

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Analýza posttranslačních modifikací proteinů pomocí kapilární
elektroforézy**

Bc. Helena Blaščáková

Diplomová práce

2012

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

**Analysis of posttranslational modifications of proteins by capillary
electrophoresis**

Bc. Helena Blaščáková

Thesis

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Helena Blaščáková**
Osobní číslo: **C10946**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Analýza posttranslačních modifikací proteinů pomocí kapilární elektroforézy**
Zadávající 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:

- a) Přehled posttranslačních modifikací proteinů se zaměřením na glykace.
- b) Teorie a přehled kapilárně elektromigračních metod a jejich spojení s hmotnostní spektrometrií.


Praktická část:

- a) Vypracování kapilárně-elektroforetických separačních metod vhodných pro analýzu peptidických štěpů proteinů se zaměřením na spojení s hmotnostním spektrometrem.
- b) Praktická aplikace/ověření vypracovaných metodik pro analýzu modelových proteinů/peptidů.
- c) Analýza modifikovaných (glykovaných) proteinů.

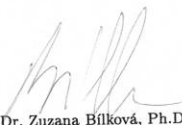
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.**
Fyziologický ústav AV ČR

Datum zadání diplomové práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2012

Prohlášení

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 9. 5. 2012

Bc. Helena Blaščáková

Poděkování

Poděkování patří vedoucímu diplomové práce prof. Ing. Ivanu Mikšíkovi, DrSc. za jeho odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování zadaného tématu. Děkuji také všem členům laboratoře na oddělení analýzy fyziologicky aktivních látek AV ČR za jejich pomoc a podporu. A dále bych chtěla poděkovat rodičům, sourozencům a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá analýzou posttranslačně modifikovaných proteinů za využití kapilární zónové elektroforézy ve spojení s hmotnostní detekcí. Posttranslační modifikace jsou studovány na glykovaných proteinech. Modelové vzorky byly připraveny z hovězího sérového albuminu, hovězího kolagenu (typ I) a lidského transferinu.

Teoretická část se zabývá posttranslačními modifikacemi, principy elektromigračních metod se zaměřením na kapilární zónovou elektroforézu, zlepšení citlivosti detekce a využití spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem pro analýzu peptidů/proteinů.

V experimentální části jsou uvedeny použité chemikálie a přístroje, které byly použity při měření. Je zde demonstrována optimalizace podmínek kapilární elektroforézy pro následné spojení s hmotnostním spektrometrem. Dále jsou uvedeny metody, které byly využity při studii.

Poslední část diplomové práce je věnována získaným výsledkům a diskuzi. Jsou zde uvedeny konkrétní pozice, na kterých byly nalezeny karboxymethylace lysinu v polypeptidovém řetězci a dále jsou uvedeny rozdíly v počtu nalezených modifikací při užití různých typů modifikátorů (glukóza, ribóza, glyoxal, glutardialdehyd).

KLÍČOVÁ SLOVA

Posttranslační modifikace, glykace, protein, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, optimalizace.

ABSTRACT

The thesis deals with analysis of posttranslational modifications of proteins by capillary electrophoresis coupling to mass spectrometry. These modifications are studied on the base of glycation proteins (bovine serum albumin, bovine collagen – type I and human transferrin).

The theoretical part deals with posttranslational modifications, electromigration methods focusing on capillary zone electrophoresis, their principles and improved detection sensitivity. Then use of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for analysis of peptides/proteins is described.

The chemicals and methods which were use in this study are introduced in the experimental part. The optimization of capillary electrophoresis for subsequent coupling to mass spectrometry is demonstrated here also.

The last part of the thesis is devoted to the results and discussion. There are presented positions of carboxymethyl lysine in polypeptide chain. There are mentioned differences found in the number of modification in case of used different types of chemicals compounds (glucose, ribose, glyoxal, glutardialdehyde).

KEYWORDS

Posttranslational, modification, glycation, protein, capillary electrophoresis, mass spectrometry, optimization.

SEZNAM ZKRATEK

2-DE	dvojdimenzionální elektroforéza
AE	afinitní elektroforéza
AGEs	konečné produkty pokročilé glykace
AGOE	koncové produkty pokročilé glyko-oxidace
ATP	adenosintrifosfát
BGE	základní elektrolyt
BSA	hovězí sérový albumin
CE	kapilární elektroforéza
CE/ESI-MS	spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem
CE/MS	spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem
CEC	kapilární elektrochromatografie
CE-LIF	spojení kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CLC	kapilární kapalinová chromatografie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EKC	elektrokinetická chromatografie
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FWHM	plná šířka v polovině výšky
GSH	glutathion
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HUPO	organizace pro výzkum lidského proteomu
IEF	izoelektrická fokusace
ITP	izotachoforéza
LC	kapalinová chromatografie
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOD	limit detekce
MALDI	laserová desorpce za účasti matrice
MS	hmotnostní spektrometr
MS-TOF	hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu
PTM	post-translační modifikace
Q	quadrupól
Q-TOF	hybridní analyzátor doby letu s quadrupólem
ROS	kyslíkové radikály
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrilamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
Tris	tris[hydroxymetyl]aminomethan hydrochlorid
UV	ultrafialová oblast záření
VIS	viditelná oblast záření
ZE	zónová elektroforéza

OBSAH

1	Úvod.....	13
2	Teoretická část.....	14
2.1	Posttranslační modifikace proteinů.....	14
2.1.1	Glykace proteinů.....	14
2.1.2	Maillardova reakce a tvorba AGE proteinů	15
2.1.3	Albumin	17
2.1.4	Kolagen	18
2.1.5	Transferin	19
2.2	Kapilární elektromigrační metody.....	20
2.2.1	Princip kapilární zónové elektroforézy (CZE).....	21
2.2.2	Využití CE pro separaci peptidů a proteinů	23
2.2.3	Základní elektrolyt.....	24
2.2.4	Zvyšování citlivosti	24
2.2.4.1	Prekoncentrační metody.....	25
2.2.4.2	Derivatizace	26
2.2.5	Miniaturizace CE.....	27
2.2.6	Enzymy používané při analýze proteinů/peptidů	28
2.3	Využití MS v proteomice	30
3	Experimentální část.....	33
3.1	Použité chemikálie.....	33
3.2	Použitá přístrojová zařízení.....	33
3.3	Příprava vzorků – albuminy, transferiny.....	34
3.3.1	Glykace	34
3.3.2	Redukce a alkylace cysteinu	34
3.3.3	Odsolení	35

3.3.4	Štěpení trypsinem	35
3.4	Příprava vzorků – kolageny.....	35
3.4.1	Glykace	35
3.4.2	Štěpení kolagenu CNBr	36
3.4.3	Štěpení trypsinem	36
3.5	Měřicí přístroje a metody	36
3.5.1	Kapilární zónová elektroforéza (CZE) s UV detekcí	36
3.5.2	CZE – MS analýza proteinů štěpených trypsinem	37
3.5.3	NanoLC-MS	38
4	Výsledky a diskuze	39
4.1	Optimalizace CE s UV detekcí.....	39
4.1.1	Doba nástřiku vzorku.....	39
4.1.2	Pufry a obalová kapalina.....	42
4.2	CZE – MS/Q-TOF analýza proteinů štěpených trypsinem.....	44
4.3	CZE-MS/IT analýza proteinů štěpených trypsinem	47
4.4	NanoLC-MS/Q-TOF analýza proteinů štěpených trypsinem.....	60
5	Závěr	63
6	Literatura.....	65

1 Úvod

Peptidy a proteiny tvoří základní skupinu vysokomolekulárních látek v živých organismech. Mezi jejich hlavní biologickou úlohu patří kontrola a regulace fyziologických procesů. Podle funkce, které proteiny vykonávají, je lze rozdělit na stavební, transportní, skladovací, katalytické a regulační, ochranné a obranné funkce. Je velmi důležité nejen znát strukturu proteinů, jejich vzájemné interakce, ale i jejich modifikace v živých organismech. V současné době je ve světě značná část pozornosti věnována právě studiu proteinů. Posttranslační modifikace proteinů můžeme rozdělit na enzymatické a neenzymatické. Mezi významné neenzymatické modifikace patří glykace, která se projevuje jak při fyziologických (stárnutí), tak i patofyziologických (např. při diabetes mellitus) procesech.

Vědecká disciplína zabývající se těmito vysokomolekulárními látkami se nazývá proteomika. Cílem proteomiky je získat komplexní přehled o struktuře, biologické funkci a vzájemné interakci proteinů přítomných v organismu. Byla zřízena mezinárodní organizace pro výzkum lidského proteomu HUPO (Human Proteome Organization). Činnost organizace HUPO byla zahájena dne 9. února roku 2001. Od ledna 2005 je mezinárodní sekretariát HUPO umístěn na McGill Univerzitě v Montrealu (Quebec, Kanada) [1].

V proteomice jsou nejčastěji využívány separační metody spojené s hmotnostní spektrometrií. Mezi tyto metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), dvourozměrná elektroforéza (2-DE) a kapilární elektroforéza (CE). Separace, analýza a charakterizace peptidů pomocí kapilárních elektromigračních metod patří mezi jedny z nejúčinnějších metod mezi vysoceúčinnými separačními technikami.

2 Teoretická část

2.1 Posttranslační modifikace proteinů

Posttranslační modifikace proteinů (PTM) je termín, který označuje změny v polypeptidovém řetězci, které probíhají po ukončení jejich syntézy na ribosomu. PTM jsou reverzibilní i ireverzibilní a výrazně ovlivňují vlastnosti proteinů. Analýza PTM má zásadní význam pro objasnění složitých procesů v buňce, jako je její dělení, růst a diferenciaci. Prakticky všechny modifikace jsou spojeny se změnou molekulové hmotnosti proteinu. V posledních letech se jako velmi užitečným nástrojem pro určení typu modifikace, ale i konkrétních aminokyselin, na kterých se modifikace nachází, ukázalo používání hmotnostní spektrometrie (MS). MS má několik výhod: (I) velmi vysoká citlivost; (II) schopnost lokalizovat známé modifikace a místa PTM; (III) objevovat nová místa PTM; (IV) schopnost identifikace PTM ve složité směsi proteinů; (V) schopnost kvantifikovat změny v PTM na různých místech proteinu. Do PTM reakcí můžeme zařadit glykosylace, glykace, fosforylace, metylace nebo hydroxylace [2].

2.1.1 Glykace proteinů

Glykosylaci proteinů můžeme rozdělit na enzymatické a neenzymatické. Neenzymatická glykosylace, glykace, je posttranslační modifikace proteinů, která začíná reakcí karbonylové skupiny redukujícího cukru s volnou aminoskupinou proteinu. V roce 1912 tuto reakci mezi aminokyselinami a cukry popsal francouzský fyzik a chemik Lous Camille Maillard (4. 2. 1878 – 12. 5. 1936) [3]. Maillard pozoroval „neenzymatické hnědnutí“ bílkovin při zahřívání s cukry. Tato reakce je potravinářským chemikům známá jako tzv. Maillardova reakce. Při neenzymatické glykaci vznikají komplexní a heterogenní skupiny látek, které se mohou hromadit například v plazmě a tkáních. Tyto změny jsou patrné jak při stárnutí organismu (při tzv. normálně fyziologických procesech), tak při patofyziologických procesech, například při diabetu a při selhávání ledvin. Tyto modifikované látky mohou hrát důležitou roli v patogenezi chronických komplikací spojené právě s diabetem nebo poruchou ledvin [4].

Glykace u takzvaně dlouho žijících bílkovin je doprovázena řadou patologických jevů. Mezi dlouho žijícími proteiny hraje významnou úlohu strukturální bílkovina kolagen, která tvoří 1/3 proteinů lidského těla. Vyskytuje se ve více chemických typech [5]. Například kolagen typu I je ve většině pojivových tkání, kolagen typu IV se vyskytuje v bazální glomerulární membráně. Glykace kolagenu typu IV (kolagen glomerulární bazální membrány) může přispět k funkční i morfologické změně u diabetické glomerulosklerózy [6]. Glykovaný kolagen typu IV má nižší afinitu vůči jiným proteinům. Interakce protein - protein má následně vliv na filtrační činnost bazální membrány glomerulů. Tyto interakce určitým způsobem vysvětlují ztenčení bazální membrány u dlouhodobého diabetu, způsobující diabetickou mikroangiopatii a následné selhání ledvin. Glykace bazální glomerulární membrány byla zkoumána v práci Cohena a spol. [7]. Glykace jiné dlouho žijící bílkoviny, myelinu, může vést k poškození nervové tkáně [8]. Extrémně dlouho žijící bílkoviny jsou krystaliny, které se během života téměř nemění. Krystaliny jsou přítomny v oční čočce. U diabetiků byla prokázána zvýšená glykace a tím i tvorba agregátů krystalinů vázaných disulfidickými můstky, diabetická katarakta. Rovněž během stárnutí také dochází ke glykaci krystalinů a tím i k poškození zraku, senilní katarakta [9]. Dále může s redukujícími cukry reagovat například hemoglobin, elastin nebo třeba plazmatické bílkoviny za vzniku nerozpustných produktů pokročilé glykace tzv. AGEs produkty (Advanced Glycation End products) [10]. Například glykovaný hemoglobin HbA_{1c} je v klinické biochemii běžně používán jako marker diabetu.

2.1.2 Maillardova reakce a tvorba AGE proteinů

Maillardova reakce neboli neenzymatická glykace proteinů probíhá ve 3 hlavních krocích: iniciace, propagace a terminace.

V prvním kroku, iniciaci, vznikají tzv. ranné produkty glykace. Dochází ke kondenzaci aldehydové skupiny redukujícího cukru s volnou aminoskupinou koncové aminokyseliny (většinou ϵ -aminoskupina lysinového zbytku). Redukující cukry mohou reagovat i s dalšími metabolity obsahujícími ketoskupinu nebo aldehydickou skupinu. A dále mohou reagovat i s molekulou nukleových kyselin. Nejběžněji se vyskytující redukující cukr, který reaguje s aminokyselinami, je glukóza. Dále pak to je fruktóza, manóza, galaktóza a další. Dochází ke vzniku nestabilní Schiffova base (aldrin). Vznik

Schiffovy base je reverzibilní, ale rychle podléhá přesmyku za vzniku stabilnější struktury, označující se jako Amadoriho produkt (ketoamin). Neenzymatická reakce *in vivo* podmínkách je regulována koncentrací sacharidů a proteinů, biologickým poločasem proteinu, reaktivitou volných aminoskupin a buněčnou permeabilitou pro sacharidy. Při podmínkách *in vivo* Amadoriho produkt dosáhne rovnováhy přibližně za 15 – 20 dní. Díky ireverzibilnímu charakteru spojení se hromadí v dlouho žijících i krátce žijících proteinech.

Ve druhém kroku, propagaci, jsou Amadoriho produkty degradovány za vzniku karbonylových sloučenin (glyoxal, methylglyoxal, deoxyglukosony). Vzniklé karbonylové sloučeniny jsou velmi reaktivní a mohou opět reagovat s volnými aminoskupinami proteinů, tím opět zahájí neenzymatickou glykaci.

Zvýšená koncentrace a vysoká reaktivita methylglyoxalu v séru ukazuje, že je jednou z nejdůležitějších sloučenin *in vivo*. Methylglyoxal vzniká jak neenzymatickou reakcí, tak i enzymatickou (glykolýza, metabolismus ketolátek a threoninu). Methylglyoxal je běžný metabolit a má potencionální vliv na širokou škálu buněčných procesů. Může působit selektivně proti nádorovým buňkám. Methylglyoxal má vliv na nespecifickou imunitu hostitele proti nádorovým buňkám, kde hluboce stimuluje imunitní systém. Například při pokusu byl prováděn test na myších s nádorem a bez nádoru. Zvířata s nádorem po podání methylglyoxalu byla déle naživu a nalezený nádor byl menší, než u skupiny, u které látka nebyla podávána [11]. Methylglyoxal také zvyšuje produkci reaktivních kyslíkových radikálů a snižuje syntézu ATP v mitochondriích [12].

