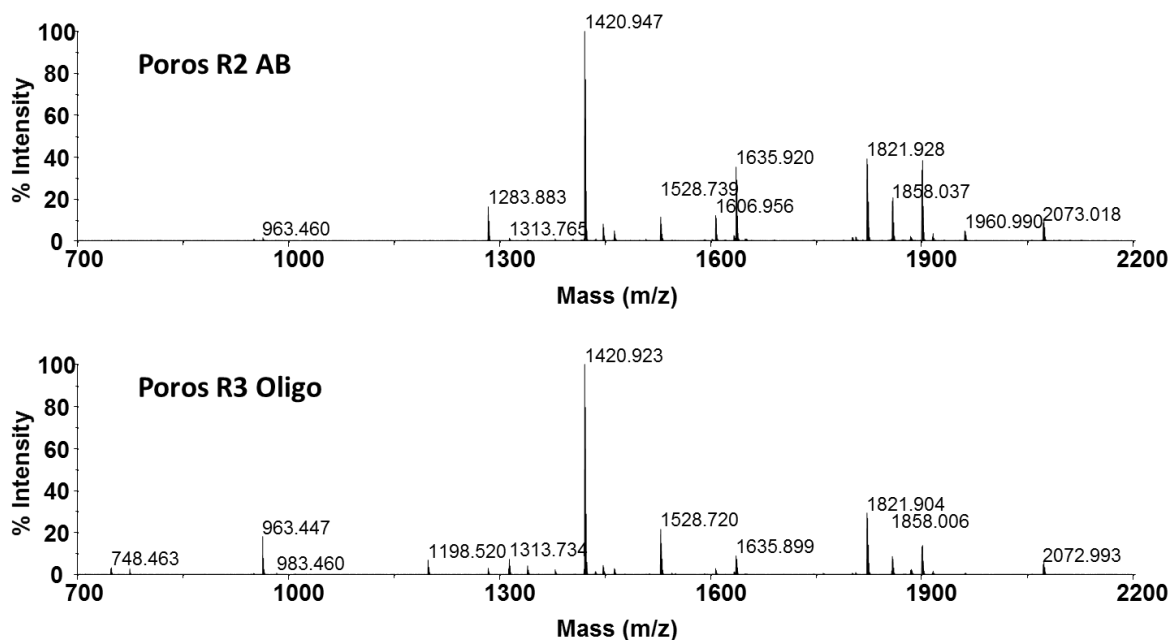
s 0,1% TFA, teoreticky by proto při správné eluci neměly být přítomny žádné peptidy. Výsledky této eluce (proplachu) kolonky ovšem ukázala, že kolonka je silně zanesena, ve spektrech byly přítomny píky o vysoké intenzitě, a ačkoliv výsledky ukazovaly, že po první gradientové eluci s ACN s 0,1% TFA je kolonka již propláchnuta, změnou elučního činidla bylo přesto vyeluováno velké množství peptidů. Jelikož nebyl nalezen vhodný eluční/promývací roztok, který by zajistil úplnou eluci modifikovaných peptidů z kolonky obsahující stacionární fázi Hypercarb, nebyla proto tato stacionární fáze dále používána.

Testování jiných stacionárních fází o různých velikostech částic

Po neúspěšné aplikaci stacionární fáze Hypercarb bylo vybráno pět dalších stacionárních fází dostupných v laboratoři, které by mohly být použity pro modifikaci peptidů na volné stacionární fázi v roztoku.

Ascentis ES-C18 a Porosil Gold 300 C18 vykazovaly stejné vlastnosti jako původní fáze Kinetex EVO-C18, ve 2% ACN s 0,1% TFA se shlukovaly a lepily na stěnu, a proto nebyly tyto fáze vhodné pro uspořádání reakce na stacionární fázi ve zkumavce. Stacionární fáze POROS R2 a POROS R3 OLIGO se ukázaly jako vhodné alternativy, jejich částice jsou v porovnání s ostatními testovanými fázemi poměrně velké (20 a 30 μm) a i ve 2% ACN s 0,1% TFA zůstávaly stále ve vznosu. Proto bylo přistoupeno k testování účinnosti modifikace peptidů zachycených na volných částicích těchto stacionárních fází suspendovaných v roztoku.

Modifikace peptidů byla provedena podle protokolu 3.4.5. Porovnáním spekter modifikovaných peptidů na jednotlivých fázích (*Obrázek 33*) bylo zjištěno, že modifikace guanidyací a následně pomocí SPITC probíhá lépe na stacionární fázi POROS R2, nicméně ani na jedné z těchto stacionárních fází neproběhla modifikace pomocí SPITC kvantitativně. Na spektru peptidů modifikovaných na fázi POROS R2 je patrné, že guanidylované peptidy jsou přeměněny více než peptidy modifikované na fázi POROS R3 OLIGO. Příkladem může být guanidylovaný peptid s teoretickou m/z 1313,6848, který má po modifikaci s SPITC teoretickou m/z 1528,6559 a guanidylovaný peptid s teoretickou m/z 1420,8635, který má po modifikaci s SPITC teoretickou m/z 1635,8346.



Obrázek 33. Porovnání modifikace tryptických peptidů myoglobinu na různých volných stacionárních fázích v roztoku guanidylací s následnou modifikací pomocí SPITC.

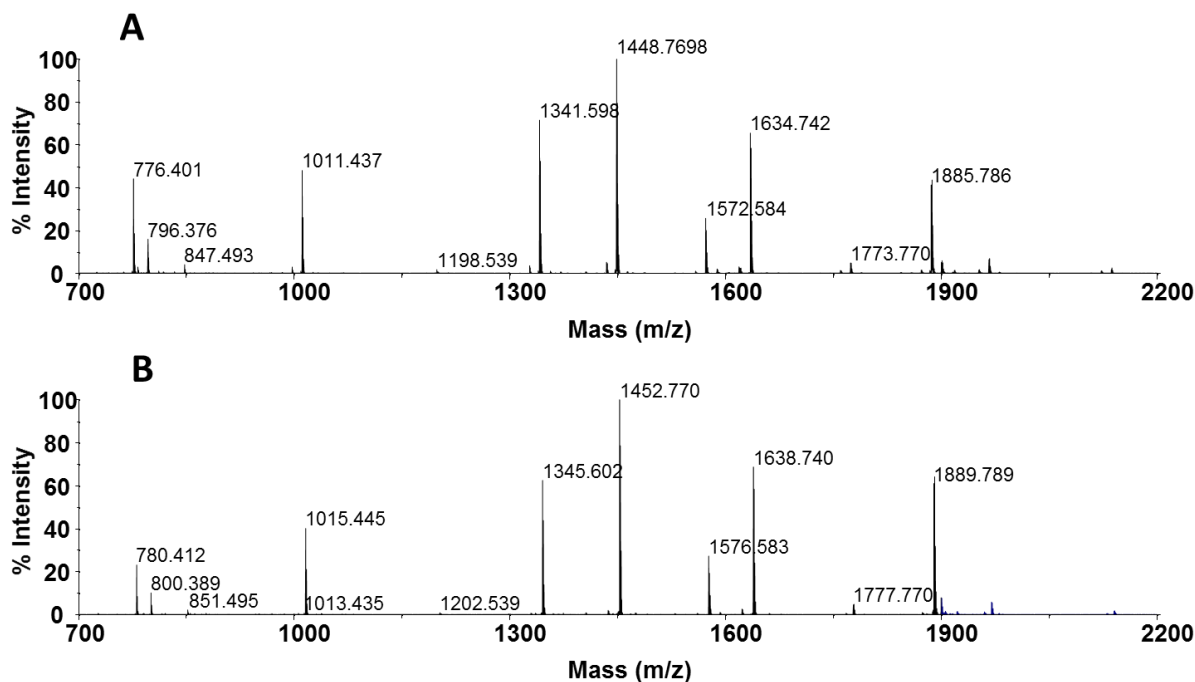
Tabulka 4 porovnává vlastnosti všech testovaných stacionárních fází a jejich použitelnost pro modifikaci peptidů na volné stacionární fázi v roztoku. Z výsledků uvedených výše, se jako nejlepší jeví stacionární fáze POROS R2. Alternativou však může být stacionární fáze POROS R3 OLIGO, která vykazuje podobné vlastnosti jako POROS R2.

Tabulka 4. Porovnání jednotlivých stacionárních fází testovaných pro modifikaci peptidů pomocí SPITC na volně suspendované stacionární fázi v roztoku.