Ve třetím kroku, terminaci, jsou karbonylové sloučeniny dále modifikovány řadou reakcí (oxidace, dehydratace) a výsledkem jsou nerozpustné konečné produkty pokročilé glykace (AGEs - Advanced Glycation End products). Procesy jsou ireverzibilní a trvale poškozují tkáň, ve které se ukládají. Hromadí se na proteinech s dlouhým biologickým poločasem (kolageny, krystalin, elastin, myelin) a poškozují je. Pokud se v syntéze pokročilých produktů uplatňuje oxidace, typy koncových produktů se běžně označují jako koncové produkty pokročilé glyko-oxidace (AGEs - Advanced Glyco-oxidation End products) [4].

2.1.3 Albumin

Albumin je hlavní protein krevní plazmy. Albumin se od ostatních plazmatických bílkovin liší tím, že nepatří do skupiny glykoproteinů. Není tedy glykosylován. Tvoří více jak 60% všech plazmatických bílkovin v těle. Jeho hlavní funkcí v organismu je regulace onkotického tlaku krve a dále plní v organismu transportní funkci pro látky více či méně důležité pro organismus. Na udržení onkotického tlaku má velký podíl jeho vysoká koncentrace a celkem malá molekulová hmotnost. Jako transportní protein je využíván například pro nekonjugovaný bilirubin, neesterifikované mastné kyseliny, pro hormony štítné žlázy, pro ionty, jako je vápník, hořčík, váže také sodík, draslík, zinek. Skoro 70 % zinku v plazmě je vyvázáno právě na tento transportní protein. Na albumin se vážou i některé léky jako je například penicilin. Dále přispívá k pufrční a antioxidační kapacitě krevní plazmy.

Celková koncentrace albuminu v séru je 35 – 53 g/l. Snížení této hladiny může být způsobeno poškozením jater nebo při proteinové malnutrici. Dále ke snižování hladiny albuminu přispívá, díky jeho malé molekulové hmotnosti, zvýšená ztráta albuminu močí (nefrotický syndrom). Snižování hladiny je také způsobeno zvýšeným katabolismem u nemocných s akutními záněty a nádory. Fyziologicky je zvýšena jeho hladina v době těhotenství, kdy se zvyšuje objem cirkulujících tekutin [13].

Albumin je syntetizován v hepatocytech jako preprotein o celkové délce aminokyselinové sekvence 609 (69 387 Da). V konečné fázi je tvořen jedním polypeptidovým řetězcem o celkovém počtu 585 aminokyselin. Biologický poločas albuminu je přibližně 15 - 20 dní, kdy dochází k jeho odbourávání endotelem krevních kapilár [14].

Glykovaný albumin nám může poskytnout informaci o stavu glykemie v předešlých 20 dnech. Obecně lze glykované proteiny využít pro kontrolu stavu diabetes mellitus a pro diagnostiku trvalé hyperglykemie v krvi. V plazmě albumin podléhá glykaci. Je to dáno jeho vysokou koncentrací. Nejběžněji používaným glykovaným proteinem pro kontrolu diabetes mellitus je glykovaný hemoglobin (HbA1c), který nás informuje o stavu glykemie v předešlých 2 až 3 měsících. Mezi proteiny, které podléhají glykaci a nevyužívají se pro diagnostiku cukrovky lze uvést například elastin, fibrinogen, proteiny trombocytů, membránové proteiny.

2.1.4 Kolagen

Jako kolageny jsou označovány proteiny s charakteristickou trojitou- α -šroubovicí, která je složena ze tří polypeptidových řetězců a obsahující peptidové úseky glycinu na každé třetí pozici. Chemicky jde o glykoprotein, který je ve vodě nerozpustný a tvoří základní hmotu pojivových tkání. Kolagen je znám v několika typech, které se liší v aminokyselinové sekvenci polypeptidového řetězce. Je známo přibližně 28 identifikovaných a popsanych typů kolagenu. Mezi pět nejběžněji se vyskytující typy patří kolagen typu I, který se nachází zejména ve šlachách, řídkém vazivu, kosti a rohovce. Kolagen typu II se nachází především v chrupavce. Kolagen typu III je rozšířen ve tkáních obsahující kolagen typu I, avšak oproti němu je více glykosylován. Typ III je důležitou složkou retikulárních vláken. Kolagen IV se vyskytuje v bazální membráně epitelálních a endotelálních buněk. Posledním nejznámějším typem kolagenu je typ V vyskytující se ve stěnách krevních cév.

Kolagen je syntetizován celou řadou buněk, zejména pak fibroblasty (vazivové buňky), chondroblasty (buňky chrupavky), osteoblasty (buňky kostí), ale i epitelovými buňkami jako takzvaný prokolagen. Z posttranslačních úprav kolagenu je nejdůležitější hydroxylace lysinu a prolinu. Dalším typem posttranslační modifikace typické hlavně pro kolagen typu I a II je tvorba příčných vazeb. Příčné vazby jsou typické pro zralé kolagenní molekuly, proto se nevyskytují v prokolagenu. Jedná se o propojení jednotlivých kolagenních vláken mezi sebou pomocí příčných vazeb. Tím je proces tvorby kolagenních vláken dokončen. Předpokladem vytvoření příčných vazeb je oxidativní deaminace lysinu a hydroxylysínu. Kolagen patří mezi bílkoviny s dlouhým biologickým poločasem a hraje významnou roli v procesu stárnutí (např. i vznik vrásek) [15].

Vlivem neenzymatické glykace kolagenů dochází jak ke strukturálním změnám, tak hlavně k funkčním změnám tohoto proteinu. Působením neenzymatické glykace dochází ke zvýšenému zesíťování kolagenních vláken a k nahromadění nadpočetných vazeb v kolagenu. Tím může dojít ke snížení elasticity vláknitého kolagenu, ke snížení permeability membrán a vzniku náboje na bazální membráně, může dojít i ke strukturálním změnám na arteriální stěně a k mikroangiopatickým komplikacím u diabetes mellitus. Tvorba pokročilých produktů glykace AGEs je jednou z hlavních cest, které se uplatňují právě v patogenezi cévních komplikací u lidí trpících cukrovkou.

2.1.5 Transferin

Komplex apotransferinu s ionty Fe^{3+} se nazývá transferin, někdy ve zkratce značen jako Tf. Jedná se o glykoprotein syntetizovaný játry o molekulové hmotnosti 77 064 Da s celkovým počtem aminokyselin 698 [14]. Obsahuje 2 oligosacharidové řetězce, na konci každého z řetězců se objevují negativně nabitě zbytky sialových kyselin. Zbytky kyseliny sialové umožňují separaci transferinu na několik izoform. Transferin patří do skupinu β -1 globulinů, s krátkým biologickým poločasem. Hladina transferinu v katabolických stavech klesá, proto je někdy označován jako negativní reaktant akutní fáze [15]. Pokles můžeme sledovat například při hepatopatii, proteinové malnutrici, u nádorových onemocnění, mírný pokles je i při akutní zátěži organismu. Vzestup hladiny transferinu v organismu může nastat při hypochromní anémii způsobenou nedostatkem železa, při zvýšeném rozpadu erytrocytů nebo při porušení syntézy v játrech. Fyziologicky je transferin zvýšen během gravidity [13].

Hlavní úloha transferinu v živém organismu je spojena s přenášením železa v organismu. Jeden mol transferinu váže 2 moly železa (železité ionty). Volné ionty železa jsou pro organismus toxické [16]. Organismus při vazbě železa na transferin jeho toxicitu snižuje a zároveň ho může transportovat na místo, kde je ho třeba.

Transferin působí jako antioxidant, zabraňuje vzniku kyslíkových radikálů (ROS). V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), kam řadíme superoxydy a hydroxylové radikály. Tyto reaktivní formy kyslíku mohou reagovat s biologickými strukturami, jako jsou mastné kyseliny, lipidy, aminokyseliny, proteiny a nukleové kyseliny, ale i s nízkomolekulárními látkami, a tím je poškodit. Ionty železa v organismu katalyzují tzv. Fentonovu reakci za vzniku již zmíněných vysoce reaktivních hydroxylových radikálů [17]. Fentonova reakce (Fenton 1894) představuje reakci peroxidu vodíku s iontem přechodného kovu v nižším mocenství, v našem případě se jedná o železnaté ionty:



Za fyziologických podmínek je celková vazebná kapacita transferinu nasycena železem (TIBC – total iron-binding capacity) přibližně z 1/3. Zbytek nevyužitá vazebná kapacita je takzvaná volná vazebná kapacita transferinu pro železo (LIBC - latent iron-binding capacity), někdy označována jako nenasycená vazebná kapacita (UIBC - unsaturated iron-binding capacity) [18]. *In vitro* pokusy ukázaly, že neenzymatická glykace transferinu zhoršuje schopnost vázat Fe^{3+} ionty. Volné ionty železa pak přispívají ke vzniku nadměrného množství kyslíkových radikálů [19].

U diabetu je zřejmé, že neenzymatická glykace je způsobena vysokou koncentrací glukózy v krvi. Vzhledem k důležité roli transferinu jako přenašeče železa a antioxidačních vlastností v plazmě, je vhodné znát změny funkce a struktury této biomolekuly související právě s glykací, jednou z posttranslačních změn transferinu. Je zde určitý vztah mezi glykovaným transferinem a oxidačním stresem, k němuž dochází v důsledku hyperglykemie. Při *in vitro* glykaci transferinu, bylo pozorováno zvýšení oxidačního stresu a narušení tak vazebné kapacity transferinu [19], [20].

2.2 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody, někdy souhrnně označované jako vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE - high-performance capillary electrophoresis) jsou považovány za velmi účinné, citlivé a perspektivní separační metody. HPCE metody zahrnují všechny elektromigrační separační principy realizované v kapiláře. Jsou založeny na dělení látek v elektrickém poli. Pro dělení se využívá kapilára naplněná základním elektrolytem (BGE), který vede elektrický proud.

Druhy elektroforéz, které lze využít pro separaci a analýzu peptidů a proteinů, lze rozdělit na základě jejich separačních vlastností. Hlavní veličinou je elektroforetická pohyblivost (mobilita), definovaná jako rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Závislost pohyblivosti nabitých částic závisí dále na jejich velikosti, náboji, hydrofobicitě a afinitě [21], [22].

Jednotlivé hlavní faktory ovlivňující pohyblivost:

- ✓ elektroforetická mobilita: zónové elektroforézy (ZE), izotachoforéza (ITP)
- ✓ velikost: separace skrz zesíťované prostředí, elektroforéza na gelech (CGE)
- ✓ náboj: izoelektrické fokusace (IEF), elektrokinetická chromatografie (EKC)
- ✓ hydrofobicita: elektrochromatografie (CEC), elektrokinetické chromatografie (EKC)
- ✓ afinita: separace využívající specifické interakce, afinitní elektroforéza (AE), elektrokinetická chromatografie (EKC)

I přes vysokou separační účinnost jednotlivých metod je v současné době nepostradatelnou součástí studia peptidů a proteinů využití kombinace dvou a více technik. Jedná se o takzvaný multidimenzionální přístup. Cílem je utvořit komplexní přehled o proteinech a peptidech obsažených v buňkách, orgánech a tkáních. Příkladem spojení dvou technik je IEF a SDS-PAGE v klasické 2-DE. Dále spojení LC-CE, CE-CE, CZE-CGE a mnoho dalších variant, kde tyto dvojdimenzionální systémy mohou být dále spojeny on-line s hmotnostní spektrometrií (MS). Spojení s MS umožňuje identifikovat stovky až tisíce peptidů a proteinů [23], [24]. Je třeba uvést, že projekt sekvence lidského genomu HUGO (Human Genome Organization) pracoval s desítkami tisíc genů, počet možných variant proteinů v organismu se ale odhaduje v řádech milionů.

2.2.1 Princip kapilární zónové elektroforézy (CZE)

CZE představuje jednu z nejčastěji používaných kapilárně-elektroforetických metod. Je to metoda jednoduchá a univerzální. Stala se určitou alternativou ke klasickým technikám plošné elektroforézy. Jednou z velkých výhod oproti plošným technikám je kratší doba analýzy. Tato doba je zkrácena díky těmto vlastnostem: (I) vznikající teplo je účinně odváděno, proto lze použít vysokého napětí; (II) detekce zón se provádí online a píky lze jednoduše a rychle vyhodnotit; (III) k samotné elektroforetické pohyblivosti se přidává i elektroosmotická pohyblivost. Zásluhou elektroosmotického toku je separační účinnost výrazně vyšší než u jiných elektroforetických metod.

CZE je druh elektroforézy, při níž jsou separovány nabitě částice uvnitř kapiláry ve stejnosměrném elektrickém poli. Nabitě částice migrují s rozdílnými elektroforetickými

rychlostmi a tím dochází k separaci. Během experimentu lze dělit a detekovat jak kladně nabitě tak i záporně nabitě částice. Pohyblivost nabitých částic závisí nejen na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekuly, ale také na použitých elektrolytech, elektrického pole a síle elektroosmotického toku [25].

Při separaci látek v CZE jsou oba konce tenké křemenné kapiláry ponořeny do nádobek naplněných základním elektrolytem (BGE). Tímto elektrolytem je naplněna i kapilára. Vnitřní průměr křemenné kapiláry je obvykle 50 μm nebo 75 μm a její délka je většinou v rozmezí 30 – 100 cm. Spolu s konci kapiláry jsou v nádobkách elektrody z inertního materiálu (například platiny). Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí v rozmezí od 10 do 30 kV. Díky malým rozměrům separačního prostoru lze relativně účinně odvádět Joulovo teplo, proto lze používat vysokých intenzit elektrického pole. Tím se dosahuje lepší účinnosti a rychlost separace. Do kapiláry se nadávkuje malý objem vzorku. Dávkovat vzorek můžeme různými způsoby a to buď elektrokineticky nebo hydrodynamicky. Jakmile je vzorek zaveden do kapiláry, je tento konec kapiláry ponořen zpět do elektrodové nádoby se základním elektrolytem. K systému je připojen zdroj vysokého napětí se stejnosměrným elektrickým polem. Napětí musí být po celou dobu separace konstantní.

Částice ze vzorku se pohybují různou rychlostí (elektroforetická rychlost v_{ep}) směrem k detektoru. Kromě této rychlosti je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem (EOF). Elektroosmotický tok v křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným vnitřním povrchem je orientován směrem ke katodě. Při použití křemenné kapiláry obsahující silanolové skupiny (Si-OH) dochází při kontaktu s roztoky o vyšším pH k disociaci těchto skupin. Disociací se vytváří záporný náboj na stěně kapiláry. Ke stěně jsou přitahovány kladně nabitě ionty základního elektrolytu a vzniká tak stabilní elektrická dvojvrstva (tzv. Sternova vrstva). Kationty blíže ke středu kapiláry vytvářejí difúzní vrstvu. Po vložení vysokého napětí se uvádí do pohybu nejen difúzní část elektrické dvojvrstvy, ale i veškerý roztok přítomný v kapiláře. EOF unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí a ovlivňuje tak výslednou migrační rychlost analytů. Rychlost je poměrně vysoká, většinou vyšší než rychlost elektroforetického toku. Proto směr výsledného pohybu kationtů a aniontů je stejný. Pohybují se směrem ke katodě. Výhodou tedy je, že kationty a anionty mohou být separovány současně v průběhu jedné analýzy [25], [26].

V určitém místě kapilára prochází přes detektor. Pro detekci analytů se využívají různé typy detektorů – absorpční fotometrický detektor (UV/VIS), fluorimetrický, vodivostní, amperometrický, detektory s diodovým polem (DAD). Nejčastěji se používá fotometrický (UV/VIS absorpční) detektor. V místě, kde kapilára prochází detekčním okénkem, je při zvolené vlnové délce měřena absorpce záření pohybujícího se nosného elektrolytu a zón analyzovaného vzorku. Získaný záznam se nazývá elektroforegram (závislost odezvy detektoru na čase). Informace, kterou získáme, je kvalitativní i kvantitativní. Kvalita je dána migračním časem a kvantita je přímo úměrná výšce neboli ploše píku.

2.2.2 Využití CE pro separaci peptidů a proteinů

Peptidy a proteiny představují v živém organismu bohatou skupinu životně důležitých biomolekul. Podstatné je znát jejich strukturu, vzájemné interakce a modifikace. Snaha je získat kompletní přehled o struktuře a funkci proteinů, které jsou přítomny v živém organismu. Analýza a charakterizace proteinů popřípadě peptidů patří mezi jedny z nejnáročnějších úkolů. Snaha je vyvinout takové metody, které provedou jednotlivé kroky analýzy jako je manipulace se vzorkem, čištění, derivatizace a dále separace včetně detekce na jednom zařízení. Kombinace vysoké účinnosti separace CE se selektivitou MS je silným analytickým nástrojem pro charakterizaci bílkoviny [27]. S ohledem k biologickému významu bílkovin a k jejich vlastnostem, jsou bílkoviny jednou z největších skupin látek analyzovaných pomocí CE. Složení jednotlivých polypeptidových řetězců se výrazně liší, mají různou velikost, tvar, elektrický náboj, hydrofobicitu a schopnost specifické vazby. Tyto vlastnosti jsou pak využívány k dělení pomocí elektromigračních metod.

Elektroforetická mobilita (pohyblivost) peptidů je soubor několika funkcí: (I) vlastnosti peptidů a proteinů (elektrický náboj, velikost a tvar); (II) vlastnosti prostředí, ve kterém se peptidy pohybují (složení, pH, iontová síla, viskozita, permitivita a teplota); (III) interakce peptidů se složkami v prostředí (tvorba komplexů, disociace, solvatace). Elektroforetická mobilita je ovlivněna mnoha faktory, proto ji vždy uvádíme spolu s danými experimentálními podmínkami, za kterých byla zjištěna. Takto charakterizovaná mobilita se nazývá efektivní mobilita. Vztah pro efektivní mobilitu byl zkoumán od

počátku elektroforetické separace peptidů a proteinů [28]. První, kdo tento vztah kvantitativně popsal, byl Offord roku 1966 [29].

Většinou se CE využívá pro stanovení čistoty proteinů, ať už se jedná o přírodní nebo synteticky připravované, popřípadě ji lze využít pro stanovení čistoty biologicky aktivních proteinů, jako jsou oxytocin, bradykinin, adrenokortikotropní hormon, insulin, růstový hormon a další. Význam CE spočívá také v peptidovém mapování a stanovení aminokyselinové sekvence v polypeptidovém řetězci [30].

2.2.3 Základní elektrolyt

Jednou z podmínek pro separaci peptidů a proteinů je výběr vhodného základního elektrolytu (pufru), to znamená roztoku, který je schopný udržet stabilní pH. Použitý pufr musí zprostředkovávat vodivé prostředí a musí mít nízkou UV absorbanci. Používají se pufrы anorganické i organické. Z anorganických pufrů se nejběžněji používají fosfátové a borátové, u organických to pak jsou citrátové a octanové. Při jejich výběru bychom měli brát v úvahu: (I) vliv kationtů a aniontů na migraci rozpouštěných látek; (II) ztrátu Joulova tepla; (III) puфраční schopnosti; (IV) rozpustnost a stabilitu; (V) interakci se stěnou kapiláry a vznik elektroosmotického toku [31].

Při volbě správného elektrolytu musíme brát ohled také na jeho koncentraci a pH. Hodnota pH se volí tak, aby rozlišení píků bylo maximální a doba analýzy minimální. Pro potlačení adsorpce separovaných látek a elektroosmotického toku se používají vysoké koncentrace pufrů (20 – 100 mM). Nevýhodou při těchto koncentracích je jejich vysoká vodivost. Ta způsobuje zvyšování proudu, ohřev elektrolytu a následkem toho dochází k rozmývání zón. Tento problém mohou řešit biologické pufrы, mající nízkou vodivost.

2.2.4 Zvyšování citlivosti

Nevýhodou kapilární elektroforézy s UV detekcí je nízká koncentrační citlivost, která je způsobena dávkováním malého objemu vzorku do kapiláry s relativně tlustou skleněnou stěnou a krátkou absorpční dráhou UV paprsku. Při zvětšení průměru kapiláry

sice dojde ke zvýšení detekce, ale zároveň s tím snížíme účinnost separace. Prekoncentrační metody nebo použití derivatizačních činidel je jednou z možností, jak tuto citlivost zvýšit.

2.2.4.1 Prekoncentrační metody

Pomocí prekoncentračních metod lze zvýšit citlivost CZE. Lze použít dva způsoby úpravy vzorku: off-line před separací a on-line v průběhu separace.

Dříve se používaly pro úpravu vzorku off-line metody. Hlavně se jednalo o úpravu vzorku pomocí extrakce na pevné fázi (SPE), membránové SPE, mikroextrakce na pevné fázi (SPME) a extrakce kapalina-kapalina (LLE). V současné době se používají metody, které on-line zvýší citlivost detekce. Jedná se o metody, které zakoncentrují analyt přímo v kapiláře [32].

Mezi 4 základní on-line prekoncentrační metody řadíme: (I) přechodné pH rozhraní („dynamic pH junction“); (II) přechodná izotachoforéza („transient isotachopheresis“); (III) zakoncentrování („stacking“); (IV) tzv. nametení („sweeping“). Výhoda těchto metod spočívá také v tom, že není nutná úprava měřicího přístroje. On-line metody jsou rychlé. Nedochází vlivem extrakčních postupů ke ztrátám analytu. Do kapiláry lze nadávkovat větší objem vzorku (omezení představuje délka použité kapiláry). Původně široké zóny vzorku se zkonzcentrují do velmi úzkých zón – mění se objem zóny, ale látkové množství analytu zůstává stejné. Tyto přístupy jsou vhodné například pro stopová množství vzorku [33]. Princip přechodného pH rozhraní („dynamic pH junction“) je znázorněn na schématu 1, kdy je použita delší doba nástřiku vzorku. Při vložení napětí na rozhraní dvou fází, dochází k tvorbě přechodného pH gradientu a tím vstupuje vzorek do oblasti základního elektrolytu. Zvýšené pH okolí oproti analytu zvyšuje mobilitu nabitých iontů. Během tohoto urychlení jsou ionty soustředěny do úzkých zón [34].

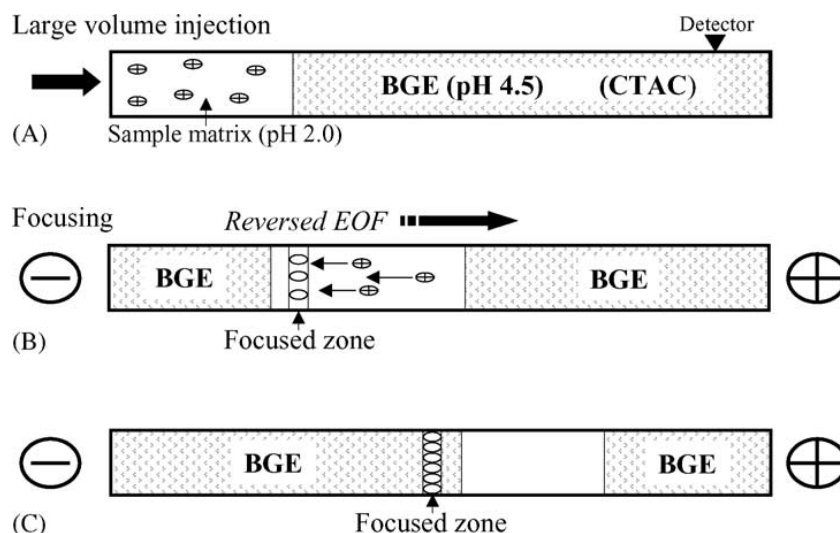


Schéma 1: Schematické znázornění metody přechodného pH rozhraní. (A) kapilára je naplněná elektrolytem o pH 4,5, pak je nadávkován vzorek s matricí o pH 2 (dávkování vzorku je delší než obvykle), (B) je vloženo napětí a dochází z důvodu změny mobility iontů na rozhraní dvou roztoků k migraci analytu a k jeho fokusaci do úzké zóny, (C) analyt migruje nezávisle na matrici vzorku [35].

2.2.4.2 Derivatizace

Cílem derivatizace je získání nových kvalitativních vlastností separovaných látek. Používá se ke zvýšení citlivosti a selektivity detekce a k usnadnění identifikace. Derivatizaci je možné provést před vlastní separací (pre-column), v průběhu separace (on-column) nebo až po separaci (post-column). Nejběžnějším způsobem derivatizace je provést ji před vlastní separací (pre-column) tzv. před-kolonová derivatizace. Mluvíme-li o kapilární elektroforéze tak před-kapilární derivatizace. Výhodou je široký výběr činidel a možnost provádět derivatizaci za extrémních podmínek. Mezi nejznámější derivatizační činidla, která se běžně používají, můžeme řadit 3-(4karboxybenzoyl)chinolin-2-karbaldehyd (CBQCA), 5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonylchlorid (dansylchlorid), fluorescamin, fluorenyl-9-methyl-chloroformiát (FMOC), naftalen-2,3-dikarbaldehyd (NDA), ftaldialdehyd (OPA) a fluoresceinisothiokyanát (FITC) [34].

Derivatizační techniky jsou v CE velmi rozšířené. Lze při nich dosáhnout velmi nízkých detekčních limitů (LOD), v oblasti nanomolárních koncentrací. Derivatizace nepřináší pouze výhody, ale má také svou zápornou stránku: prodloužení vlastní doby analýzy, výsledné produkty nemusí být stabilní, cena derivatizace (činitel) je vyšší.

Derivatizace peptidů většinou spočívá v reakci s fluorescenčními činidly za použití laserem indukovaného fluorescenčního detektoru (LIF). Tím se sníží detekční limit o 2 až 3 řády oproti nederivatizovaným peptidům s UV-detekcí.

Nové postupy byly vyvinuty pro glutathion (GSH), kdy je derivatizace uskutečněna pomocí 5-jodoacetamido fluoresceinu (5-IAF). Derivatizační podmínky jako je reakční čas, koncentrace 5-IAF a složení základního elektrolytu byly optimalizovány a metoda byla aplikována na zjištění koncentrace GSH v lidských HepG2 buňkách jaterního karcinomu [36]. Argonovým LIF detektorem při vlnových délkách 488/520 nm (excitace / emise) bylo umožněno vysoce senzitivní detekce GSH v řádech $\mu\text{mol/l}$.

Další možností, jak derivatizovat GSH, je za použití dichlorotirazinu (DTAF). Po optimalizaci podmínek je 5 μl roztoku vzorku smícháno s 5 μl 0,15 mM DTAF a 90 μl 80 mM Tris- H_3PO_4 pufru (pH = 9), inkubováno ve tmě 40 minut při 40°C. Inkubací ale dochází k prodloužení vlastní doby analýzy [37]. Jiné derivatizační činidlo, které lze použít pro značení GSH je naftalen-2,3-dikarboxyaldehyd (NDA). Po optimalizaci podmínek je 100 μl roztoku vzorku smícháno s 10 μl 20 mM tetraboritanu sodného (pH = 9,2) a 10 μl 5mM NDA, inkubováno ve tmě při pokojové teplotě po dobu 4 minut [38].

Byly vypracovány další metody pro značení peptidů/proteinů s využitím detektoru laserem indukované fluorescence (LIF). Seznam derivatizačních činitel, post-kolonových a před-kolonových reakcí pro analýzu proteinů a jiných analytů za využití CE s LIF detekcí lze nalézt například v publikovaném článku [39].

2.2.5 Miniaturizace CE

Součástí vývoje kapilární elektroforézy je její miniaturizace na bázi mikrofluidních čipů. Mikrofluidní čipy mají vlastnost kontrolovat a automatizovat řadu kroků při zpracovávání vzorku, čištění, třídění, štěpení a identifikace pomocí hmotnostní detekce.

Systemy na základě mikrofluidity jsou označovány jako „Mikro Total Analysis System“ (μ -TAS). Zkratka „ μ -TAS“ byla poprvé zformulována roku 1990 [40]. Snahou je, aby v budoucnu mohly vzniknout laboratoře na čipu (Lab-on-a-chip). Jde o přístroje, které jsou založeny na principu elektroforetických popřípadě chromatografických metod. Více se využívá elektroforetických metod, kdy přenos na čip je technicky jednodušší než u chromatografických metod [41], [42]. Vzorky proteinů jsou často k dispozici v omezeném množství, kdy analyt se nachází v objemech v řádech nano- až pikolitřů a nelze je některak namnožit. Proto nové technologie musí umožnit manipulaci s malými objemy a být velmi citlivé [41]. V proteomice byla většina mikrofluidních aplikací zaměřena na čipové separaci bílkovin ve spojení s hmotnostní detekcí. Pro ionizaci vzorku jsou využívány dva způsoby a to ionizace elektrosprejem (ESI) nebo ionizace laserovou desorpcí za účasti matrice (MALDI) [43]. Mikročipy CE-ESI/MS jsou vyvinuté hlavně pro sekvenování peptidů.

Výhoda μ -TAS systémů je především v nízké spotřebě vzorku a rozpouštědel, malou produkcí odpadu, zrychlení analýzy a díky rozměrům je také snadná manipulace a přenos z místa na místo. Problém, který se vyskytuje u těchto přístrojů, je detekce. Vzhledem k miniaturizované detekční cele a objemu v řádu μ l až pl, je spektrofotometrická detekce nevhodná [44]. Proto, místo klasické UV detekce, je detekce prováděna pomocí laserem indukované fluorescence (LIF), kdy lze paprsek budícího laseru zamířit přímo do prostoru detekční cely. Při spojení čipů s hmotnostním spektrometrem je často používán analyzátor doby letu (TOF – time of flight) [45].

2.2.6 Enzymy používané při analýze proteinů/peptidů

Pro identifikaci proteinů je důležité počáteční naštěpení proteinů. Štěpení může být enzymatické (proteolytické enzymy - proteázy) nebo chemické (bromcyan - BrCN, kyselina mravenčí), které je méně běžné, spíše používané jako doplňkové. Chemické štěpení se využívá tam, kde nelze provádět enzymatickou proteolýzu. Pomocí bromkyanu lze štěpit membránové proteiny nebo ty, které jsou ve vodě nerozpustné. Na základě požadované peptidové směsi lze zvolit typ enzymu. Štěpení pomocí enzymů má několik výhod: (I) vysoká specifita; (II) minimalizace vedlejších reakcí; (III) dobrá účinnost při štěpení. Důležité je dodržení určitých podmínek: (I) složení a pH reakčního pufru;

(II) poměr enzym/substrát; (III) teplota; (IV) doba inkubace; (V) pokud je nutné, provádí se redukce disulfidových vazeb a alkylace reaktivních cysteinů. Enzymy můžeme klasifikovat na proteinázy působící na proteiny a peptidázy působící na malé oligopeptidy. Nejběžněji se enzymy získávají z orgánů trávicího traktu obratlovců (pankreas – elastasa, chymotrypsin, trypsin; žaludek – pepsin), z krve (trombin), sleziny (katepsin), rostlin (papain, bromelain) a také z mikrobiálních kultur (Glu-C) [46].