Stacionární fáze	Velikost částic (μm)	Typ částic	Stav ve 2 % ACN s 0,1 % TFA	Použitelnost pro modifikace v roztoku
Kinetex EVO-C18	2,6	S pevným jádrem	Lepí se na stěny	NE
Ascentis ES-C18	2,7	S pevným jádrem	Lepí se na stěny	NE
Porosil Gold 300 C18	5	Plně porézní	Lepí se na stěny	NE
Hypercarb	5	Plně porézní	Zůstává ve vznosu	NE, zanáší se
POROS R2	20	Plně porézní	Zůstává ve vznosu	ANO
POROS R3 Oligo	30	Neporézní	Zůstává ve vznosu	ANO

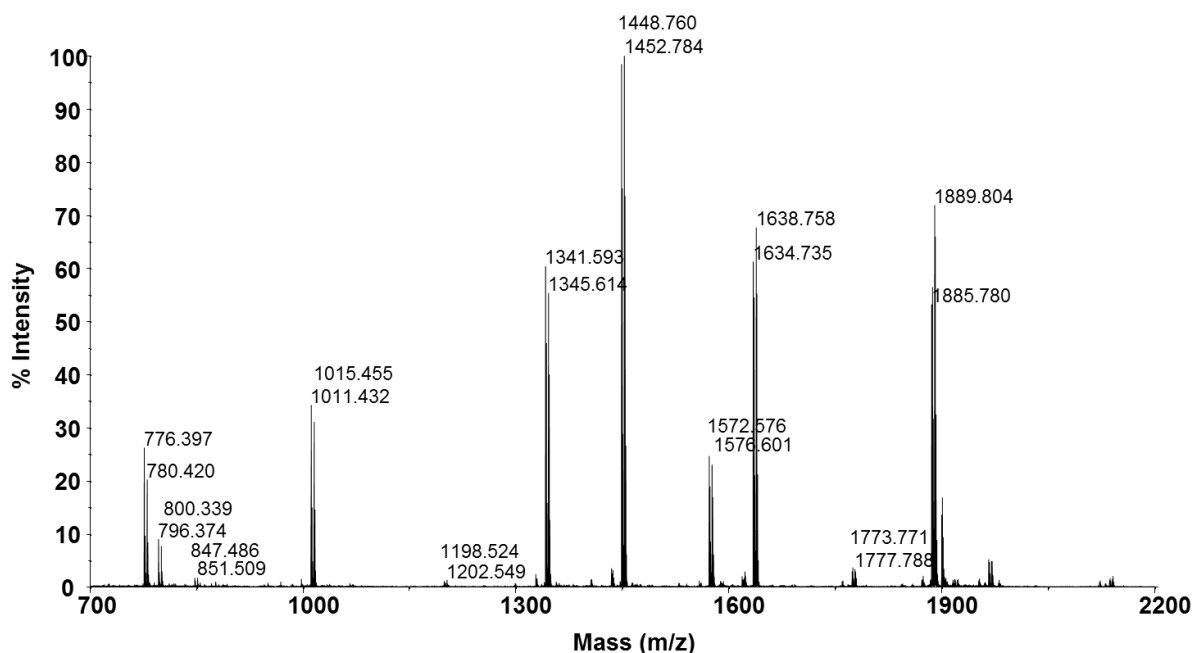
4.3.6 Dimethylace tryptických peptidů myoglobinu za použití lehkého a těžkého formaldehydu značeného deuteriem na stacionární fázi v kolonce

Jako další metodu pro usnadnění interpretace MS/MS spekter pro *de novo* sekvenaci tryptických peptidů myoglobinu byla zvolena dimethylace. Předlohou pro protokol modifikovaný pro uspořádání reakce na stacionární fázi v kolonce byla publikace Hsu *et al.* z roku 2003 [50]. Metoda je rychlá a jednoduchá, obvykle je používána pro kvantitativní analýzu, ale protokol uvedený v publikaci Boersema *et al.* z roku 2009 [61] někdy vyústí v nekompletní reakci, proto byl použit starší protokol, který se nám osvědčil. Dobře je také popsána reaktivita formaldehydu v různých hodnotách pH v publikaci Qin *et al.* z roku 2012, kdy se dá úpravou pH cílit pouze na modifikaci N-konce peptidu [51]. Nejprve byla provedena dimethylace lehkým formaldehydem na kapilární kolonce se stacionární fázi Kinetex EVO-C18 a následně i s těžkým formaldehydem značeným pomocí deuteria. *Obrázek 34* porovnává spektra peptidů dimethylovaných lehkým (spektrum A) a těžkým (spektrum B) formaldehydem. Úspěšnost reakce byla zjištěna nárůstem hmoty peptidů o 28 Da, respektive o 32 Da (pro deuterovaný formaldehyd) v porovnání s hmotami guanidylovaných peptidů; *Tabulka 2* obsahuje teoretické *m/z* hodnoty dimethylovaných peptidů pomocí lehkého formaldehydu. Jelikož reakce neproběhla v plném rozsahu a malé množství peptidů zůstalo nemodifikovaných, byla vyzkoušeno i opakované provedení reakce, kdy po provedení první reakce byla znovu natažena reakční směs do mikrostříkačky a protlačena kolonkou. Zlepšení výtěžnosti reakce nebylo bohužel natolik významné, aby tento krok byl zařazen do protokolu pro další experimenty.



Obrázek 34. Spektra tryptických peptidů myoglobinu dimethylovaných na kolonce. Spektrum A jsou peptidy dimethylované lehkým formaldehydem a spektrum B jsou peptidy dimethylované těžkým (deuterovaným) formaldehydem.

Pro vytvoření spektra směsi peptidů dimethylovaných lehkým a těžkým formaldehydem smíšených v poměru 1:1 bylo nutné zajistit stejné experimentální podmínky. Modifikace byly provedeny ihned po sobě s použitím stejné kolonky, čerstvých roztoků peptidů i ostatních činidel. *Obrázek 35* ukazuje spektrum této směsi. Píky by ve spektru měly být stejné intenzity oddělené od sebe 4 jednotkami m/z . Úplně stejné intenzity píků nebylo dosaženo. Nebyl také zaznamenán jednotný trend rozdílů intenzit píků (dimethylované peptidy lehkým formaldehydem nebyly vždy nižší intenzity, než peptidy dimethylované těžkým formaldehydem). Tomuto problému zde nebyla věnována další pozornost, neboť tato spektra pro kvalitativní vyhodnocení plně postačují, nicméně v případě kvantitativní analýzy by tato chyba zbytečně snižovala přesnost analýzy.

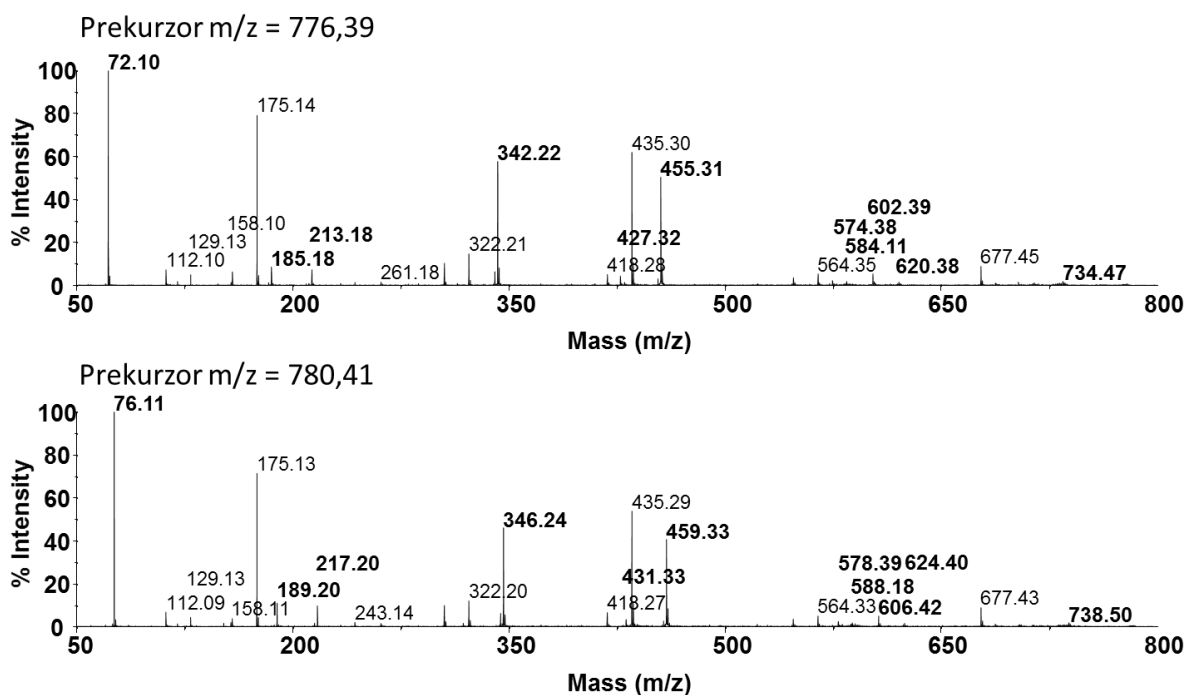


Obrázek 35. Spektrum směsi tryptických peptidů myoglobinu dimethylovaných lehkým a těžkým formaldehydem, smíšených v poměru 1:1.

Pro porovnání účinnosti reakce byla dimethylace také provedena ve zkumavce, kdy z kolonky byly nejprve vyeluovány guanidylované peptidy a následná dimethylace byla provedena ve zkumavce. Porovnáním spekter dimethylovaných peptidů na stacionární fázi kolonky a v roztoku bylo zjištěno, že dimethylace je stále výhodnější provádět v kolonkovém formátu, jelikož účinnost reakce v roztoku není výrazně lepší než na kolonce. Peptidy dimethylované v roztoku je totiž nutné navíc purifikovat na stacionární fázi, což prodlužuje dobu analýzy a komplikuje protokol. Peptidy dimethylované na kolonce lze snadno opláchnout od reagentů, lze je z kolonky rovnou eluovat, popřípadě separovat a vzorek může být podroben analýze na hmotnostním spektrometru.