Mezi nejběžněji používané proteolytické enzymy patří trypsin. Patří mezi pankreatické enzymy. Při štěpení proteinů trypsinem musí enzym splňovat určité podmínky. Především maximální výtěžnost a úplnost štěpení, minimalizace autolýzy trypsinu a opakovatelnost map molekulových hmotností jednotlivých peptidových fragmentů. Z těchto důvodů je při procesu proteolytického štěpení v roztoku nutné dodržet určitý poměr mezi enzymem a substrátem (1:50) [47]. Trypsin katalyzuje hydrolyzu peptidových vazeb za lysinem a argininem. Je-li následující zbytek prolin, štěpení neprobíhá (někdy lze pozorovat velmi pomalé štěpení této vazby). Obecně lze říci, že vazba obsahující lysin je štěpena rychleji než vazba s argininem. Štěpení proteinu probíhá nejčastěji při 37 °C a pH 8 – 8,5 po dobu několika hodin (4 – 24h). Dalším, v proteomice často používaným enzymem, je pepsin A, který nejlépe katalyzuje hydrolyzu peptidových vazeb za fenylalaninem, ale také za glutamátem, leucinem a tyrosinem (pokud následuje prolin, vazba není naštěpena). Enzym je aktivní při nízkém pH [48].

Molekulová hmotnost peptidových fragmentů se měří pomocí hmotnostního spektrometru. Identifikace proteinů vzniklých proteolytickým štěpením je založena na srovnávání experimentálně získaných dat s predikcí (peptide mass fingerprinting). Jedná se o srovnání experimentálně získaných dat o molekulové hmotnosti jednotlivých fragmentů s příslušnými predikčními soubory. Techniky ESI-MS a MALDI-MS umožňují provádět přímou fragmentaci proteinů. Tento postup se označuje jako „top-down“ proteomika (shora-dolů). Alternativní metodou je „bottom-up“ (zezdola nahoru) nebo „shotgun“ (brokovnice) a ta je založena na počátečním štěpení proteinu (v případě „shotgun“ směsi proteinů), enzymaticky nebo chemicky, a dále analyzována za použití přímého spojení LC-ESI-MS/MS nebo MALDI/MS. „Shotgun“ proteomika je v současné době velmi používaná pro svoji rychlost, citlivost a vyšší dynamický rozsah [49].

2.3 Využití MS v proteomice

Hmotnostní spektrometrie je široce využívaná metoda pro analýzu biologických vzorků. Díky univerzálnosti, citlivosti a selektivitě je to nepostradatelný článek proteomiky pro získání komplexního přehledu o struktuře, biologické funkci a vzájemné interakci proteinů přítomných v organismu. V touze poznat a pochopit lidský proteom vede vědce k vytvoření nových technologií, které zvyšují možnosti hmotnostní spektrometrie [50]. Spojením MS se separačními metodami výrazně zvyšujeme selektivitu. Tím je pak umožněno elegantní a rychlé identifikování složek vzorku ve složité biologické matici. MS představuje vysoce účinnou detekční metodu na základě zaznamenaného hmotnostního spektra [51].

MS převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z). Hmotnostní spektrometry se skládají z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru, to vše ve vakuovaném systému. Zásadní převrat nastal v elektroforetické charakterizaci separovaných peptidů a proteinů rozvojem ionizace elektrosprejem (ESI – electrospray ionization) a laserové desorpce za účasti matrice (MALDI – matrix assisted laser desorption ionization) [52], [53]. Signály (hmotnostní spektrum) naměřených peptidů a fragmentů jsou porovnávány se spektry určitého peptidu a jeho fragmentu v databázích a tím dochází k následné identifikaci proteinu včetně modifikace [54].

Spojení CE s měkkými ionizačními technikami (ESI, MALDI) nám přineslo velká množství dat o struktuře proteinů, sekvenci aminokyselin v polypeptidovém řetězci, dále o místech posttranslačních modifikací, peptidovém mapování a nekovalentních interakcí. Nejčastěji používaná ionizace pro spojení s CZE je pomocí již zmíněného elektrospreje a to především z těchto důvodů: (I) umožňuje detekovat vícenásobně nabitě ionty o vysoké molekulové hmotnosti; (II) molekuly mohou být přímo z kapiláry převedeny do hmotnostního spektrometru pomocí rozhraní [53]. Z těchto důvodů je ionizace elektrosprejem výhodná pro analýzu velkých biomolekul, které se jinak špatně odpařují a ionizují. Spojení CE-ESI lze provést 3 základními způsoby: (I) s přídavným tokem kapaliny („sheath-flow“); (II) bez přídavného toku kapaliny („sheathless“); (III) s vodivým kapalným spojením („liquid-junction“).

Nejrozšířenější je rozhraní vytvořené s přídavným tokem kapaliny („sheath-flow“). Tato metoda byla poprvé popsána v roce 1988 a představuje jednu z nejběžnějších a nejrobustnějších způsobů ve spojení CE-ESI [55]. Konec kapiláry je omýván proudem kapaliny, který umožňuje stabilní a i vyšší průtok kapaliny z CE do MS. Nevýhodou toho je nižší citlivost, která je způsobena naředěním analyzovaného vzorku. Tento problém je možné eliminovat zvýšením nástřikem vzorku do kapiláry. Pro stanovení vznikajících posttranslačních modifikací se používají nejen elektromigrační techniky, ale také chromatografické techniky.

Hmotnostní spektrometry se vedle ionizátoru skládají i z analyzátoru a detektoru. Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů podle jejich poměru hmota/náboj (m/z). Na základě různých fyzikálních vlastností separace iontů podle jejich poměru m/z lze využít rozdílných hmotnostních analyzátorů. Zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém (elektrickém) poli využívá magnetický analyzátor. Různou stabilitu oscilace iontů v dvojrozměrné nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí využívají analyzátoři jako je kvadrupól (Q) či iontová past (IT). Další analyzátor měří dobu letu iontů (TOF). Různé absorpce energie při cyklonálním pohybu iontů v kombinaci s magnetickým a elektrickým polem je využíváno v iontové cyklotronové rezonanci (ICR).

TOF analyzátor může být sestaven v různých módech. V lineárním módu se využívá k měření přímé dráhy letu iontů, v reflektornovém módu je dráha letu prodloužena pomocí reflektornového iontového zrcadla. TOF je pulzní hmotnostní analyzátor, kdy nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny (řádově ns - μ s) elektrickým polem do hmotnostní analyzátorové trubice a potom se přesně měří čas, za který ionty dolétnou k detektoru, podle čehož se určí jejich m/z . TOF umožňuje měřit s vysokou přesností (1 ppm a méně) a s vysokým rozlišením (40 000 FWHM).

Dalším z hmotnostních analyzátorů, využívajících se pro analýzu proteinů je iontová past. Skládá se ze vstupní a výstupní elektrody kruhového průřezu, které jsou uzemněny. Na středovou prstencovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty jsou nuceny pohybovat se uvnitř iontové pasti po kruhových trajektoriích. Se zvyšujícím se napětím se ionty s rostoucím m/z stávají nestabilními a jsou vypuzovány z pasti směrem k detektoru. Ve spojení s ionizací elektrosprejem, poskytující

vícenásobně nabité ionty, je iontová past velmi využívaným systémem pro proteomiku. I přes to, že přesnost i rozlišení je nižší než v případě TOF analyzátoru [56].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Kyselina octová byla od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika), tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl) od firmy Serva (Heidelberg, Německo). Chlorid sodný byl od firmy Penta (Chrudim, Česká republika) a azid sodný od Trucizna (Gliwice, Polsko). Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Glukóza, dihydrogenfosfát sodný od firmy Lachema (Brno, Česká republika). Hovězí sérový albumin (BSA), hovězí kolagen z Achillovy šlachy typ I, lidský transferin, trypsin (z prasečího pankreatu), pepsin (pepsin A, z prasečí žaludeční sliznice), proteináza K (z Tritirachium album), ribóza, dithiotreitol, hydrogenuhličitan amonný, methanol, isopropanol, kyselina mravenčí a kyselina jodoctová byly od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA). Od firmy Merck (Schuchardt, Německo) byl glutardialdehyd a glyoxal.

Ultra čistá voda byla připravována pomocí přístroje Milli-Q3UV (Millipore Merck, Darmstadt, Německo). Tato ultra čistá voda byla používána k přípravě veškerých připravovaných roztoků.

3.2 Použitá přístrojová zařízení

CZE Beckman typu P/ACE system 5000 (Beckman, Fullerton), MS s analyzátozem doby letu MaXis Q-TOF (Bruker Daltonics), MS s analyzátozem iontové pasti Agilent LC-MSD (Trap XCT-Ultra), Proxeon Easy-nanoLC (Proxeon), ultrazvuková lázni Elmasonic (Elma S15H), lyofilizátor (Alpha 1-2 LD plus), analytické digitální váhy (Sartorius 2004 MP), termostat (Mettler SV 1422), třepačka (Heidolph REAX top), pH – metr (HANNA instruments pH 210), centrifuga (BOECO S-8), lednice (Polar C161) a mrazák (Whirlpool AFG 304/G).

3.3 Příprava vzorků – albuminy, transferiny

3.3.1 Glykace

Proteinový vzorek, ať už se jednalo o protein transferin nebo albumin, byl připravován stejným postupem. Vzorek byl rozpuštěn v 0,2 mol/l fosfátovém pufru (NaH_2PO_4 ; pH 7,4) na koncentraci 1 mg/ml. Roztok vzorku byl inkubován 7 dní při 37 °C s jednotlivými sloučeninami obsahující oxo-skupinu (glukóza, ribóza, glyoxal a glutardialdehyd). Kontrolní vzorek byl připraven stejným způsobem, ale bez přídavku oxo-skupiny. Do roztoku se přidával azid sodný z důvodu zabránění kontaminace bakterií z prostředí, a tím i k zabránění nescifického naštěpení vzorku. Každý vzorek byl ještě převrstven malou vrstvou toluenu.

Po týdenní inkubaci při 37 °C byl vzorek 24h dialyzován v dialyzačních střívkách (Kalle, Wiesbaden-Biebrich, Německo) proti vodě (3x výměna). Po uplynutí doby dialyzace byl vzorek hluboce zamražen a následně zlyofilizován na lyofilizátoru (Alpha 1-2 LD plus, Osterode am Harz, Německo).

3.3.2 Redukce a alkylace cysteinu

K 5 mg zlyofilizovaného vzorku (albumin, transferin) bylo přidáno 0,5 ml pufru (6 mol/l guanidin HCl; 1,2 mol/l Tris-HCl; 2,5 mmol/l Na_2EDTA ; pH 8,4). Redukce byla provedena přidáním 25 μl dithiotreitolu o koncentraci 1 mol/l ke vzorku. Inkubace proběhla 30 minut při 65 °C. Následovala alkylace (karboxymethylace) pomocí 60 μl kyseliny jodoctové o koncentraci 1 mol/l. Inkubace proběhla ve tmě 40 minut při laboratorní teplotě. K zastavení reakce bylo použito 15 μl dithiotreitolu o koncentraci 1 mol/l.

3.3.3 Odsolení

Vzorky byly doplněny pufrům NH_4HCO_3 o koncentraci 20 mmol/l a pH 7,8 na požadovaný objem 3 ml. Odsolení probíhalo dialýzou pomocí D-Tube Dialyzer Maxi, MWCO 3,5 kDa. Vzorek byl nalit do dialyzační nádoby D-tubes, která je zkonstruována pro objem 0,1 – 3 ml se 2 ultra čistými celulózovými membránami. Dialýza probíhala 24 hodin. Po uplynutí této doby byl vzorek hluboce zamražen a následně zlyofilizován na lyofilizátoru Alpha 1-2 LD plus.

3.3.4 Štěpení trypsinem

Byl připraven roztok zlyofilizovaného vzorku (transferin, albumin) ve 20 mmol/l NH_4HCO_3 (pH 7,8). Výsledná koncentrace transferinu v pufru byla 5 mg/ml. K roztoku proteinu byl přidán trypsin v poměru enzym:substrát 1:50. Inkubace probíhala 24 hodin při 37 °C.

3.4 Příprava vzorků – kolageny

3.4.1 Glykace

Vzorek hovězího kolagenu z Achillovy šlachy typ I byl suspendován v 0,2 mol/l fosfátovém pufru (NaH_2PO_4 ; pH 7,4) na koncentraci 2 mg/ml. Roztok vzorku byl inkubován 7 dní při 37 °C s jednou z následujících oxo-sloučenin: glukózou, ribózou, glyoxalem a glutardialdehydem. Kontrolní vzorek kolagenu byl připraven stejným způsobem bez přidavku oxo-sloučeniny.

Do roztoku se přidával azid sodný z důvodu zabránění kontaminace bakterií z prostředí a tím i k zabránění nespecifického naštěpení vzorku. Každý vzorek byl ještě převrstven malou vrstvou toluenu, opět použito k zabránění kontaminace z prostředí.

3.4.2 Štěpení kolagenu CNBr

Po týdenní inkubaci byly vzorky zcentrifugovány 5 x po 5 minutách při 3 000 otáčkách, supernatant byl odstraněn a zbytek promyt vodou a znova centrifugován. Vzorek kolagenu byl redukován merkaptoethanolem (redukce oxidovaného methioninu) v 0,2 mol/l NH_4HCO_3 o pH 7, po dobu 18 hodin. Merkaptoethanol byl odpařen z porcelánových mističek a vzorek následně hluboce zamražen. Následovala lyofilizace (Alpha 1-2 LD plus) vzorků. K 5 mg zlyofilizovaného vzorku bylo přidáno 2 ml 70 % kyseliny mravenčí a vzniklý roztok byl probubláván dusíkem. Bylo přidáno 10 mg krystalického CNBr (2x více než vzorku) a opět byl vzorek probubláván dusíkem a následně inkubován při laboratorní teplotě (25 °C) po dobu 18h. Následně byl CNBr odpařen. Ke vzorkům na odpařovacích miskách bylo přidáno 10 ml H_2O a následně byly tyto vzorky hluboce zamrazeny. Druhý den byly vzorky kolagenů zlyofilizovány.

3.4.3 Štěpení trypsinem

Lyofilizát byl rozpuštěn v 0,2 M NH_4HCO_3 o pH 7,8. Následně proběhlo štěpení trypsinem v poměru enzym:substrát (1:50) a při teplotě 37 °C. Inkubace trvala 48 hodin, po inkubaci byly vzorky centrifugovány 5 minut při 3 000 otáčkách a supernatant oddělen a zamražen.

3.5 Měřicí přístroje a metody

3.5.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE) s UV detekcí

Metoda byla využita k optimalizaci podmínek (doba nástřiku vzorku a separační elektrolyty) před tím, než byla kapilární elektroforéza spojena s hmotnostním spektrometrem. Kapilární elektroforéza byla od firmy Beckman typ P/ACE system 5000 (Beckman, Fullerton, CA, USA). Byla používána křemenná kapilára (CM Scientific, Shipley, UK) o celkové délce 107 cm, efektivní délka kapiláry 100 cm s vnitřním

průměrem 50 μm . Kapilára byla vně pokryta polyimidem. Polyimid zvyšuje mechanickou odolnost kapilár. K detekci byl použit spektrofotometrický detektor (UV detekce při 214 nm).

3.5.2 CZE – MS analýza proteinů štěpených trypsinem

Separace hydrodynamicky nastříknutého vzorku byla provedena na přístroji Beckman P/ACE 5000. Spojení kapilární elektroforézy s MS bylo provedeno pomocí uzemněné jehly za využití obalové kapaliny (sheath liquid). Použité hmotnostní spektrometry byly: (I) s analyzátozem doby letu MaXis Q-TOF (Bruker Daltonics), (II) s analyzátozem iontové pasti Agilent LC-MSD (Trap XCT-Ultra). Vyhodnocování výsledků bylo provedeno pomocí proteinového softwaru Proteinscape (Bruker) a následného prohledávání peptidových map pomocí programu Mascot v databázích SwissProt.