Pro ukázkou usnadnění způsobu interpretace spekter dimethylovaných peptidů jsou porovnána MS/MS spektra prekurzorů s m/z 776,39 a s m/z 780,40 (Obrázek 36), které pocházejí ze stejného původního peptidu, ale liší se způsob jejich dimethylace: u prvního peptidu byl použit lehký formaldehyd CH_2O , u druhého peptidu těžký formaldehyd značený deuteriem (CD_2O). Tučně jsou zvýrazněny ionty odvozené od N-konce peptidu, což jsou b -ionty, příslušné ztráty od b -iontů, nebo a -ionty a jejich příslušné ztráty. V porovnaných spektrech jsou patrné posuny m/z hodnot o 4 jednotky který způsobil deuteriem značený formaldehyd. Ionty odvozené od C-konce (y -ionty) zůstávají v obou spektrech nezměněné. Alternativou porovnání dvou spekter je zvolení prekurzoru ze spektra směsi peptidů modifikovaných lehkým a těžkým formaldehydem v poměru 1:1 (Obrázek 35) tak, aby

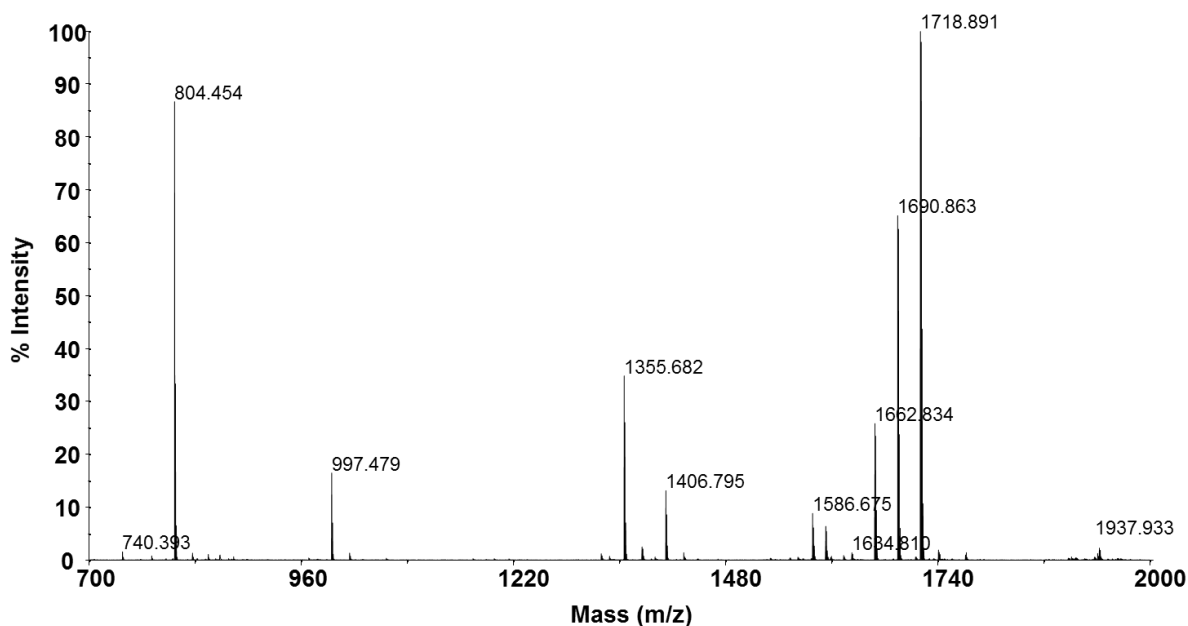
procesem výběru fragmentovaných iontů prošli oba prekurzory modifikované jak lehkým, tak i těžkým formaldehydem. Ve výsledném MS/MS spektru se potom N terminální ionty zobrazí jako dublety. Výhodou tohoto přístupu je menší počet měření a dat, snazší zpracování komplexnějších peptidových směsí; nevýhodou je však zvýšená složitost spektra a některé ionty se mohou překrývat.



Obrázek 36. Porovnání MS/MS spekter dimetylovaných peptidů s m/z 776,39 a s m/z 780,41. Tučně jsou zvýrazněny ionty odvozené od N-konce peptidu.

4.3.7 Esterifikace tryptických peptidů myoglobinu v roztoku

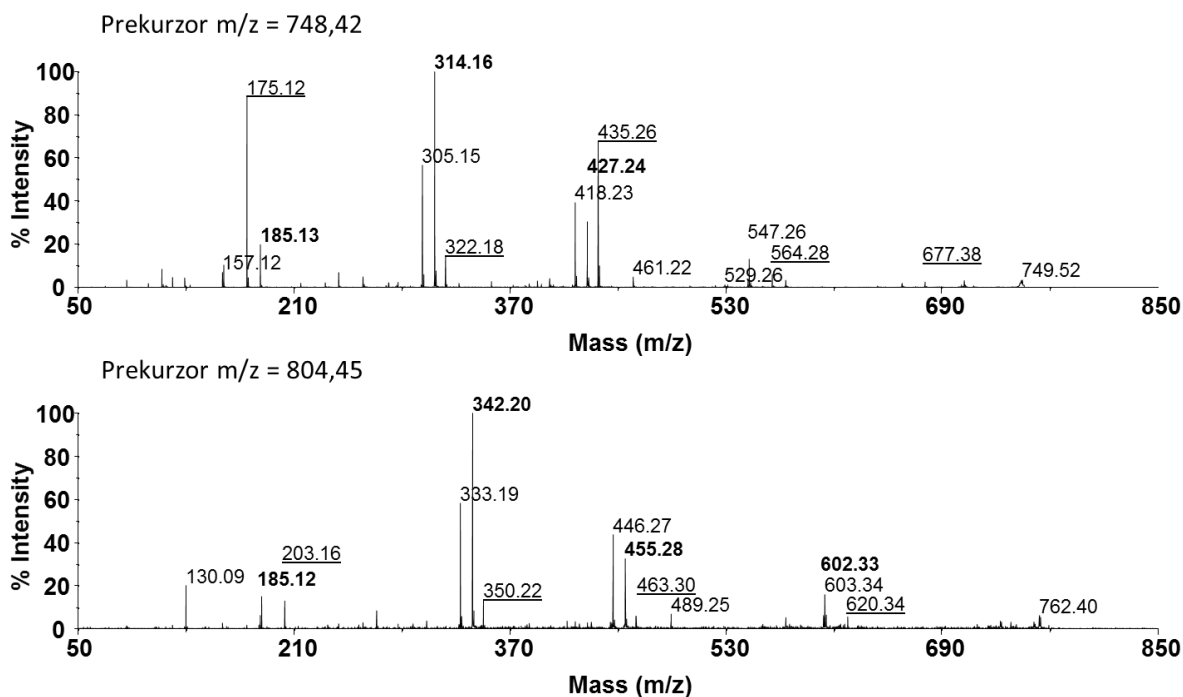
Pro doplnění výčtu metod byla vybrána esterifikace, přesněji ethylesterifikace. Ačkoliv pro esterifikaci je účinnější methanol, vykazuje spoustu nežádoucích vedlejších reakcí. Proto byl vybrán ethanol jako optimální reakční činidlo. Reakce proběhla ve zkumavce a naměřená spektra obsahovala očekávané hodnoty (viz Obrázek 37). Posun esterifikovaných peptidů závisí na počtu COOH skupin peptidu, Tabulka 2 obsahuje teoretické m/z hodnoty ethylesterifikovaných peptidů, kdy byl vypočítán posun jako $m/z = |C| \cdot 28,0313$, kde C je počet COOH skupin peptidu.



Obrázek 37. Spektrum ethylesterifikovaných tryptických peptidů myoglobinu v roztoku.

Pro ukázkou usnadnění interpretace MS/MS spekter ethylesterifikovaných peptidů byly porovnány spektra peptidu s m/z 748,42 (nemodifikovaný peptid) a jeho modifikované verze o m/z 804,45 (Obrázek 38). Z rozdílu hmotností peptidů je již zjištěno, že peptid obsahuje dvě karboxylové skupiny (posun o 56 hmotnostních jednotek). Nejprve byla ve spektrech zjištěna *b*-iontová série (tučně zvýrazněná): *b*₁-ionty nebyly nalezeny, následující *b*₂-ionty měly shodnou m/z hodnotu, což vypovídá, že první dvě aminokyseliny neobsahují COOH skupinu (čteme od N-konce). Následující *b*₃-iont pocházející z modifikovaného peptidu již vykazuje posun o 28 hmotnostních, znamená to, že třetí aminokyselina je buď kyselina glutamová či asparagová. Zbytek *b*-iontů již další vyšší posun nevykazuje, což souhlasí se skutečností o obsahu dvou karboxylových skupin (karboxylová skupina na bočním řetězci aminokyselinového zbytku a karboxylová skupina na C-konci peptidu). Doplněním *y*-iontové série (zvýrazněná podtržením) zjišťujeme, že peptid má na C-konci arginin, *y*₁-*y*₃-ionty pocházející z modifikovaného peptidu vykazují posun o 28 hmotnostních jednotek, *y*₄-iont již o 56 hmotnostních jednotek. To podává informaci, že aminokyselinový zbytek s karboxylovou skupinou v bočním řetězci je jako čtvrtý od C-konce, z čehož vyplývá, že peptid obsahuje 6 aminokyselin. Dopočítáním rozdílu mezi jednotlivými typy fragmentových iontů byla stanovena sekvence A(I/L)E(I/L)FR, která souhlasí s teoretickou sekvencí peptidu ALELFR s vypočtenou hmotností 748,4352 Da (Tabulka 2). U takto krátkého peptidu s nízkým počtem karboxylových skupin není problém zjistit jeho sekvenci, problém ve vyhodnocení spektra by

nastal u peptidu s dlouhou aminokyselinovou sekvencí a vysokým výskytem karboxylových skupin; takové spektrum by pravděpodobně bylo obtížněji interpretovatelné.



Obrázek 38. Porovnání MS/MS spekter peptidu s m/z 748,42 a jeho ethylesterifikované formy s m/z 804,45. Tučně je zvýrazněna *b*-iontová série, podtržením je zvýrazněna *y*-iontová série.