- 1) MS s analyzátozem doby letu, MaXis Q-TOF (Bruker Daltonics), proteomic software (Proteinscape). Při měření byly nastaveny tyto podmínky: průtok plynu N_2 8 l/min, teplota 150 $^\circ\text{C}$, tlak 0,5 bar, napětí na uzemněné jehle 3 500 V, rozsah 200 – 1500 m/z, auto MS².
- 2) MS s iontovou pastí Agilent, LC-MSD (Trap XCT-Ultra), při měření byly nastaveny tyto podmínky: sušící plyn N_2 s průtokem 8 l/min, teplota sušícího plynu 150 $^\circ\text{C}$, tlak rozprašovače 5 psi, napětí na uzemněné jehle 3 500 V, rozsah 200 – 1500 m/z, auto MS².

Před zahájením analýzy byla kapilára vždy promyta a to v následujícím pořadí: 1 mol/l NaOH, voda, 1 mol/l HCl a opět voda, každý promývací krok trval 10 minut. Mezi analýzami byla kapilára promývána vodou (1 minuta) a následně pufrem (3 minuty). Před každou analýzou bylo nutné odvodušnit roztok, který byl využíván jako obalová kapalina (sheath liquid) v ultrazvukové lázni (Elma S15H Elmasonic, Singen, Německo). Před

nadávkováním pufrů do vialek je nutné vždy dané pufrы přefiltrovat přes filtry (0,45 μm stříkačkové filtry Cronus - Nylon, 13mm, green, dodavatel LABICOM, s.r.o, Olomouc). Vzorek byl nastříkovan hydrodynamicky. Vyhodnocování výsledků bylo prováděno pomocí proteinového programu Proteinscape.

3.5.3 NanoLC-MS

Analýza enzymaticky naštěpených proteinů technikou LC-MS/MS byla provedena na systému Proxeon Easy-nanoLC (Proxeon, Odense, Německo) s on-line spojením s hmotnostním spektrometrem MaXis Q-TOF (Bruker Daltonics), který byl vybaven nanoelektrosprejem. Pro odsolení a prekoncentraci vzorku byla použita předkolona NS-MP-10 Biosphere C18 (velikost částic: 5 μm, velikost pórů: 12 nm, délka: 20 mm, vnitřní průměr: 100 μm) a pro následnou separaci byla použita kapilární kolona NS-AC-11 Biosphere C18 (velikost částic 5μm, velikost pórů: 12 nm, délka: 150 mm, vnitřní průměr: 75 μm). Obě kolony byly zakoupeny od firmy NanoSeparations (Nieuwkoop, Nizozemsko). Na kolonu bylo dávkováno 5 μl vzorku.

Separace peptidů bylo dosaženo za pomoci lineárního gradientu mezi mobilní fází A (voda) a B (acetonitril), obě obsahující 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,25 μl/min. Separace začala 5 % mobilní fáze B, následována gradientovou elucí do 30 % B v 70 min. Dále pokračovala gradientová eluce do 50 % B v 10 min, a poté další eluce do 100 % B v 8 min s následným 2 min promytí 100 % B. Ekvilibrace kolony probíhala po dobu 10 min promytím 5 % mobilní fáze B. Při měření vzorků byly nastaveny následující podmínky: napětí na ESI 4 500 V, sušící plyn N₂ s průtokem 1 l/min, teplota sušícího plynu 160 °C, tlak rozprašovače 0,4 bar, rozsah 100 – 2200 m/z.

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí proteinového softwaru Proteinscape (Bruker) s následným prohledáním peptidových map pomocí programu Mascot v databázích SwissProt.

4 Výsledky a diskuze

Pro získání experimentálně naměřených dat jsem použila čtyři různé techniky: (I) CZ s UV detekcí, (II) spojení CE s MS s analyzátozem doby letu (TOF), (III) spojení CE s MS s iontovou pastí (IT), (IV) spojení nano-LC s MS s analyzátozem doby letu (TOF).

Výsledky ze spojených technik byly využity k lokalizaci posttranslačně modifikovaných míst na polypeptidovém řetězci jednotlivých bílkovin. Jednalo se o karboxymethylaci lysinu (CML). Pro tyto analýzy byly použity 3 různé proteiny a to albumin, transferin a kolagen. Tyto proteiny byly inkubovány s řadou modifikátorů (glukóza, ribóza, glyoxal, glutardialdehyd).

4.1 Optimalizace CE s UV detekcí

Pro výběr vhodných separačních podmínek jsem nejprve použila kapilární zónovou elektroforézu s UV detekcí. Na ní byla provedena optimalizace parametrů separace bez spojení s MS, tj. detekce pouze pomocí UV detektoru (214 nm) na kapiláře s detekčním okénkem (200 x 800 μm), o celkové délce 107 cm (délka k detektoru 100cm).

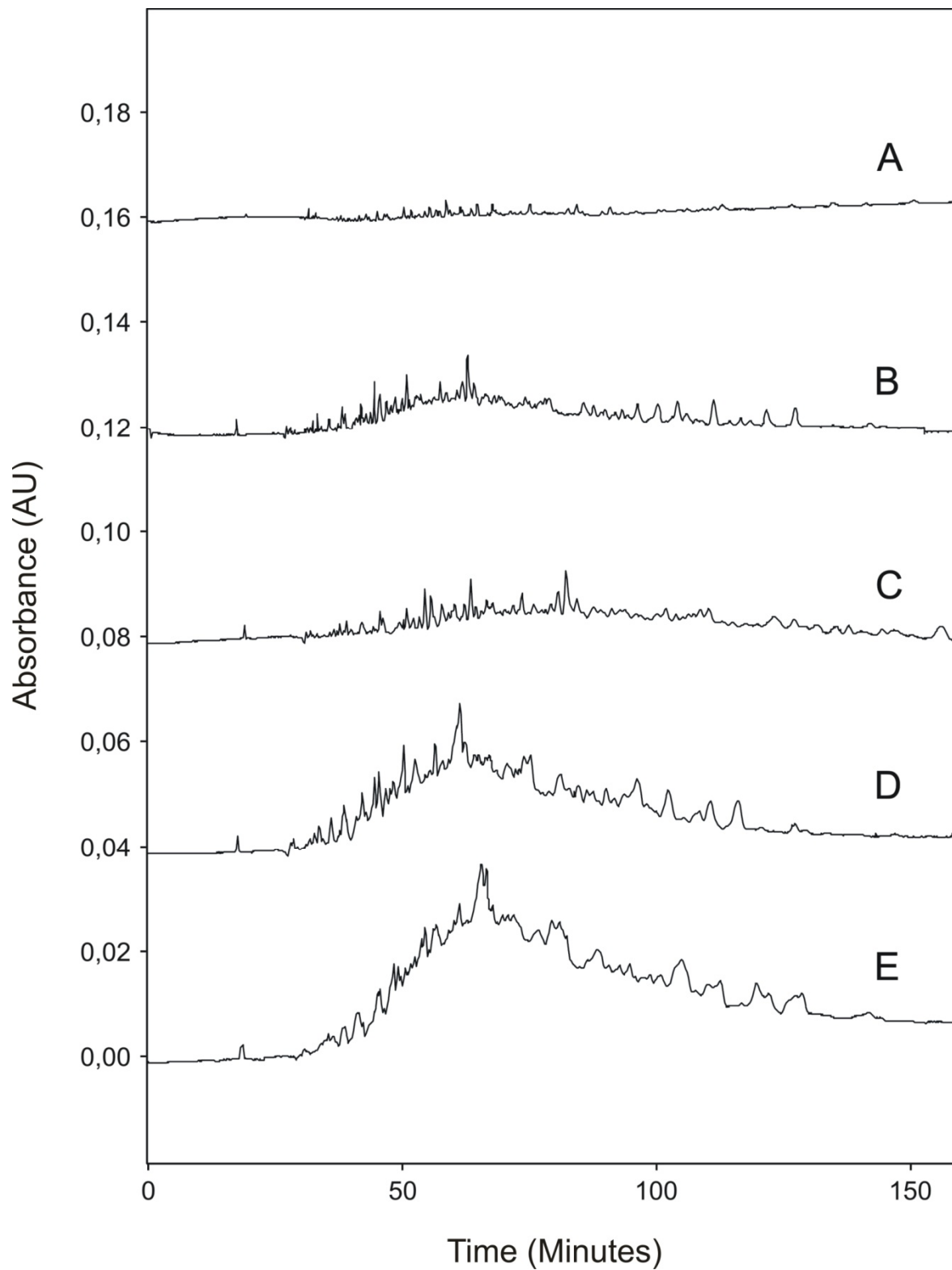
4.1.1 Doba nástřiku vzorku

Optimalizace doby nástřiku vzorku je demonstrována na obrázku číslo 1, kdy separace vzorku probíhala na CE s UV detekcí při 214 nm. Pro měření byly využity tryptické štěpy hovězího sérového albuminu (BSA). Separace probíhala v křemenné kapiláře o celkové délce 107 cm (efektivní délka kapiláry 100 cm) s vnitřním průměrem 50 μm , při konstantním napětí 20 kV. Za základní elektrolyt byl zvolen 0,1 mol/l fosfát sodný o pH = 2,5. Vzorek byl nástřikován hydrodynamicky v časovém rozmezí od 15 do 300 sekund. Konkrétní časy nástřiku vzorku byly zvoleny 15, 60, 99, 140 a 300 sekund.

Za neoptimálnější dobu nástřiku vzorku byla zvolena hodnota 99 sekund. Tvar a počet piků se zdá být nejvhodnější s přihlédnutím na to, že vzorek musí být nadávkován

v dostatečném množství z důvodu následného zředění vzorku obalovou kapalinou při spojení s MS. Při zvyšující se době nástřiku 140 a 300 sekund sice dochází k vyššímu zakoncentrování vzorku v kapiláře, ale zároveň se snižuje separační účinnost CE.

Při tomto typu nástřiku dochází k zahuštění pomocí tzv. pH junction. Metoda slouží k zakoncentrování vzorku s využitím jeho delší doby nástřiku a rozdílných hodnot pH matrice a pH základního elektrolytu. Na rozhraní těchto dvou systémů dochází k tvorbě přechodného pH gradientu a tím i k následnému zakoncentrování vzorku do úzkých zón. Dojde tak ke zvýšení citlivosti detekce. Tento typ on line zakoncentrování vzorku je výhodný tím, že se provádí v té samé kapiláře, která se používá pro separaci [35], [57].



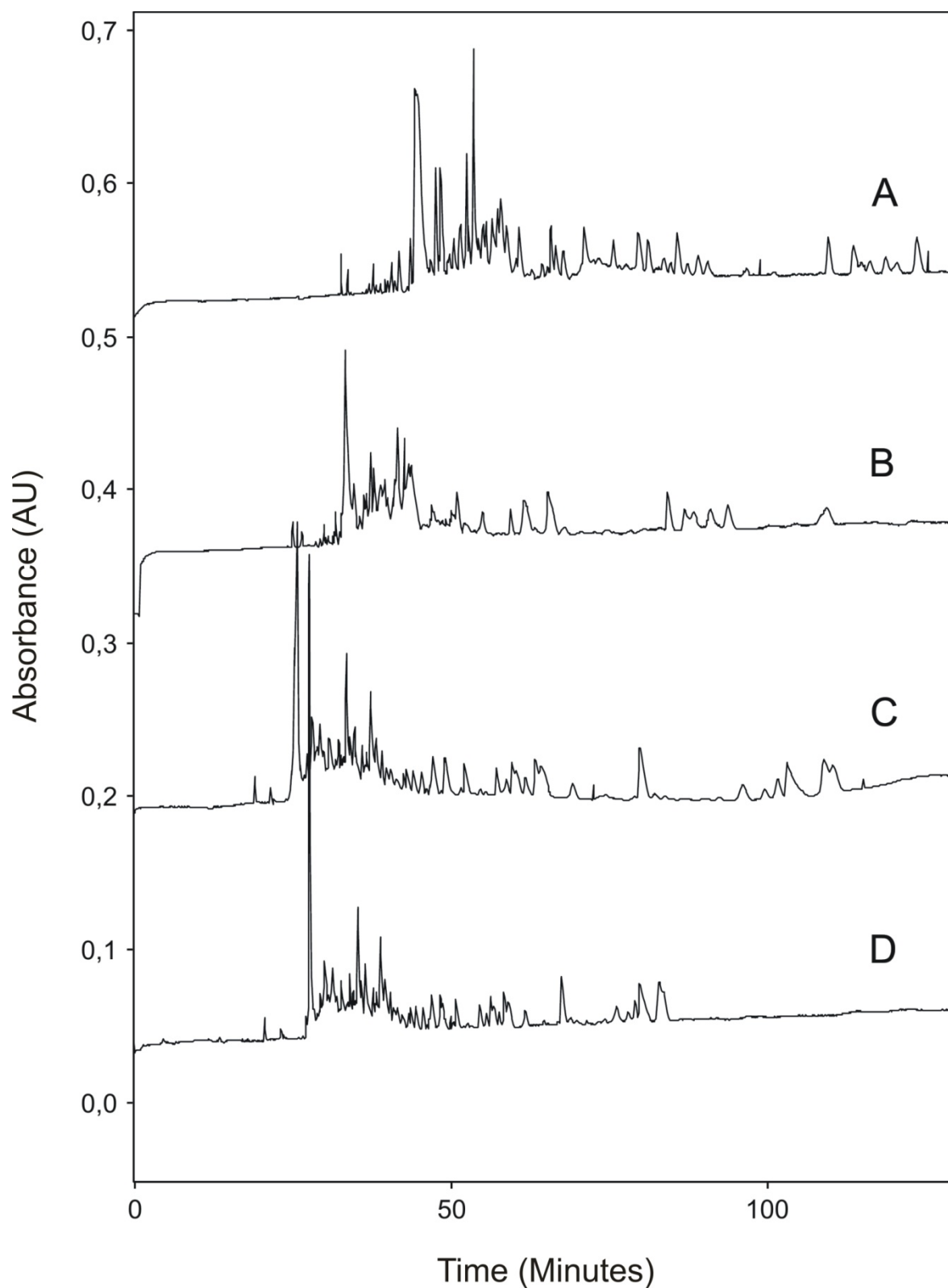
Obr. 1 CE/UV optimalizace doby nástřiku vzorku (BSA) v 0,1 M fosfátu sodném pH 2,5 při 20 kV: (A) 15 s, (B) 60 s, (C) 99 s, (D) 140 s, (E) 300 s.

4.1.2 Pufry a obalová kapalina

Byla provedena optimalizace složení separačního elektrolytu a také simulace (optimalizace) kombinace s obalovou kapalinou. Tato simulace byla založena na kombinaci separačního elektrolytu ve vstupní nádobce (inlet vial) a obalové kapaliny ve výstupní nádobce (outlet vial). Ze separačních elektrolytů byly vyzkoušeny: 0,1 mol/l fosfát sodný (pH 2,5); 0,1 mol/l fosfát amonný (pH 2,5); 0,25 mol/l kyselina mravenčí a z obalových kapalin 5 mM octan amonný s isopropanolem v poměru 1:1 (v/v) a 0,5% HCOOH/MeOH v poměru 1:1 (v/v). Kombinace s využitím obalové kapaliny 0,5 % HCOOH/MeOH (1:1, v/v) nebyla využita pro analýzu peptidů z důvodu nižší účinnosti separace na kapiláře.

Výsledky jsou demonstrovány na obrázku číslo 2. Separace probíhala opět na CE s UV detekcí při 214 nm. Vzorek BSA (modifikace s ribózou) je zde opět naštěpený trypsinem. Separace vzorku probíhala v křemenné kapiláře o celkové délce 107 cm (efektivní délka kapiláry 100 cm), při konstantním napětí 20 kV.