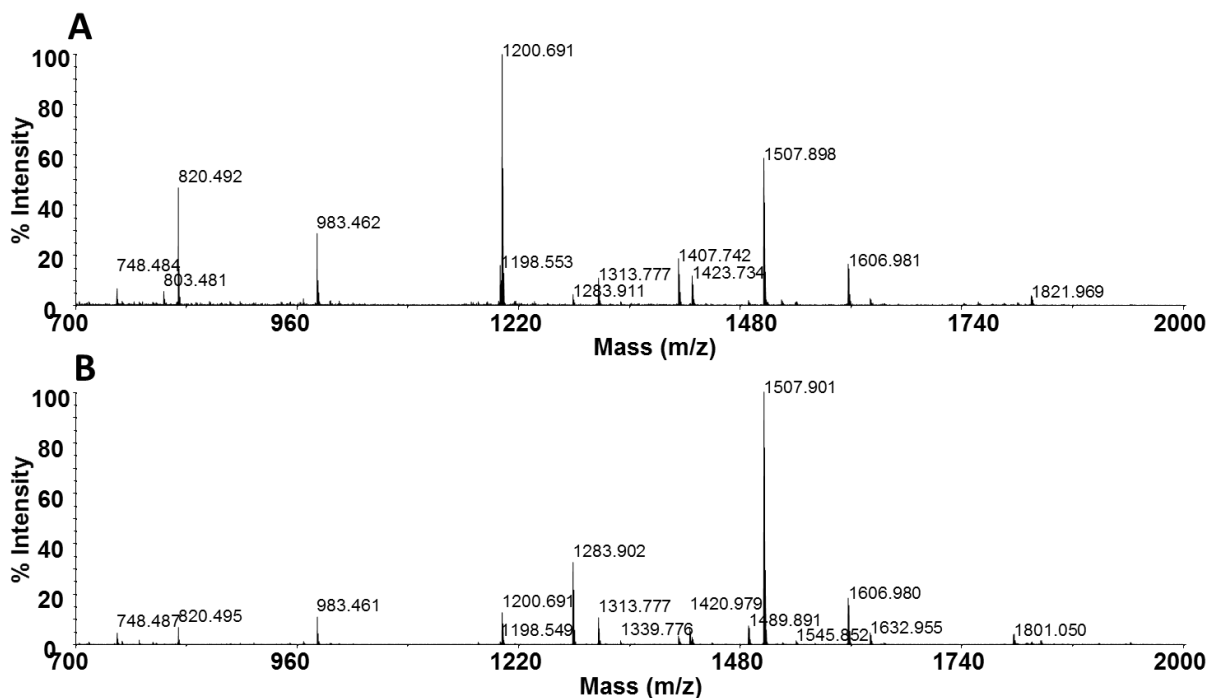
4.4 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly

Jelikož nebylo dosaženo kompletní derivatizace SPITC peptidů jak v kolonce, tak ani v roztoku, bylo rozhodnuto využít obohacovacích technik pro zakoncentrování modifikovaných peptidů obsahujících sulfonovou skupinu. Pro experimentální část této práce byly vybrány dvě metody: obohacení na TiO₂ částicích a obohacení na stacionární fázi PolyWAX LP na bázi slabého iontoměniče.

4.4.1 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na TiO₂ částicích ve zkumavce

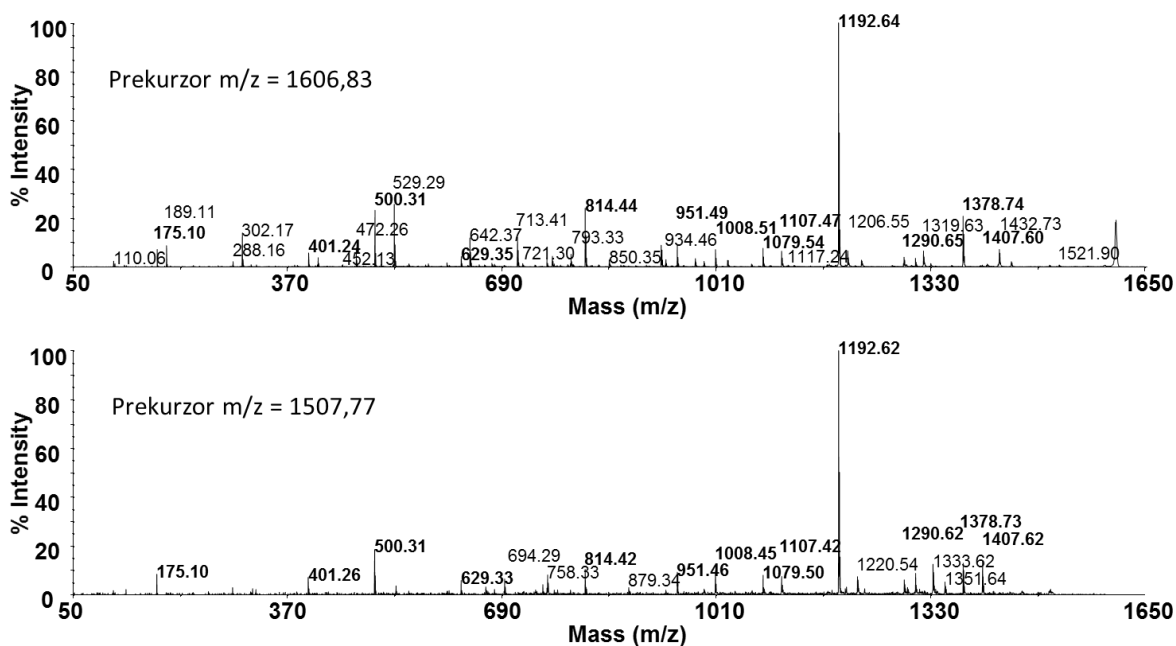
Důvodem pro zvolení tohoto materiálu byla schopnost TiO₂ částic efektivně obohatit fosfopeptidy. Jelikož sulfopeptidy vykazují podobné vlastnosti, byl důvod domnívat se, že by obohacení mohlo probíhat stejně. Volba provést obohacení ve zkumavce byla odůvodněna obtížností sestavení kolonky, kdy částice mají tendenci protékat i přes teflonový filtr a skleněný filtr by mohl sorbovat nemodifikované peptidy, které by se následně eluovaly spolu s obohacenou složkou. Při práci s volnými částicemi je třeba dbát na zvýšenou opatrnost, částice se snadno dostávají do vznosu a hrozí nežádoucí nasátí částic špičkou.

Nejprve byl zvolen protokol, kde pufr, ve kterém se nanášely peptidy modifikované guanidylací a SPITC činidlem, obsahoval kyselinu mléčnou a 5% TFA. Reakce byla provedena na kolonce, kde se právě zjistilo, že částice unikaly z kolonky, a proto pro následující experimenty byl formát kolonkového uspořádání nahrazen formátem volných částic ve zkumavce. Výsledné spektrum prvního experimentu neobsahovalo očekávané píky, m/z hodnoty totiž neodpovídaly hodnotám sulfonovaných peptidů ani nemodifikovaných peptidů. Po fragmentaci některých peptidů získaných ze stejného derivatizovaného vzorku, který byl vystaven působení 5% TFA, bylo zjištěno, že v průběhu obohacení došlo k částečné Edmanově degradaci. Důvodem této reakce byla zřejmě právě 5% TFA, která zajistila dostatečně kyselé prostředí odštěpení N-koncové aminokyseliny spolu s tímto SPITC činidlem. Tato zjištění vedlo k nahrazení 5% TFA za 0,1% TFA v postupu modifikace pomocí OMIMHS a SPITC, jako preventivní zabránění degradace peptidů, a také byla nahrazena v protokolu pro obohacení sulfonovaných peptidů na TiO₂ částicích. *Obrázek 39* zobrazuje spektrum neobohaceného eluátu derivatizovaných peptidů, který byl získán elucí z fáze Kinetex EVO-C18 elučním činidlem s obsahem kyseliny mléčné a 5% TFA (spektrum A) a spektrum nezachycené frakce proteklé kolonkou s TiO₂, která byla taktéž vystavena působení kyseliny mléčné a 5% TFA (spektrum B). V obou případech je vidět částečná Edmanova degradace, obzvláště na příkladu peptidu modifikovaného SPITC s teoretickou m/z 1821,8258 (VEADIAGHGQEVLR), u kterého je též pozorován pík bez modifikační skupiny (m/z 1606,981) a také pík téhož peptidu s odštěpeným valinovým zbytkem (peptid s m/z 1507,9). Totéž se dělo u peptidu modifikovaného SPITC s teoretickou m/z 1528,6559 (LFTGHPETLEK), kde byl pozorován peptid bez SPITC činidla (m/z 1313,77) a pak pík odpovídající ztrátě leucinu z N-konce tohoto peptidu (m/z 1200,69).