Na obrázku při sledování jednotlivých záznamů s různými pufry lze vidět, že při porovnávání fosfátu sodného a fosfátu amonného došlo u amonného pufry jednak ke ztrátám jednotlivých píků, tak i k celkovému snížení odezvy detektoru. Při použití kyseliny mravenčí se separační účinnost nemění a je srovnatelná s fosfátem sodným. Při použití kyseliny mravenčí jako pufry a octanu amonného jako obalové kapaliny umístěné ve výstupní nádobce došlo ke zrychlení analýzy. Systém kyseliny mravenčí a octanu amonného s isopropanolem byl vybrán za nejvhodnější použití pro následné spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem.



Obr. 2 CE/UV optimalizace pufrů 20 kV, nástřik 140 s: (A) 0,1 M fosfát sodný (obě vialky), (B) 0,1 M fosfát amonný (obě vialky), (C) 0,25 M kyselina mravenčí (obě vialky), (D) 0,25 M kyselina mravenčí (vstupní vialka) a 5mM octan amonný s isopropanolem 1:1 (v/v) (výstupní vialka).

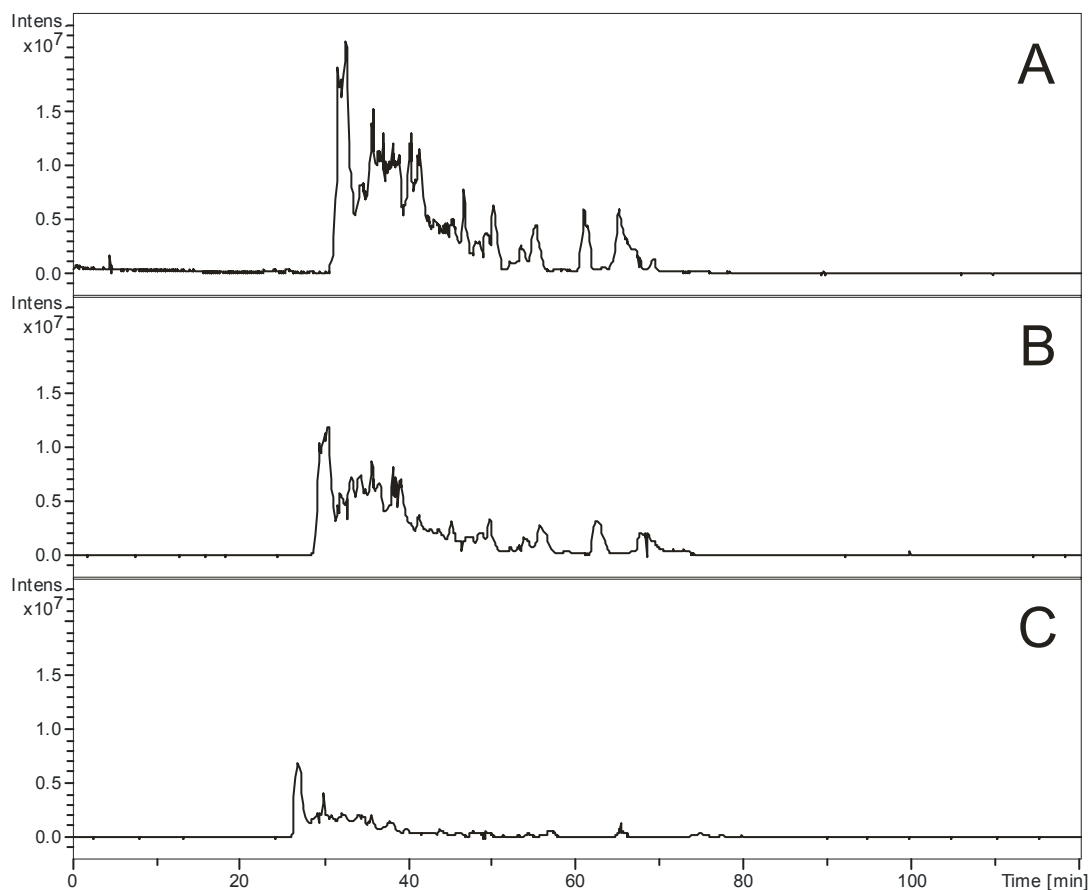
4.2 CZE – MS/Q-TOF analýza proteinů štěpených trypsinem

Kapilární elektroforéza byla napojena na hmotnostní spektrometr pomocí křemenné kapiláry o celkové délce 107 cm a vnitřním průměrem 50 μm . Spojení s MS bylo provedeno pomocí uzemněné jehly s přidaným tokem obalové kapaliny (sheath liquid). Jako obalové kapaliny byly vyzkoušeny: směs 5mM octan amonný s isopropanolem 1:1 (v/v), směs 0,5 % kyseliny mravenčí s metanolem 1:1 (v/v). Průtoková rychlost obalové kapaliny byla nastavena na 4 μl za minutu. Základní elektrolyt v CZE byl použit roztok 0,25M kyseliny mravenčí.

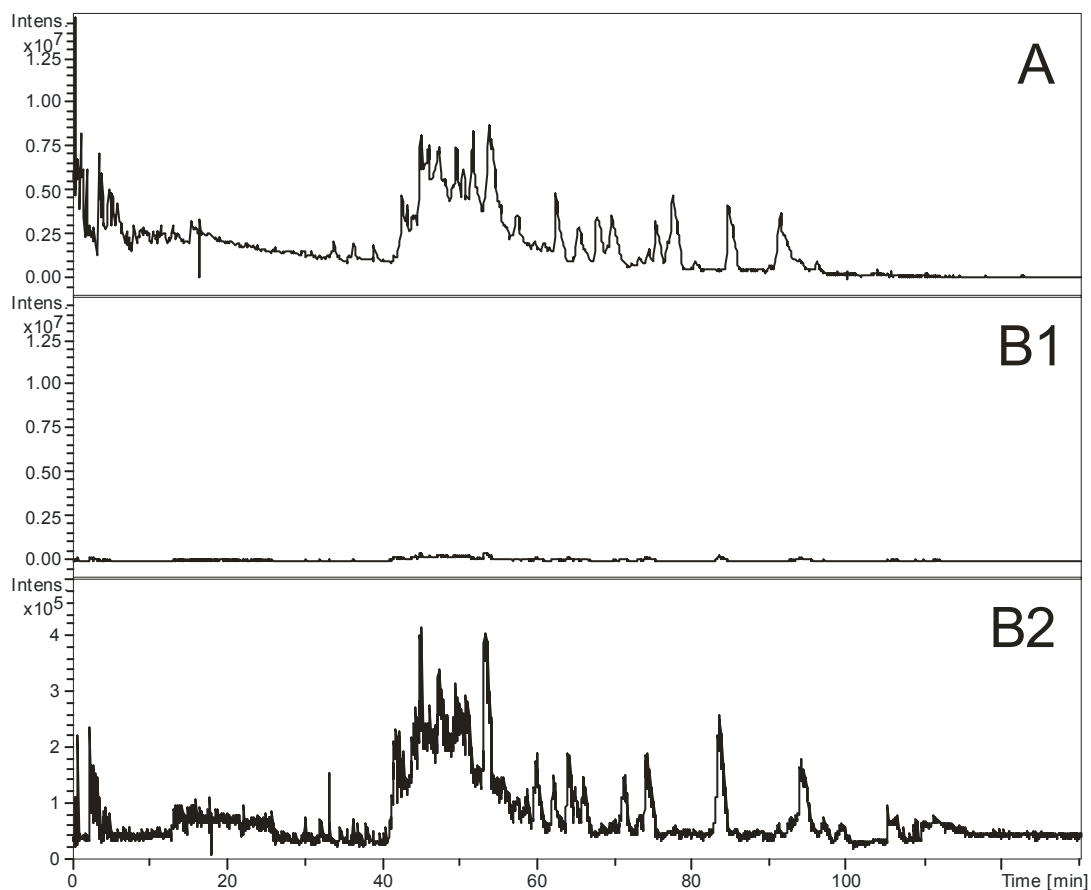
Průběh analýzy při využití 0,5 % kyseliny mravenčí s methanolem jako obalové kapaliny je zřejmý z obr. 3. Analyzátor doby letu (TOF) je přesnější a citlivější než iontová past, ale zároveň je konstrukčně (přinejmenším u použitého přístroje MaXis firmy Bruker) mnohem náchylnější k zanášení nečistotami. V průběhu dne docházelo ke snižování odezvy detektoru a ke zvyšování šumu u jednotlivých záznamů. S každým nadávkováním našeho vzorku se odezva nepatrně snížila. Při vícenásobném měření stejného vzorku nebylo možné dosaženo uspokojivé reprodukovatelnosti a tím jednotlivá měření zopakovat.

Z obr. 4 je vidět, že ke stejnému jevu docházelo i v případě použití 5 mM octanu amonného s metanolem jako obalové kapaliny. Odezva detektoru ve druhém měření se snížila dokonce o dva řády. Při změně měřítka osy (zvětšení) u druhého měření je profil křivky shodný s prvním profilem nástřiku vzorku.

Obrázky 3 a 4 demonstrují snižující se odezvu detektoru pro jednotlivá měření proteinů. Ještě vyššího poklesu bylo dosaženo v případě použití fosforečnanu amonného jako obalové kapaliny. Navíc v tomto případě byly výsledky na hmotnostním spektrometru jen obtížně interpretovatelné. Z těchto důvodů pro další měření nebylo využito spojení s MS/Q-TOF, ale následovala změna ve spřažení techniky CE s hmotnostním spektrometrem využívající iontovou past.



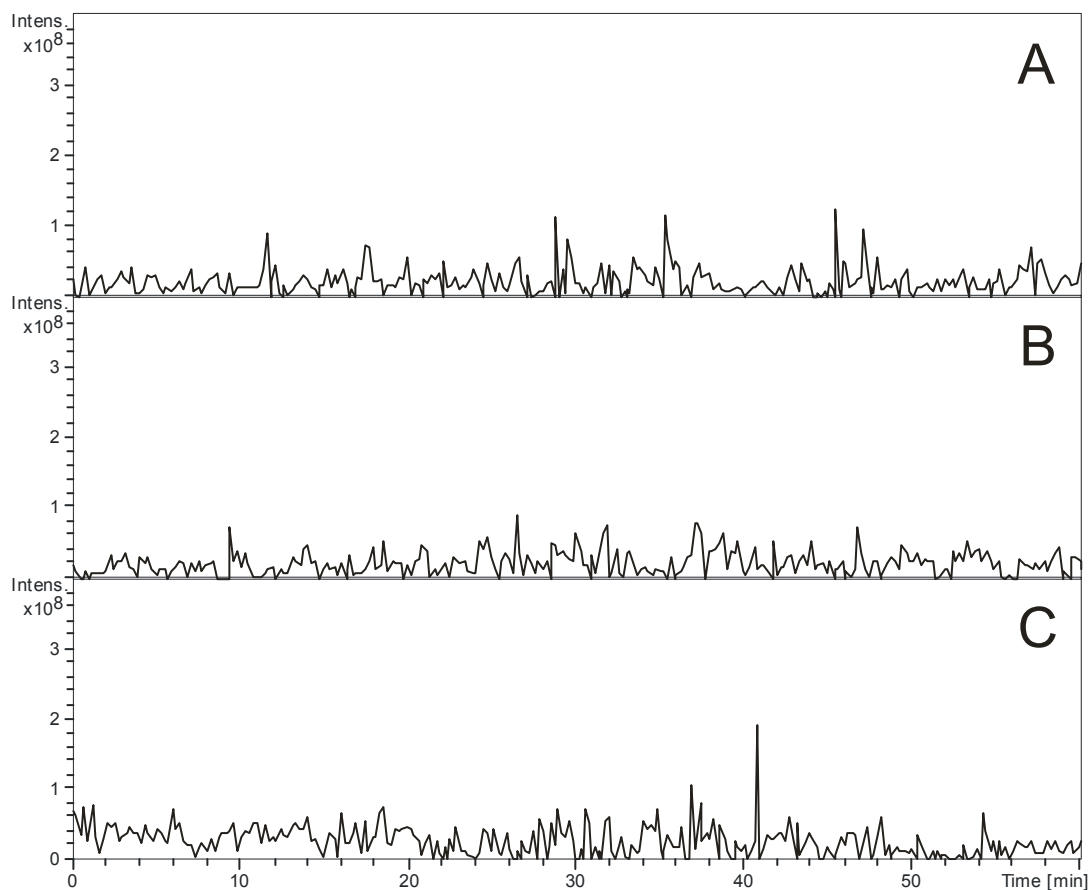
Obr. 3 MS záznam měření CE- MS/Q-TOF trypticky naštěpeného albuminu při 20kV, nástřiku 140 s, základní elektrolyt – 0,25M HCOOH, obalová kapalina – 0,5% HCOOH s metanolem (1:1, v/v): (A) první nástřik, (B) druhý nástřik, (C) třetí nástřik. Osa-x: čas analýzy. Osa-y: celkový iontový proud.



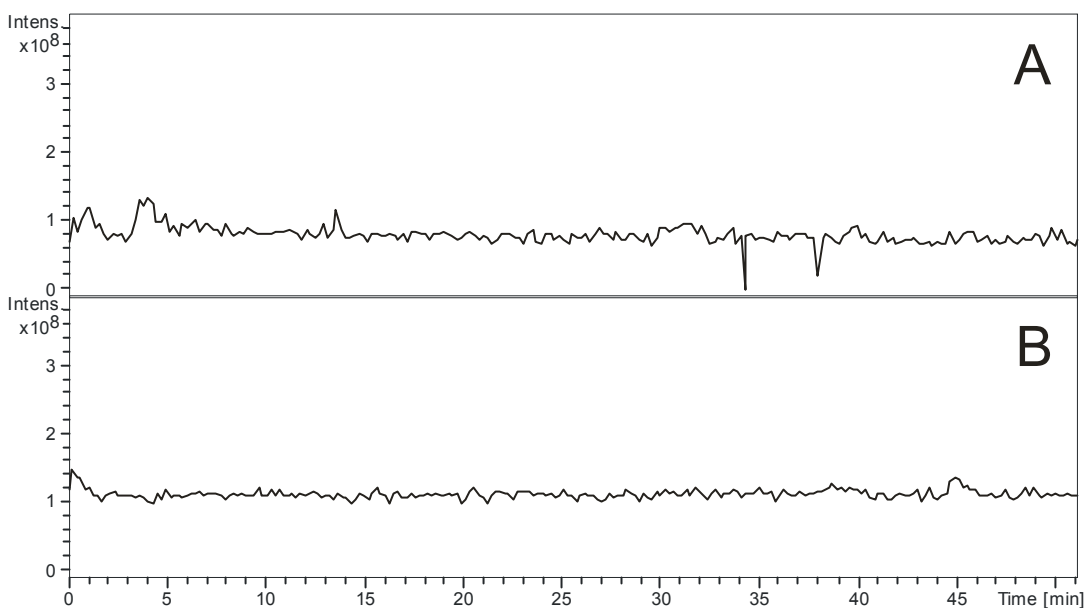
Obr. 4 MS záznam měření CE-MS/Q-TOF trypticky naštěpeného albuminu při 20kV, nástřiku 140 s, základní elektrolyt – 0,25M HCOOH, obalová kapalina – 5mM octan amonný s methanolem (1:1, v/v): (A) první nástřik, (B1) druhý nástřik, (B2) na zvětšování druhého nástřiku. Osa-x: čas analýzy. Osa-y: celkový iontový proud.