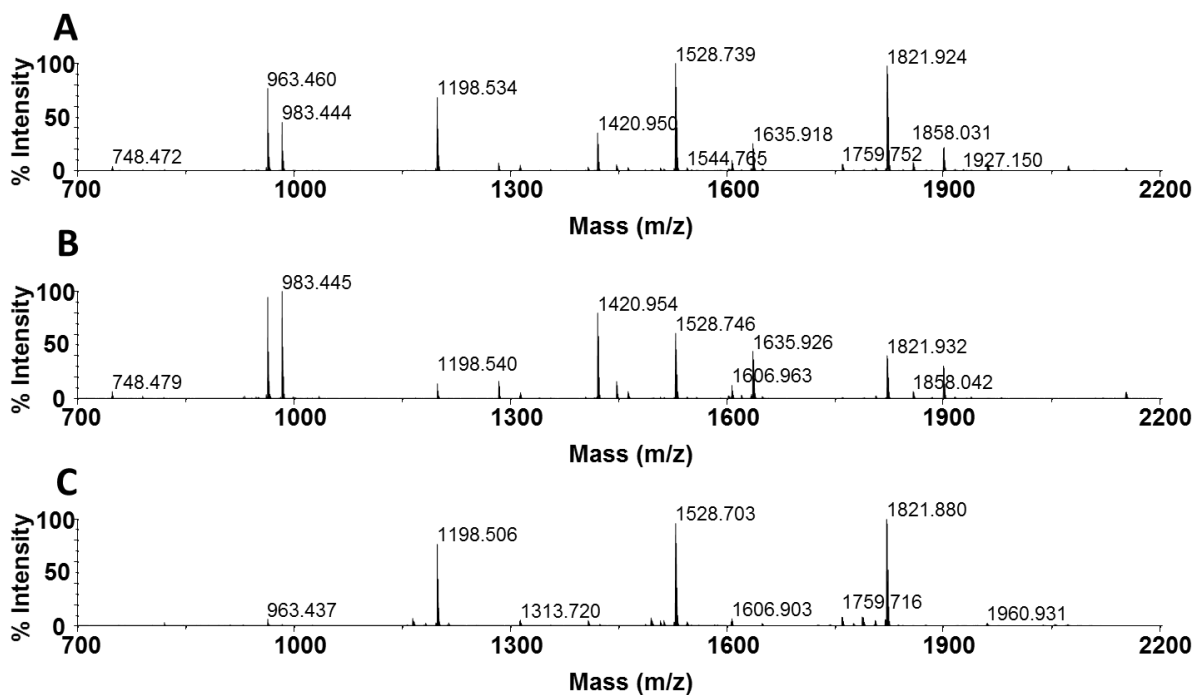
Obrázek 39. Spektra tryptických peptidů myoglobinu modifikovaných pomocí OMIMHS a SPITC z experimentu pro jejich obohacení na TiO_2 , kde byl zpozorován jev částečné Edmanovy degradace; Spektrum A neobohacený eluát vystavený působení kyseliny mléčné a 5% TFA, spektrum B frakce vzorku, která protekla kolonkou s TiO_2 , a která také byla vystavena působení kyseliny mléčné a 5% TFA.

Pro potvrzení hypotézy částečné Edmanovy degradace byly porovnány dvě MS/MS spektra peptidů, o kterých se předpokládalo, že jsou původem ze stejného peptidu. Byl fragmentován peptid s m/z 1606,83, který odpovídá nemodifikované formě peptidu VEADIAGHGQEVLR, a peptid s m/z 1507,77 o kterém se uvažovalo jako o peptidu s m/z 1606,8547, ale se ztrátou N-koncové aminokyseliny valinu. Pokud by se jednalo o stejné peptidy, některé píky by měly mít stejnou hodnotu m/z (např. y -ionty) a jiné by se měly lišit právě o hodnotu (99.07 Da) aminokyselinového zbytku valinu (např. b -ionty). Tento jev byl zaznamenán při porovnání výše zmíněných peptidů, což potvrdilo, že se jedná o peptidy stejného původu. **Obrázek 40** porovnává MS/MS spektrum peptidu s m/z 1606,83 a peptidu s m/z 1507,77, kde y -ionty jsou tučně zvýrazněny. Tohoto jevu lze s výhodou využít také pro usnadnění interpretace pro *de novo* sekvenaci peptidů, kdy analogickým porovnáním dvou MS/MS spekter získáme informaci pro odlišení b -iontů od y -iontů.



Obrázek 40. Porovnání dvou MS/MS spekter peptidu s m/z 1606,83 a peptidu s m/z 1507,77, tučně jsou zvýrazněny píky γ -iontů. Jedná se o peptidy stejného původu (ze sekvence VEADIAGHGQEVLR), peptid s m/z 1507,77 je produkt částečné Edmanovy degradace.

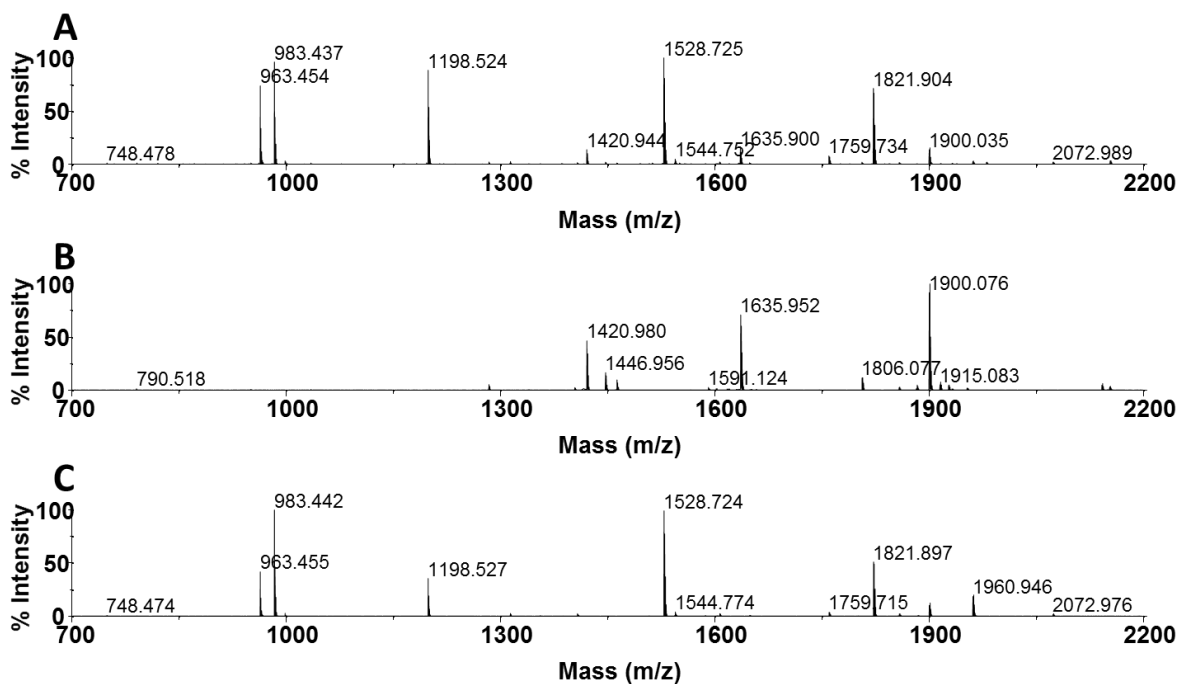
Další experimenty byly již prováděny pouze na volných TiO_2 částicích ve zkumavce. Následovala série neúspěšných experimentů, kdy ve spektrech z eluátu nebyly žádné píky, ačkoliv byly upravovány podmínky zvyšováním či snižováním procent TFA ve směsi vzorku. Bylo usouzeno, že jednou možnou příčinou může být přítomnost kyseliny mléčné, která brání navázání peptidů obsahujících sulfoskupinu na TiO_2 částice. V dizertační práci Katherine E. Hersberger z roku 2012 [62] byl nalezen protokol pro obohacení sulfopeptidů na TiO_2 částicích, bez použití kyseliny mléčné. Tento protokol se ukázal jako úspěšný a podařilo se, byť ne s úplnou specifitou, odstranit většinu guanidylovaných peptidů. Bohužel, touto metodou se nepodařilo zachytit všechny peptidy obsahující sulfonovou skupinu. Obrázek 41 zobrazuje spektra peptidů modifikovaných pomocí guanidylace a SPITC v různé fázi obohacení, kde spektrum A je původní vzorek, spektrum B je frakce vzorku, která se na částicích nezachytila a spektrum C je obohacená frakce eluovaná z částic. Je patrné, že například peptidy s teoretickou m/z 1420,8635, a s m/z 1857,9242 byl účinně odstraněny během nanášení vzorku spolu dalšími minoritními peptidy. Bohužel peptidy, které byly modifikované SPITC a měly se na částicích zachytit (peptidy s teoretickými m/z hodnotami 963,4063, 983,3862 a 1635,8346) nebyly vůbec zachyceny během nanášení vzorku. Peptidy modifikované pomocí SPITC s teoretickými m/z hodnotami 1198,4656, 1528,6559 a s 1821,8258 byly úspěšně zachyceny na částicích.



Obrázek 41. Spektra tryptických peptidů myoglobinu modifikovaných pomocí OMIMHS a SPITC z experimentu obohacení na částicích TiO₂. Spektrum A je původní neobohacený vzorek, spektrum B je frakce vzorku, která nebyla zachycena na částicích TiO₂ a spektrum C je eluát obohacené frakce na TiO₂.

4.4.2 Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na PolyWAX LP stacionární fázi v kolonce

Obohacení na částicích PolyWAX LP bylo provedeno dle protokolu v práci Y. Jiang z roku 2013 [63], který byl upraven pro kolonkové uspořádání a modifikovaný protokol je popsán v kapitole 3.5.2. Zde nebyly zjištěny žádné problémy s provedením experimentu, vše proběhlo dle očekávání a spektra vzorku po obohacení vypadala podobně jako při obohacení na TiO₂ částicích. Většina nežádoucích píků byla odstraněna, ale některé peptidy se sulfonovou skupinou se na stacionární fázi během vazebného kroku nezachytily. *Obrázek 42* zobrazuje spektra peptidů modifikovaných pomocí guanidylace a SPITC v různé fázi obohacovacího protokolu na stacionární fázi PolyWAX LP, kde spektrum A je původní neobohacený vzorek, spektrum B je frakce, která se nezachytěla na stacionární fázi a spektrum C je obohacená frakce vyeluovaná ze stacionární fáze.



Obrázek 42. Spektra peptidů trypticky štěpeného myoglobinu modifikovaná pomocí OMIMHS a SPITC z experimentu obohacení těchto peptidů na stacionární fázi PolyWAX LP; Spektrum A je původní neobohacený vzorek, spektrum B je frakce, která se nezachytila na stacionární fázi a spektrum C je obohacená frakce vyeluovaná ze stacionární fáze.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce měla za cíle podat přehled některých metod používaných pro usnadnění *de novo* sekvenace peptidů pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (zkráceně MS/MS). Metody usnadňující interpretaci MS/MS spekter snáze umožňují identifikovat neznámé nebo dosud nesekvenované proteiny, jejichž sekvence nejsou zaneseny do proteinových databází a jejich „peptidový otisk“ nám proto k identifikaci nestačí. Cílem bylo provést vybrané metody chemické derivatizace peptidů a pokusit se upravit známé protokoly do funkčních protokolů prováděných s peptidy zachycenými na reverzní stacionární fázi (jak zakotvené v kolonce, tak resuspendované v mikrozkuhavce). Výhodou derivatizace peptidů v kolonkovém uspořádání je menší spotřeba vzorku, reagensů, snazší odstranění reakčních činidel a pufrů a eluce lze provádět vhodným elučním činidlem přímo z kolony na MALDI destičku bez potřeby další purifikace s případnou možnou přímou separací modifikovaných peptidů.

Jako standardní vzorek pro provádění experimentů byl vybrán myoglobin z koňského srdce, který byl naštěpen pomocí proteázy trypsinu štěpícím za lysinem nebo argininem. Purifikované peptidy byly následně podrobeny sledu experimentů. Jako stacionární fáze pro výrobu kolonek byla vybrána fáze Kinetex EVO-C18, která je lépe uzpůsobená reakčním podmínkám (vysoké pH) a účinně separovala zachycené peptidy.

První z modifikačních reakcí byla guanidylace pomocí O-methylisomočiny hemisulfátu sloužící pro zablokování ϵ -amino skupin lysinů. Guanidylace v kolonkovém uspořádání podle původního protokolu s amonným pufrům nedosahovala kompletní reakce, a proto byl hledán nový pufr, ve kterém by reakce proběhla s vyšší účinností. Fosforečnan trisodný se následně ukázal vhodným pro provádění guanidylace, neboť zvýšil účinnost reakce ve stejném časovém úseku a jeho další předností je lepší stálost reakční směsi s tímto pufrům ve srovnání s použitím amonného pufru.

Následovaly experimenty se sulfonovanými činidly, které cílí na N-konec peptidu a peptidy modifikované těmito činidly vykazují velice snadno interpretovatelná MS/MS spektra, která často obsahují pouze y -ionty. Prvním činidlem tohoto typu byl 4-sulfofenylisothiokyanát sodný, který je pro tento účel široce používaný. Původní protokol byl bez obtíží zopakován v kolonkovém uspořádání na reverzní stacionární fázi Kinetex EVO-C18, přičemž před samotnou modifikací byla provedena guanidylace ve fosforečnanu trisodném. Alternativním způsobem se jevila aplikace činidla 4-chlorosulfofenylisothiokyanátu sodného, protože MS/MS

spektra některých peptidů v literatuře ukazovala lepší rozložení intenzit fragmentových iontů ve srovnání se spektry peptidů modifikovaných 4-sulfofenylisothiokyanátem sodným. Původní protokol se sice podařilo zopakovat v reakci ve zkumavce, ale MS spektra byla složitá, obsahovala spoustu nežádoucích vedlejších produktů a pro komplexnější peptidové směsi se tím stala nepoužitelná. Činidlo navíc nebylo za daných reakčních podmínek vhodné pro aplikaci na reverzní stacionární fázi. Dále byla snaha aplikovat alternativní postup aplikovatelný i na komplexnější peptidové směsi, kdy byla reverzní fáze převedena do roztoku, ve kterém probíhala modifikace. Byly vybrány fáze POROS R2 a POROS R3 OLIGO. Reakce zde neprobíhají ideálně, a proto pro menší množství peptidů (do 10 µg) je stále vhodnější kolonkové uspořádání s fází Kinetex EVO-C18.

Další testovanou modifikací peptidů byla dimethylace formaldehydem s následnou redukcí kyanoborohydridem sodným, která po předchozí guanidylaci peptidů reaguje na N-konci peptidu. Původní protokol pro reakci v roztoku byl vyvinut a úspěšně aplikován v kolonkovém uspořádání na reverzní stacionární fázi Kinetex EVO-C18. Pro usnadnění identifikací typů iontů a tudíž lepší interpretaci MS/MS spekter byla provedena dimethylace lehkým i těžkým formaldehydem (značeným deuteriem).

Posledním typem modifikace peptidů byla esterifikace karboxylových skupin peptidů ethanolem. Metoda slouží jako doplňující k ostatním modifikačním reakcím, lze díky ní jednoduše stanovit počet karboxylových skupin peptidu a MS/MS spektra kratších peptidů nám dají i určitou informaci o struktuře peptidu. I zde se podařilo zopakovat původní protokol, modifikace byla však provedena pouze v roztoku a s následnou purifikací peptidů.

Doplňujícím experimentem bylo obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly. Obohacení bylo provedeno dvěma způsoby: na částicích TiO₂ a stacionární fázi PolyWAX. Částice TiO₂ jsou používány pro obohacení fosfopeptidů, byl proto důvod domnívat se, že metoda bude analogicky fungovat i pro peptidy obsahující sulfonovou skupinu. Bylo zjištěno, že kyselina mléčná brání navázání na částice TiO₂, a proto byla z původního protokolu vyřazena. Částečné obohacení bylo úspěšně provedeno na částicích volně v roztoku (TiO₂ částice se nepodařilo technicky převést do kolonkového uspořádání), ovšem ne všechny peptidy obsahující sulfonovou skupinu byly zachyceny. Metoda také pracovala s 5% kyselinou trifluoroctovou (TFA), kdy bylo zjištěno, že peptidy modifikované pomocí SPITC vystavené delšímu působení 5% TFA podléhají částečné Edmanově degradaci. Tuto původně nechtěnou skutečnost lze ovšem také s výhodou použít i pro snadnější *de novo* sekvenaci peptidů.

Porovnáním MS/MS spekter původního a degradovaného peptidu lze totiž snadno rozlišit jednotlivé typy fragmentových iontů, neboť např. y-ionty zůstávají na stejných hodnotách m/z. Obohacení peptidů modifikovaných sulfonovanými činidly na stacionární fázi PolyWAX bylo provedeno bez problému v kolonkovém uspořádání a výsledky tohoto obohacení byly podobné jako při obohacení na TiO₂ částicích.

Tato práce splnila původně stanovené cíle, úspěšně se povedlo aplikovat většinu metod na kolonkové uspořádání s mikrogradientovým zařízením a MS/MS spektra peptidů tak byla zjednodušena pro jejich interpretaci při *de novo* sekvenaci.

SEZNAM ZDROJŮ

- [1] CAMPBELL, Neil A. a Jane B. REECE. *Biologie*. Vydání první. Brno: Computer Press, a.s., 2006. ISBN 80-251-1178-4.
- [2] SMITH, A.D. ET AL. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. New York: Oxford University Press, 1997. ISBN 0-19-854768-4.
- [3] *mMass software*. – www.mmass.org.
- [4] SEWALD, Norbert a Hans-Dieter JAKUBKE. *Peptides: Chemistry and Biology*. Weinheim: WILEY-VCH, 2006. ISBN 3-572-30405-3.
- [5] LARSEN, Martin R., Morten B. TRELLE, Tine E. THINGHOLM a Ole N. JENSEN. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques*. 2006, **40**(6), 790–798. ISSN 0736-6205.
- [6] OLSEN, Jesper V. a Matthias MANN. Status of Large-scale Analysis of Post-translational Modifications by Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* . 2013, **12**(12), 3444–3452. ISSN 1535-9476 DOI:10.1074/mcp.O113.034181
- [7] http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/search/index?biological_cell_component:%22hemoglobin%20complex%22&molecule_name:%22Hemoglobin%20subunit%20alpha%22
Čerpáno 16.4.2017
- [8] CHMELÍK, Josef. Proteomický průvodce. 2005, **99**, 883–885.
- [9] PANDEY, A. a M. MANN. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000, **405**(6788), 837–846. ISSN 0028-0836.
- [10] CAPRIOLI, Richard M. a Michael L. GROSS. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry, Volume 2*. 1. Kidlington: Elsevier Ltd., 2005. Biological Application, Part A: Peptides and Proteins. ISBN 0-08-043800-8.
- [11] CANAS, Benito, Carmen PINEIRO, Enrique CALVO, Daniel LOPEZ-FERRER a Jose MANUEL GALLARDO. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1153**(1–2), 235–258. ISSN 0021-9673. DOI:10.1016/j.chroma.2007.01.045
- [12] ROE, Simon. *Protein Purification Techniques*. Second edition. New York: Oxford University Press, 2001. ISBN 0-19-963674-5.
- [13] AZARKAN, Mohamed, Joelle HUET, Danielle BAEYENS-VOLANT, Yvan LOOZE a Guy VANDENBUSSCHE. Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2007, **849**(1–2), 81–90. ISSN 1570-0232. DOI:10.1016/j.jchromb.2006.10.056
- [14] JUNGBLUT, Peter, Bernd THIEDE, Ursula ZIMNY-ARNDT, Eva-Christina MÜLLER, Christian SCHELER, Brigitte WITTMANN-LIEBOLD a Albrecht OTTO. Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from