4.3 CZE-MS/IT analýza proteinů štěpených trypsinem

Spojení kapilární elektroforézy s hmotnostním spektrometrem využívajícím iontovou past jako analyzátoru bylo úspěšně využito pro získání peptidových map enzymatických (tryptických) štěpů albuminů, transferinů a kolagenů. Toto spojení lze využít právě pro stanovování proteinových sekvencí s určením umístění konkrétních posttranslačních modifikací. Separace probíhala v křemenné kapiláře o celkové délce 107 cm a vnitřním průměru 50 μm , která byla spojena pomocí uzemněné jehly a obalové kapaliny s hmotnostním detektorem. Jako nejvhodnější obalová kapalina byla vybrána směs 5mM octanu amonného s isopropanolem (1:1, v/v). Ze záznamů na obrázku 5, které byly získány z hmotnostního spektrometru je vidět, že při použití obalové kapaliny 0,5 % HCOOH s methanolem (1:1, v/v) se na záznamu nezobrazil jediný pík (správná separace peptidů/proteinů v tomto systému se nepotvrdila u žádného z vybraných proteinů - kolagen, albumin, transferin). U záznamů na obrázku 6 byl zvolen jako jiný základní elektrolyt 50 mM $(\text{NH}_4)\text{PO}_4$ o pH 2,5 a jako obalové kapaliny byly využity následující směsi (A) 0,5% HCOOH s methanolem (1:1), (B) 5mM octan amonný s isopropanolem (1:1). U žádného z takto zvolených systémů opět nedošlo k účinné separaci peptidů/proteinů a k následné odezvě hmotnostního spektrometru.

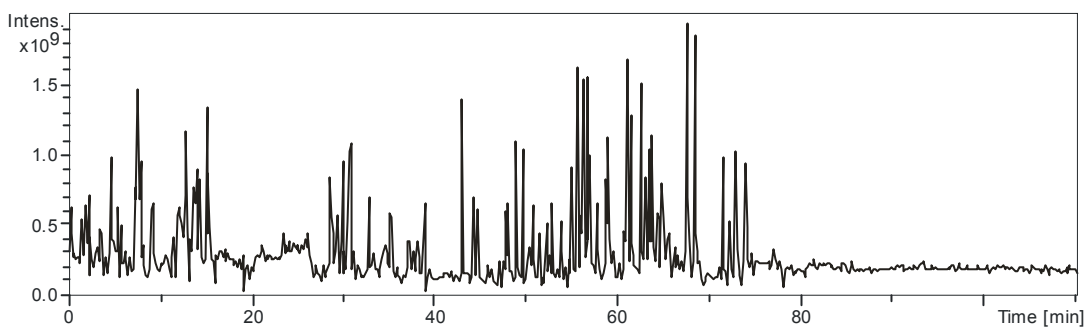


Obr. 5 Analýza kontrolního vzorku albuminu (štěpený trypsinem), doba nástřiku vzorku 140 s, napětí 20kV, základní elektrolyt 0,25M HCOOH a obalová kapalina 0,5 % HCOOH s methanolem (1:1, v/v). (A) kolagen kontrola, (B) albumin kontrola, (C) transferin kontrola.



Obr. 6 Analýza kontrolního vzorku albuminu (štěpený trypsinem), doba nástřiku vzorku 140 s, napětí 20kV. (A) základní elektrolyt 50 mM $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ pH 2,5 a obalová kapalina 0,5% HCOOH s methanolem (1:1, v/v). (B) základní elektrolyt 50 mM $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ pH 2,5 a obalová kapalina 5mM octan amonný s isopropanolem (1:1, v/v).

Další vyzkoušenou kombinací bylo: základní elektrolyt 5mM fosforečnan amonný (pH 2,5) a směs obalové kapaliny 0,5 % H_3PO_4 s isopropanolem v poměru 1:1 (v/v). Na obrázku 7 je záznam detekce kontrolního vzorku albuminu naštěpeného trypsinem. Zde došlo k úspěšné separaci jednotlivých peptidů na kapiláře, ale je zde i mnoho nespecifických píků. Při vyhodnocení tohoto záznamu byl použit program Proteinscape a výsledky porovnávány pomocí specifické databáze SwissProt pro hovězí sérový albumin. V tabulce 1 je srovnání peptidového pokrytí a počtu nalezených píků u dvou zvolených systémů: (A) základní elektrolyt 5mM fosforečnan amonný pH 2,5 a směs obalové kapaliny (1:1, v/v), (B) základní elektrolyt HCOOH o koncentraci 0,25M a směs obalové kapaliny 5mM octanu amonného s isopropanolem (1:1, v/v). Použití obalové kapaliny 5mM octanu amonného s isopropanolem je vhodnější pro analýzu peptidů a určování jednotlivých modifikací. Na druhou stranu systém s 0,5 % H_3PO_4 s isopropanolem byl úspěšně použit pro separaci léčiv [58].



Obr. 7 Analýza kontrolního vzorku albuminu (štěpený trypsinem), doba nástřiku vzorku 60 s, napětí 20kV. Základní elektrolyt 5mM $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ pH 2,5 a obalová kapalina 0,5% $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ s isopropanolem (1:1, v/v).

Tab. 1 (A) základní elektrolyt 5mM fosforečnan amonný pH 2,5 a směs obalové kapaliny 0,5% H_3PO_4 s isopropanolem (1:1, v/v), (B) základní elektrolyt HCOOH o koncentraci 0,25M a směs obalové kapaliny 5mM octanu amonného s isopropanolem (1:1, v/v).

tryptické štěpy – albumin kontrola	pokrytí	peptidy
A	20,40%	13
B	34,80%	23

semitryptické štěpy – albumin kontrola	pokrytí	peptidy
A	29,30%	24
B	49,30%	39

Nakonec byla vybrána metoda pro separaci peptidů/proteinů, kde za základní elektrolyt u kapilární elektroforézy byl použit roztok kyseliny mravenčí o koncentraci 0,25M a jako nejvhodnější obalová kapalina byla směs 5mM octanu amonného s isopropanolem (1:1, v/v). Průtoková rychlost obalové kapaliny byla 4 μl za minutu. Doba nástřiku vzorku byla po optimalizaci stanovena na 99 sekund.

Ke štěpení tří vybraných proteinových vzorků byl využit stejný enzym – trypsin u kolagenu navíc CNBr. Pro vyhodnocení experimentálně získaných dat z MS byl použit software Proteinscape. Naměřené výsledky byly následně porovnávány pomocí specifických databází SwissProt pro jednotlivé proteiny (albumin, kolagen, transferin). V experimentu představuje hlavní typ detekované modifikace karboxymethylace lysinu ve zkratce označována jako CML. V tabulce 2 jsou uvedeny CML s konkrétním umístěním na peptidovém řetězci a také jednotlivá peptidová pokrytí v procentech. Vzniklé modifikace CML a pokrytí jsou ovlivněny dle typu použitého modifikátoru (glukóza, ribóza, glyoxal, glutardialdehyd) a dle vybraného proteinu. Při použití silných modifikátorů, v našem případě dioxo-sloučenina glutardialdehyd, docházelo k zesíťování proteinů, a proto nebylo možné takto modifikovaný protein účinně separovat na kapiláře, nebyly nalezeny peptidové fragmenty, a proto celkové pokrytí bylo nulové.

Z tabulky 2 lze dále usoudit, že pokud porovnáme počet modifikací u použitých cukrů, tak u ribózy byly nalezeny vyšší počty modifikací než u glukózy. To potvrzuje jak modifikovaný albumin, tak i transferin. Je to dáno vyšší reaktivitou ribózy, která obsahuje vyšší počet redukujících forem oproti glukóze.

Za nejreaktivnější místo u posttranslačních modifikací albuminu je označován lysin na pozici 548, jehož peptidová sekvence je KQTALVELLK. Toto místo bylo nalezeno i v předchozí studii u posttranslačně modifikovaného albuminu [59], [60]. Při použití semitryptického štěpení bylo nalezeno nové modifikované místo – CML 528.

U transferinů sice dochází také k posttranslačním změnám, ale nejsou tak výrazné jako právě u proteinu albumin. Například při modifikaci transferinu glukózou nebyla nalezena žádná karboxymethylace lysinu. U reaktivnějšího cukru ribózy byly CML nalezeny dvě a to na pozici 61 a 467, jejichž peptidová sekvence odpovídá KASYLDCIR a KSCHTAVGR. Nižší počet nalezených modifikovaných míst může být způsoben i nižším peptidovým pokrytím sekvence proteinu. Toto nižší pokrytí může být způsobeno strukturou tohoto glykoproteinu, jeho izoforem a bylo potvrzeno opakovaně při nezávislých experimentech. Nejspíše se glykované řetězce lepí na stěnu kapiláry (peptidové pokrytí bylo v případě nanoLC dvojnásobné, demonstrováno v tabulce číslo 3A a 3B). V příloze (P I) jsou jednotlivé CML aminokyselinové sekvence transferinu zvýrazněny a podtrženy, u albuminu se jedná o zvýraznění a podtržení nejreaktivnějšího místa lysinu 548 v peptidové sekvenci.

Tab. 2 Přehled celkového pokrytí sekvence jednotlivých proteinů analyzovaných CE-MS za použití teoretického štěpení trypsinem (CNBr – trypsinem v případě kolagenu) s následnou lokalizací CML u jednotlivých vzorků.

tryptické štěpy	Albumin		Kolagen α 1 řetězec		Kolagen α 2 řetězec		Transferin	
	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML
Kontrola	41,2%	x	35,5%	x	32,3%	x	20,9%	x
Glukóza	52,6%	548	39,7%	x	30,2%	x	14,6%	x
Ribóza	48,3%	36	36,4%	x	30,1%	x	16,5%	61
		401		x		467		
		437		x				
		455		x				
		498		x				
		548		x				
Glyoxal	30,0%	245	3,8%	x	x		x	
		248		x				
		401		x				
		437		x				
		455		x				
Glutardialdehyd	x		x		x		x	

Tab. 3A Přehled celkového pokrytí sekvence transferinu za použití teoretického štěpení trypsinem s následnou lokalizací CML, analyzováno pomocí nanoLC-MS/Q-TOF a CE-MS/IT.

tryptické štěpy	nanoLC-MS/Q-TOF		CE-MS/IT	
	Transferin		Transferin	
	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML
Kontrola	40,10%	x	20,90%	x
Glukóza	34,10%	x	14,60%	x
Ribóza	38,30%	295	16,50%	61
		464		467
		553		
		646		
		659		
Glyoxal	22,90%	646	x	
Glutardialdehyd	x		x	

Tab. 3B Přehled celkového pokrytí sekvence transferinu za použití teoretického štěpení semitrypsinem s následnou lokalizací CML, analyzováno pomocí nanoLC-MS/Q-TOF a CE-MS/IT.

<u>semitryptické štěpy</u>	nanoLC-MS		CE-MS/IT	
	Transferin		Transferin	
	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML
Kontrola	51,40%	x	30,50%	x
Glukóza	46,30%	x	26,60%	x
Ribóza	50,60%	236	35,00%	61
		295		467
		464		
		553		
		646		
		659		
Glyoxal	32,10%	277	x	
		646		
Glutardialdehyd	x		x	

Při srovnání albuminu, transferinu a kolagenu je patrné, že i když kolagen byl specificky naštěpen a bylo určeno u jednotlivých modifikátorů procento pokrytí pomocí programu Proteinscape, tak nebyly nalezeny žádné posttranslační modifikace lysinu. V dříve publikované práci pocházející z naší laboratoře byly pomocí CE-MS nalezeny 3 glykační místa [61]. Toto může být způsobeno například nižším pokrytím sekvence proteinu. V již zmíněné studii byly při 77 % pokrytí odhaleny za využití HPLC-MS analýzy, 2 (v případě modifikace glukózou), respektive 5 (modifikace ribózou) glykačních míst.

Při změně podmínek pro vyhledávání v programu Proteinscape a navolení místo přesně specifického (teoretického) štěpení „trypsinem“ (u aminokyselin lysin a arginin) štěpení „semitryptické“ (tj. může dojít k štěpení u libovolné aminokyseliny a specifické štěpení musí být pouze u jednoho konce peptidu), tak bylo dosaženo vyššího pokrytí a v případě albuminu bylo nalezeno i více posttranslačních modifikací CML (tabulka 4). Právě z hlediska analýzy posttranslačních modifikací proteinů je důležité identifikovat co největší množství peptidů ze struktury proteinu. U transferinu byly nalezeny opět jenom

dva CML při modifikaci ribózou. U albuminu vzrostl počet CML glykací ribózou z 6 na 7 a to samé můžeme vidět i při modifikaci glyoxalem, kdy z původních 5 CML bylo při použití semitryptického štěpení nalezeno 6 CML. Pokrytí u jednotlivých proteinů se zvýšilo.

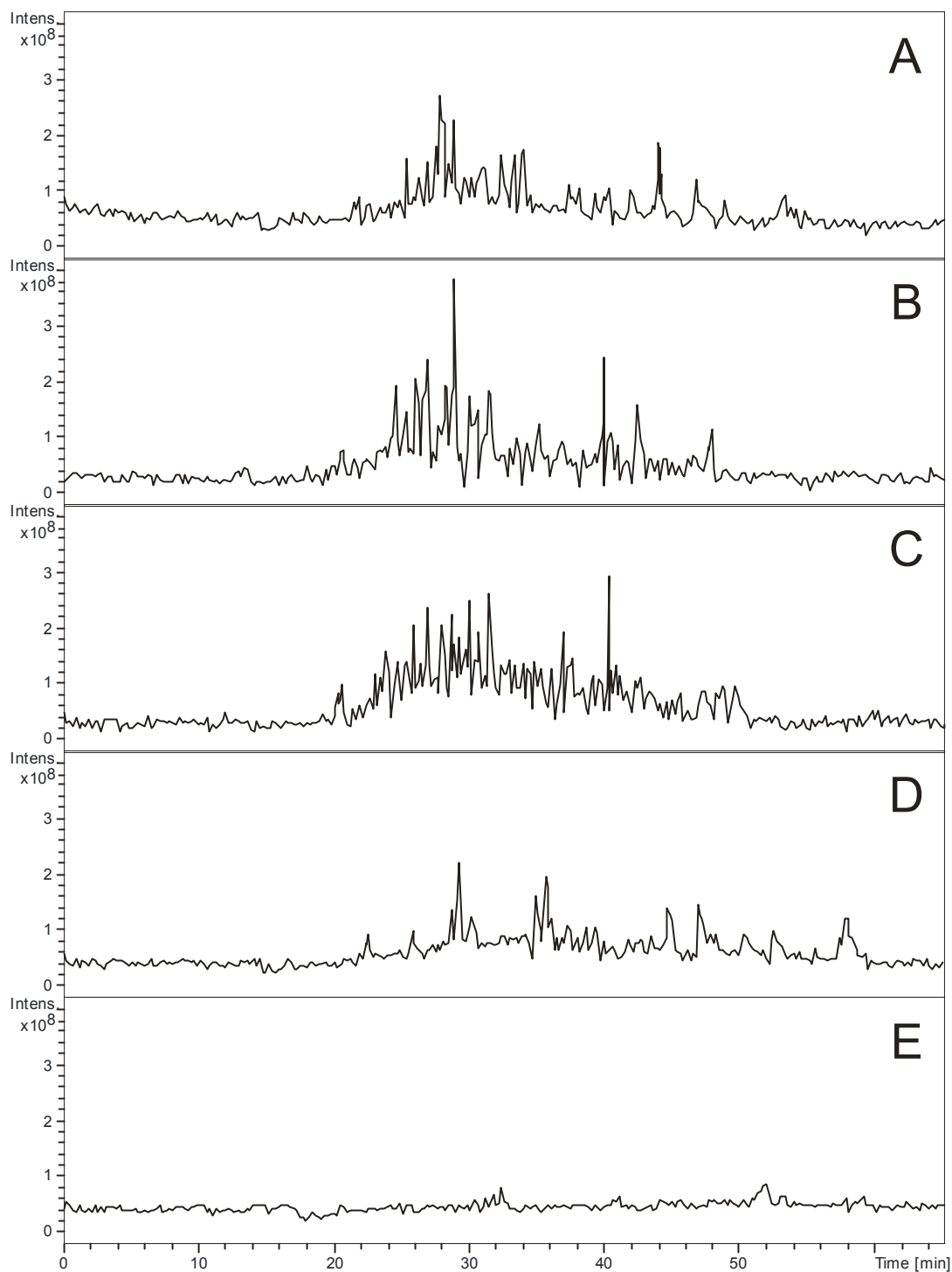
Tab. 4 Přehled celkového pokrytí sekvence jednotlivých proteinů analyzovaných CE-MS za použití teoretického štěpení semitrypsinem (CNBr - semitrypsinem v případě kolagenu) s následnou lokalizací CML u jednotlivých vzorků.

semitryptické štěpy	Albumin		Kolagen $\alpha 1$ řetězec		Kolagen $\alpha 2$ řetězec		Transferin	
	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML	Pokrytí	CML
Kontrola	60,8%	x	38,5%	x	32,9%	x	30,5%	x
Glukóza	67,7%	548	50,4%	537	37,5%	x	26,6%	x
Ribóza	70,5%	36	45,7%	x	32,1%	x	35,0%	61
		257		x		x		467
		401		x		x		
		437		x		x		
		455		x		x		
		498		x		x		
		528		x		x		
		548		x		x		
Glyoxal	46,5%	245	6,9%	x	x		x	
		248		x				
		399		x				
		401		x				
		437		x				
		455		x				
		528		x				
Glutardialdehyd	x		x		x		x	

Na obrázku 8 jsou znázorněny záznamy, které byly získány z hmotnostního spektrometru při použití 0,25 mol/l kyseliny mravenčí jako základního elektrolytu a 5 mmol/l octanu amonného s isopropanolem (1:1, v/v) jako obalové kapaliny. Na obrázcích je prezentován vzorek albuminu, který byl specificky naštěpen trypsinem. Jako první v pořadí (A) je uvedena kontrola nemodifikovaného albuminu, který byl pouze naštěpen enzymem (trypsin). Na obrázku pod touto kontrolou jsou jednotlivé výsledky peptidových map glykovaných albuminů označeny velkými písmeny B, C, D a E, kde

došlo k inkubování jedním z modifikátorů v následujícím pořadí: glukóza, ribóza, glyoxal a glutardialdehyd. Hlavní oblast separace, kdy se při měření na záznamu zobrazily píky, byla doba od 20 do 60 minut, po skončení této doby se žádné nové píky neobjevily.