- gels. *ELECTROPHORESIS*. 1996, **17**(5), 839–847. ISSN 1522-2683
DOI:10.1002/elps.1150170505
- [15] LOPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2007, **849**(1–2), 190–202. ISSN 1570-0232. DOI:10.1016/j.jchromb.2006.11.049
- [16] CALLESEN, Anne K., Jonna S. MADSEN, Werner VACH, Torben A. KRUSE, Ole MOGENSEN a Ole N. JENSEN. Serum protein profiling by solid phase extraction and mass spectrometry: a future diagnostics tool? *Proteomics*. 2009, **9**(6), 1428–1441. ISSN 1615-9861. DOI:10.1002/pmic.200800382
- [17] LIN, Yong, Jian ZHOU, Deng BI, Ping CHEN, Xianchun WANG a Songping LIANG. Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins. *Analytical Biochemistry*. 2008, **377**(2), 259–266. ISSN 0003-2697. DOI:10.1016/j.ab.2008.03.009
- [18] POOLE, Colin F. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003, **22**(6), 362–373. ISSN 01659936. DOI:10.1016/S0165-9936(03)00605-8
- [19] HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*. 1999, **856**(1–2), 3–54. ISSN 0021-9673.
- [20] JOHN C. LINDON, ET AL. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 2nd edition. San Diego: Elsevier Ltd., 2010. ISBN 978-0-12-374417-3.
- [21] GABELICA, Valérie a Edwin DE PAUW. Internal energy and fragmentation of ions produced in electrospray sources. *Mass Spectrometry Reviews*. 2005, **24**(4), 566–587. ISSN 0277-7037. DOI:10.1002/mas.20027
- [22] YAMASHITA, M. a Jb FENN. Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. *Journal of Physical Chemistry*. 1984, **88**(20), 4451–4459. ISSN 0022-3654. DOI:10.1021/j150664a002
- [23] KARAS, M. a F. HILLENKAMP. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Analytical Chemistry*. 1988, **60**(20), 2299–2301. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac00171a028
- [24] LEWIS, J. Kathleen, Jing WEI a Gary SIUZDAK. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. ISBN 978-0-470-02731-8. DOI:10.1002/9780470027318.a1621
- [25] GROSS, Michael L. a Richard M. CAPRIOLI, ed. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry, Vol. 6: Ionization Methods*. 1 edition. Amsterdam, Boston: Elsevier Science, 2006. ISBN 978-0-08-043801-6.
- [26] P.B. ARMENTROUT. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry, Volume 1*. 1. vyd. Kidlington: Elsevier Ltd., 2003. Theory and Ion Chemistry. ISBN 978-0-08-043802-3.

- [27] GUILHAUS, M., D. SELBY a V. MLYNSKI. Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2000, **19**(2), 65–107. ISSN 0277-7037. DOI:10.1002/(SICI)1098-2787(2000)19:2<65::AID-MAS1>3.0.CO;2-E
- [28] ZUBAREV, Roman A. a Alexander MAKAROV. Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(11), 5288–5296. ISSN 1520-6882. DOI:10.1021/ac4001223
- [29] BARNES, J. H. a G. M. HIEFTJE. Recent advances in detector-array technology for mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2004, **238**(1), 33–46. ISSN 1387-3806. DOI:10.1016/j.ijms.2004.08.004
- [30] SEIDLER, Joerg, Nico ZINN, Martin E. BOEHM a Wolf D. LEHMANN. *De novo* sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics*. 2010, **10**(4), 634–649. ISSN 1615-9853. DOI:10.1002/pmic.200900459
- [31] CHAURAND, P., F. LUETZENKIRCHEN a B. SPENGLER. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1999, **10**(2), 91–103. ISSN 1044-0305. DOI:10.1016/S1044-0305(98)00145-7
- [32] WYSOCKI, V. H., K. A. RESING, Q. F. ZHANG a G. L. CHENG. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*. 2005, **35**(3), 211–222. ISSN 1046-2023. DOI:10.1016/j.ymeth.2004.08.013
- [33] STANDING, Kenneth G. Peptide and protein *de novo* sequencing by mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003, **13**(5), 595–601. ISSN 0959-440X. DOI:10.1016/j.sbi.2003.09.005
- [34] BRUNI, Renato, Gianluigi GIANFRANCESCHI a Giorgio KOCH. On peptide *de novo* sequencing: a new approach. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*. 2005, **11**(4), 225–234. ISSN 1075-2617. DOI:10.1002/psc.595
- [35] LAURSEN, Richard A. Solid-Phase Edman Degradation. *European Journal of Biochemistry*. 1971, **20**(1), 89–102. ISSN 1432-1033. DOI:10.1111/j.1432-1033.1971.tb01366.x
- [36] ALLEN, G. *Sequencing of Proteins and Peptides, Second Edition*. 2 edition. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. ISBN 978-0-444-81021-2.
- [37] YERGEY, Alfred L., Jens R. COORSSSEN, Peter S. BACKLUND, Paul S. BLANK, Glen A. HUMPHREY, Joshua ZIMMERBERG, Jennifer M. CAMPBELL a Marvin L. VESTAL. *De novo* sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2002, **13**(7), 784–791. ISSN 1044-0305. DOI:10.1016/S1044-0305(02)00393-8
- [38] HORN, D. M., R. A. ZUBAREV a F. W. MCLAFFERTY. Automated *de novo* sequencing of proteins by tandem high-resolution mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, **97**(19), 10313–10317. ISSN 0027-8424. DOI:10.1073/pnas.97.19.10313

- [39] MA, Bin. Novor: real-time peptide *de novo* sequencing software. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2015, **26**(11), 1885–1894. ISSN 1879-1123. DOI:10.1007/s13361-015-1204-0
- [40] KINTER, Michel a Nicholas E. SHERMAN. *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. New York: Wiley-Interscience, 2000. Series on Mass Spectrometry. ISBN 978-0-471-32249-8.
- [41] CAGNEY, G. a A. EMILI. *De novo* peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging. *Nature Biotechnology*. 2002, **20**(2), 163–170. ISSN 1087-0156. DOI:10.1038/nbt0202-163
- [42] KEOUGH, T., R. S. YOUNGQUIST a M. P. LACEY. A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsorce decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999, **96**(13), 7131–7136. ISSN 0027-8424.
- [43] KEOUGH, T., R. S. YOUNGQUIST a M. P. LACEY. Sulfonic acid derivatives for peptide sequencing. *Analytical Chemistry*. 2003, **75**(7), 156A–165A. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac031274i
- [44] LEE, Y. H., M. S. KIM, W. S. CHOIE, H. K. MIN a S. W. LEE. Highly informative proteome analysis by combining improved N-terminal sulfonation for *de novo* peptide sequencing and online capillary reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2004, **4**(6), 1684–1694. ISSN 1615-9853. DOI:10.1002/pmic.200300698
- [45] WANG, D. X., S. R. KALB a R. J. COTTER. Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004, **18**(1), 96–102. ISSN 0951-4198. DOI:10.1002/rcm.1289
- [46] CHEN, P., S. NIE, W. MI, X. C. WANG a S. P. LIANG. *Ne novo* sequencing of tryptic peptides sulfonated by 4-sulfophenyl isothiocyanate for unambiguous protein identification using post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004, **18**(2), 191–198. ISSN 0951-4198. DOI:10.1002/rcm.1280
- [47] SHIN, Joong-Won, Yong Ho LEE, Sungu HWANG a Sang-Won LEE. Observation of an unusually facile fragmentation pathway of gas-phase peptide ions: a study on the gas-phase fragmentation mechanism and energetics of tryptic peptides modified with 4-sulfophenyl isothiocyanate (SPITC) and 4-chlorosulfophenyl isocyanate (SPC) and their 18-crown-6 complexes. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007, **42**(3), 380–388. ISSN 1076-5174. DOI:10.1002/jms.1172
- [48] SHEVCHENKO, A., I. CHERNUSHEVICH, W. ENS, K. G. STANDING, B. THOMSON, M. WILM a M. MANN. Rapid „*de novo*” peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*. 1997, **11**(9), 1015–1024. ISSN 0951-4198.

- [49] BANTSCHEFF, Marcus, Birgit DÜMPELFELD a Bernhard KUSTER. Femtomol sensitivity post-digest (18)O labeling for relative quantification of differential protein complex composition. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*. 2004, **18**(8), 869–876. ISSN 0951-4198. DOI:10.1002/rcm.1418
- [50] HSU, J. L., S. Y. HUANG, N. H. CHOW a S. H. CHEN. Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Analytical Chemistry*. 2003, **75**(24), 6843–6852. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac0348625
- [51] QIN, Hongqiang, Fangjun WANG, Yi ZHANG, Zhengyan HU, Chunxia SONG, Ren'an WU, Mingliang YE a Hanfa ZOU. Isobaric cross-sequence labeling of peptides by using site-selective N-terminus dimethylation. *Chemical Communications*. 2012, **48**(50), 6265–6267. ISSN 1359-7345. DOI:10.1039/c2cc31705b
- [52] KIM, T. Y., Y. V. BRUN a J. P. REILLY. Effects of tryptic peptide esterification in MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2005, **77**(13), 4185–4193. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac0481250
- [53] GU, S., S. Q. PAN, E. M. BRADBURY a X. CHEN. Use of deuterium-labeled lysine for efficient protein identification and peptide *de novo* sequencing. *Analytical Chemistry*. 2002, **74**(22), 5774–5785. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac0204350
- [54] NOGA, M. J., A. ASPERGER a J. SILBERRING. N-Terminal H-3/D-3-acetylation for improved high-throughput peptide sequencing by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with a time-of-flight/time-of-flight analyzer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, **20**(12), 1823–1827. ISSN 0951-4198. DOI:10.1002/rcm.2522
- [55] MÜNCHBACH, M., M. QUADRONI, G. MIOTTO a P. JAMES. Quantitation and facilitated *de novo* sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety. *Analytical Chemistry*. 2000, **72**(17), 4047–4057. ISSN 0003-2700.
- [56] YAMAGUCHI, M., T. NAKAZAWA, H. KUYAMA, T. OBAMA, E. ANDO, T. OKAMURA, N. UEYAMA a S. NORIOKA. High-throughput method for N-terminal sequencing of proteins by MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2005, **77**(2), 645–651. ISSN 0003-2700.: DOI:10.1021/ac048776w
- [57] ITO, Akihiro, Taka-Aki OKAMURA, Hitoshi YAMAMOTO, Norikazu UEYAMA, Minoru YAMAGUCHI, Hiroki KUYAMA, Eiji ANDO, Susumu TSUNASAWA, Kojiro AKE, Ryoji MASUI, Seiki KURAMITSU, Takashi NAKAZAWA a Shigemi NORIOKA. Simultaneous detection of N-terminal fragment ions in a protein mixture using a ruthenium(II) complex. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007, **21**(16), 2647–2653. ISSN 0951-4198. DOI:10.1002/rcm.3126
- [58] BC. JITKA VÍTOVÁ. *Metody sekvenování peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie*. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. 2015
- [59] BEARDSLEY, R. L. a J. P. REILLY. Optimization of guanidination procedures for MALDI mass mapping. *Analytical Chemistry*. 2002, **74**(8), 1884–1890. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/ac015613o

- [60] BOERSEMA, Paul J., Reinout RAIJMAKERS, Simone LEMEER, Shabaz MOHAMMED a Albert J. R. HECK. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nature Protocols*. 2009, **4**(4), 484–494. ISSN 1754-2189. DOI:10.1038/nprot.2009.21
- [61] KATHERINE E. HERSBERGER. *Metal-oxide enrichment and gas-phase characterization of sulfopeptides using fourier transform ion cyclotron resonance mass spektrometry*. B.m.: The University of Michigan. 2012
- [62] YANJIE JIANG. *Approaches for Improved Positional Proteomics*. B.m.: University of New Orleans. 2013

PŘÍLOHY

Příloha 1. Přehled teoretických peptidů trypticky naštěpeného myoglobinu.

Tabulka obsahuje aminokyselinové sekvence peptidů, počet vynechaných štěpných míst a teoretické m/z hodnoty peptidů bez modifikace i po modifikaci různými činidly použitých v prováděných experimentech.

Aminokyselinová sekvence peptidu	Počet vynechaných štěpných míst	Hodnoty m/z (1+)						
		Bez modifikace	Typ reakčního činidla					
			OMIMHS	SPITC	OMIMHS a SPITC	SPC	OMIMHS a CH ₂ O+ NaBH ₃ CN	CH ₃ CH ₂ OH
NDIAAK	0	631,3410	673,3628	846,3121	888,3339	830,3349	701,3941	687,4036
ELGFQG	0	650,3144	650,3144	865,2855	865,2855	849,3083	678,3457	706,3770
ASEDLK	0	662,3355	704,3573	877,3066	919,3284	861,3294	732,3886	746,4294
FKHLK	1	672,4192	756,4628	887,3903	971,4339	871,4131	784,4941	700,4505
FDKFK	1	684,3715	768,4151	899,3426	983,3862	883,3654	796,4464	740,4341
TEAEMK	0	708,3233	750,3451	923,2944	965,3162	907,3172	778,3764	792,4172
HKIPIK	1	735,4876	819,5312	950,4587	1034,5023	934,4815	847,5625	763,5189
ALELFR	0	748,4352	748,4352	963,4063	963,4063	947,4291	776,4665	804,4978
ASEDLKK	1	790,4305	874,4741	1005,4016	1089,4452	989,4244	902,5054	874,5244
NDIAAKYK	1	922,4993	1006,5429	1137,4704	1221,5140	1121,4932	1034,5742	978,5619
YKELGFQG	1	941,4727	983,4945	1156,4438	1198,4656	1140,4666	1011,5258	997,5353
FDKFKHLK	2	1062,6095	1188,6749	1277,5806	1403,6460	1261,6034	1216,7062	1118,6721
HLKTEAEMK	1	1086,5612	1170,6048	1301,5323	1385,5759	1285,5551	1198,6361	1170,6551
LFTGHPETLEK	0	1271,6630	1313,6848	1486,6341	1528,6559	1470,6569	1341,7161	1355,7569
TEAEMKASEDLK	1	1351,6410	1435,6846	1566,6121	1650,6557	1550,6349	1463,7159	1491,7975
ALELFRNDIAAK	1	1360,7583	1444,8019	1575,7294	1659,7730	1559,7522	1472,8332	1444,8522
FKHLKTEAEMK	2	1361,7246	1487,7900	1576,6957	1702,7611	1560,7185	1515,8213	1445,8185
HGTVVLTALGGILK	0	1378,8417	1420,8635	1593,8128	1635,8346	1577,8356	1448,8948	1406,8730
TEAEMKASEDLK	2	1479,7359	1605,8013	1694,7070	1820,7724	1678,7298	1633,8326	1619,8924
HPGDFGADAQGAMTK	0	1502,6693	1544,6911	1717,6404	1759,6622	1701,6632	1572,7224	1586,7632
KHGTVVLTALGGILK	1	1506,9366	1590,9802	1721,9077	1805,9513	1705,9305	1619,0115	1534,9679
HGTVVLTALGGILKK	1	1506,9366	1590,9802	1721,9077	1805,9513	1705,9305	1619,0115	1534,9679
NDIAAKYKELGFQG	2	1553,7958	1637,8394	1768,7669	1852,8105	1752,7897	1665,8707	1637,8897
VEADIAGHGQEV LIR	0	1606,8547	1606,8547	1821,8258	1821,8258	1805,8486	1634,8860	1718,9799
KHGTVVLTALGGILKK	2	1635,0316	1761,0970	1850,0027	1976,0681	1834,0255	1789,1283	1663,0629
HGTVVLTALGGILKKK	2	1635,0316	1761,0970	1850,0027	1976,0681	1834,0255	1789,1283	1663,0629
ALELFRNDIAAKYK	2	1651,9166	1777,9820	1866,8877	1992,9531	1850,9105	1806,0133	1736,0105
LFTGHPETLEKFDK	1	1661,8533	1745,8969	1876,8244	1960,8680	1860,8472	1773,9282	1773,9785
HLKTEAEMKASEDLK	2	1729,8789	1855,9443	1944,8500	2070,9154	1928,8728	1883,9756	1870,0354

Aminokyselinová sekvence peptidu	Počet vynechaných štěpných míst	Hodnoty m/z (1+)						
		Bez modifikace	Typ reakčního činidla					
			OMIMHS	SPITC	OMIMHS a SPITC	SPC	OMIMHS a CH ₂ O+ NaBH ₃ CN	CH ₃ CH ₂ OH
GLSDGEWQQVL	0	1815,9024	1857,9242	2030,8735	2072,8953	2014,8963	1885,9555	1899,9963
GHHEAELKPLAQ SHATK	0	1853,9617	1895,9835	2068,9328	2110,9546	2052,9556	1924,0148	1938,0556
YLEFISDAIIHVL HSK	0	1885,0218	1927,0436	2099,9929	2142,0147	2084,0157	1955,0749	1969,1157
LFTGHPETLEKFD KFK	2	1937,0167	2063,0821	2151,9878	2278,0532	2136,0106	2091,1134	2049,1419
KGHHEAELKPLA QSHATK	1	1982,0566	2108,1220	2197,0277	2323,0931	2181,0505	2136,1533	2066,1505
KKGHHEAELKPL AQSHATK	2	2110,1516	2236,2170	2325,1227	2451,1881	2309,1455	2264,2483	2194,2455
GHHEAELKPLAQ SHATKHK	1	2119,1155	2203,1591	2334,0866	2418,1302	2318,1094	2231,1904	2203,2094
ASEDLKKHGTVV LTALGGILK	2	2150,2543	2276,3197	2365,2254	2491,2908	2349,2482	2304,3510	2234,3482
HPGDFGADAQG AMTKALELFR	1	2232,0866	2274,1084	2447,0577	2489,0795	2431,0805	2302,1397	2344,2118
KGHHEAELKPLA QSHATKHK	2	2247,2105	2373,2759	2462,1816	2588,2470	2446,2044	2401,3072	2331,3044
IPIKYLEFISDAIIH VLHSK	1	2336,3377	2420,3813	2551,3088	2635,3524	2535,3316	2448,4126	2420,4316
GHHEAELKPLAQ SHATKHKIPIK	2	2570,4314	2696,4968	2785,4025	2911,4679	2769,4253	2724,5281	2654,5253
HKIPIKYLEFISD AIIHVLHSK	2	2601,4915	2727,5569	2816,4626	2942,5280	2800,4854	2755,5882	2685,5854
HPGDFGADAQG AMTKALELFRND IAAK	2	2844,4097	2970,4751	3059,3808	3185,4462	3043,4036	2998,5064	2984,5662
VEADIAGHGQEV LIRLFTGHPETLE K	1	2859,4999	2943,5435	3074,4710	3158,5146	3058,4938	2971,5748	3027,6877
VEADIAGHGQEV LIRLFTGHPETLE KFDK	2	3249,6903	3375,7557	3464,6614	3590,7268	3448,6842	3403,7870	3417,8781
YLEFISDAIIHVL HSKHDPGDFGADA QGAMTK	1	3368,6732	3452,7168	3583,6443	3667,6879	3567,6671	3480,7481	3508,8297
GLSDGEWQQVL NVWGKVEADIA GHGQEVLR	1	3403,7393	3445,7611	3618,7104	3660,7322	3602,7332	3473,7924	3571,9271