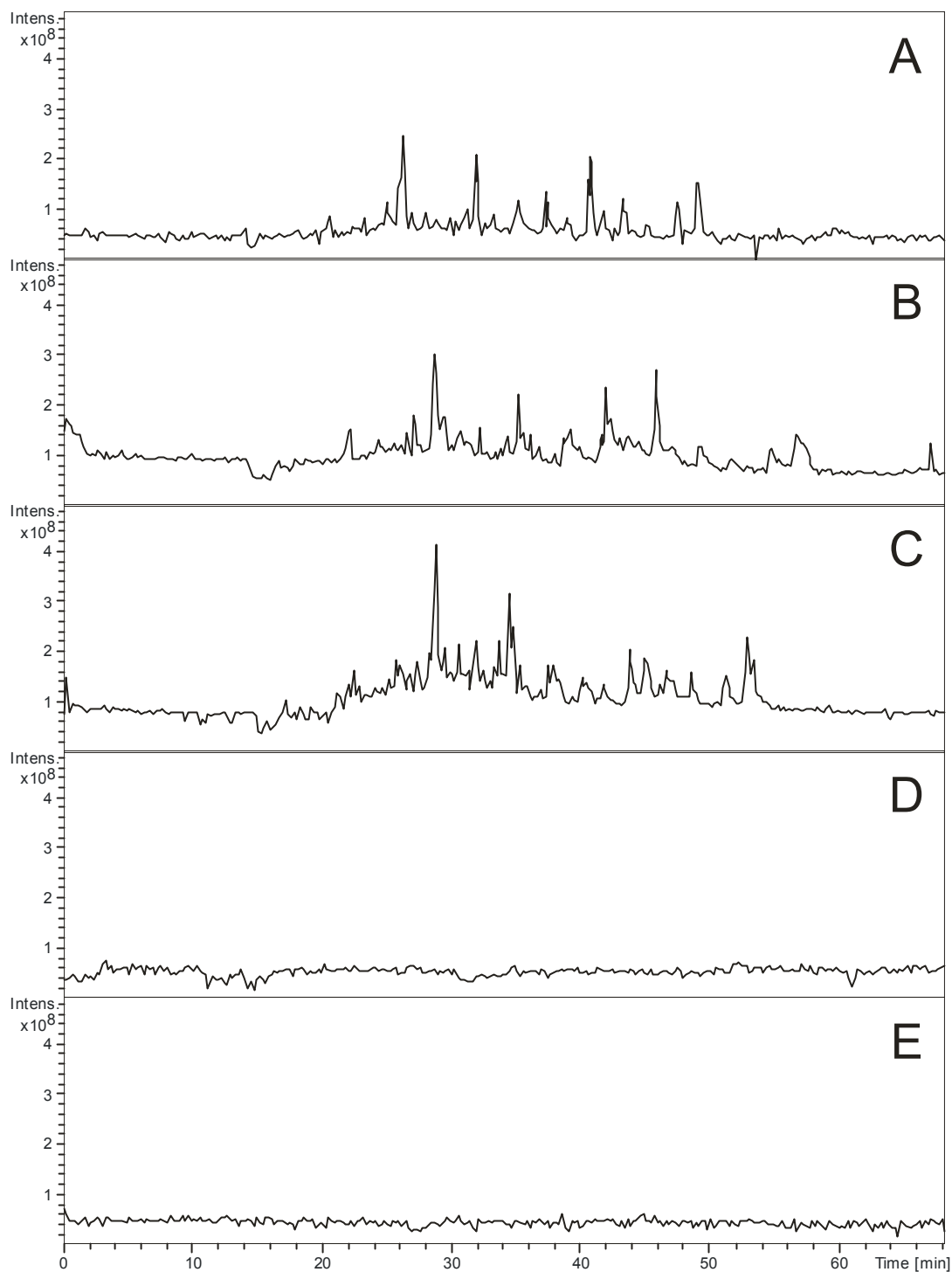
Při glykaci albuminu za použití cukrů glukózy a ribózy byly získány bohaté profily peptidů (obr. 8B, 8C). O poznání nižší peptidový profil byl získán při modifikaci s glyoxalem (obr. 8D) a glutardialdehydem (obr. 8E). Tyto oxo-sloučeniny jsou silnými modifikátory, které rychle reagují s volnými aminoskupinami v polypeptidovém řetězci bílkovin. Takto modifikované bílkoviny jsou velmi odolné proti použitému enzymu. Protein není enzymaticky naštěpen, jelikož proteiny těmito modifikátory byly zesíťovány. Tyto vzájemně spojené nenaštěpené proteiny/peptidy nelze účinně oddělit pomocí kapilární elektroforézy a na hmotnostním spektrometru nejsou zanalyzovány.



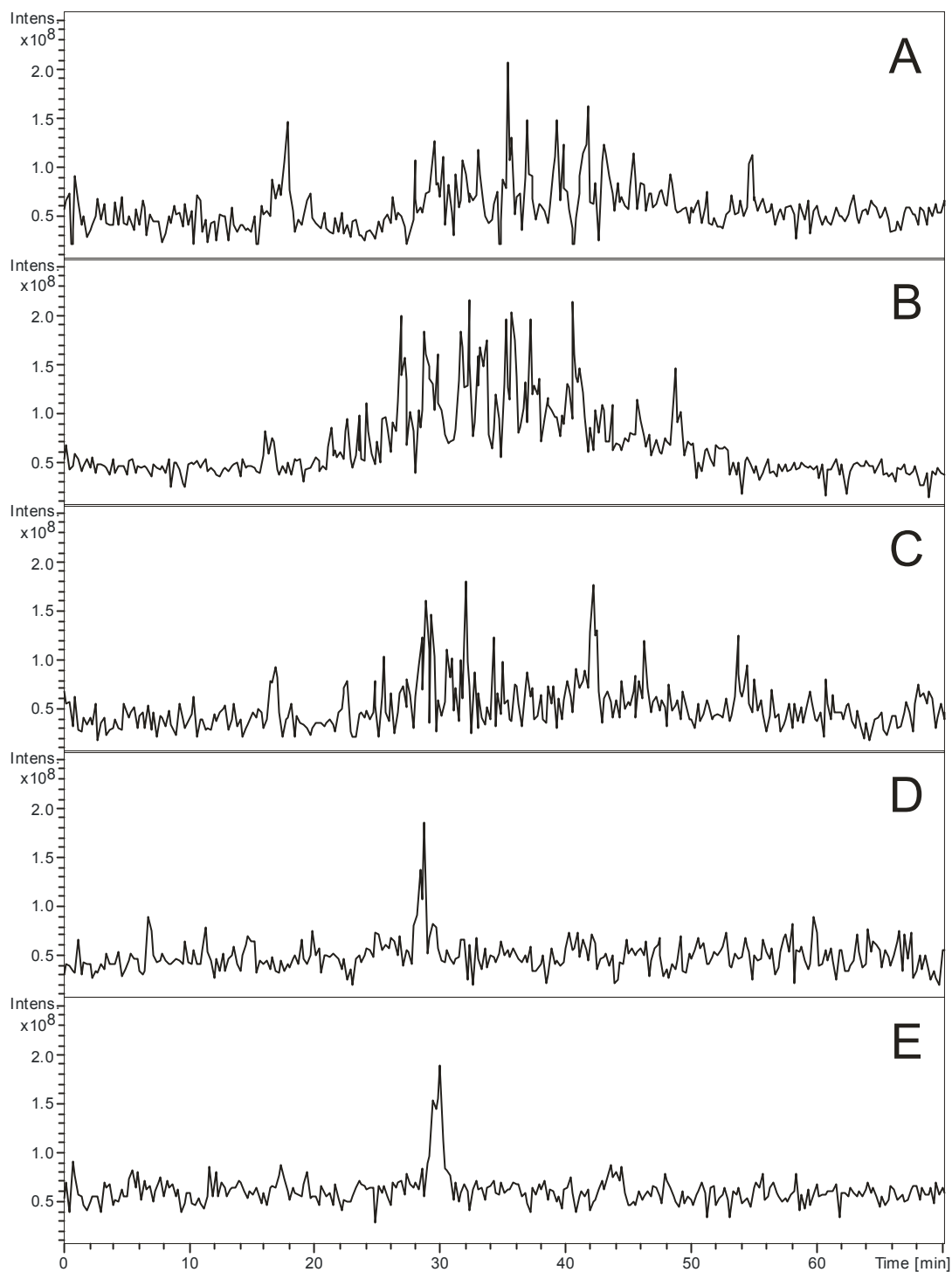
Obr. 8 CE – MS/IT peptidová mapa kontrolního a glykovaného BSA naštěpeného trypsinem: (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) modifikace ribózou, (D) modifikace glyoxalem, (E) modifikace glutardialdehydem. Základní elektrolyt 0,25 M kyselina mravenčí, obalová kapalina 5 mM octan amonný s isopropanolem (1:1, v/v), nástřik 99s, 20kV. Osa-x: retenční čas. Osa-y: celkový iontový proud při MS analýze.

Na dalších obrázcích (číslo 9 a 10) jsou zobrazeny peptidové mapy transferinu a kolagenu. I zde jsou velmi bohaté peptidové mapy u modifikace s glukózou a ribózou (obr. 9B a 9C, 10B a 10C). Oproti tomu u modifikace pomocí glyoxalu a glutardialdehydu (obr. 9D a 9E, 10D a 10E) byly proteiny tak zesíťované, že se je nepovedlo enzymaticky rozštěpit, proto na hmotnostním spektrometru se neobjevily žádné signifikantní odezvy u transferinu a ani u kolagenu. U kolagenu je pozoruhodné, že se přibližně ve 29 minutě (obr. 10D a 10E) vyskytl nespecifický pík.

Změny struktury u modifikace pomocí glyoxalu a glutardialdehydu byly patrné i při vizuální kontrole. Vzorčky byly žlutooranžové až žlutohnědé, v některých se vytvořil i zákal. Ostatní vzorky (kontrola, modifikace s glukózou a ribózou) byly bezbarvé. Toto odpovídá popsaným jevům (zabarvení), které jsou průvodním jevem glykace proteinů *in vitro*, ale i *in vivo*.



Obr. 9 CE – MS/IT peptidová mapa kontrolního a glykovaného transferinu naštěpeného trypsinem: (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) modifikace ribózou, (D) modifikace glyoxalem, (E) modifikace glutardialdehydem. Základní elektrolyt 0,25 M kyselina mravenčí, obalová kapalina 5 mM octan amonný s isopropanolem (1:1, v/v), nástřik 99s, 20kV. Osa-x: retenční čas. Osa-y: celkový iontový proud při MS analýze.



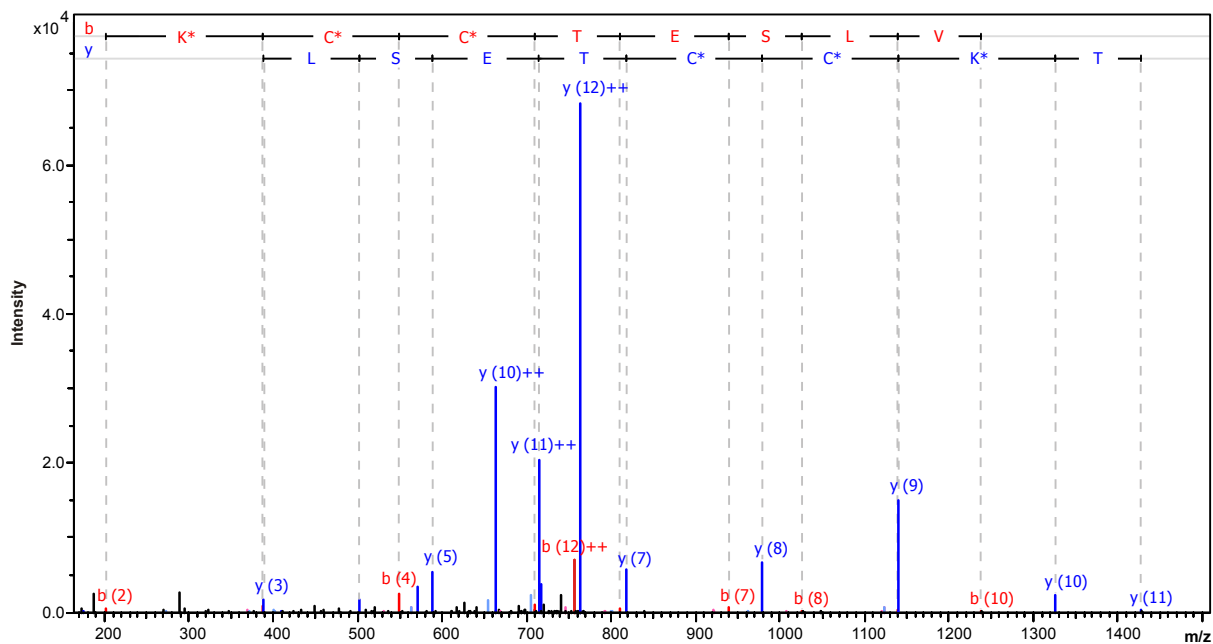
Obr. 10 CE – MS/IT peptidová mapa kontrolního a glykovaného kolagenu naštěpeného CNBr a trypsinem: (A) kontrola, (B) modifikace glukózou, (C) modifikace ribózou, (D) modifikace glyoxalem, (E) modifikace glutardialdehydem. Základní elektrolyt 0,25 M kyselina mravenčí, obalová kapalina 5 mM octan amonný s isopropanolem (1:1, v/v), nástřik 99s, 20kV. Osa-x: retenční čas. Osa-y: celkový iontový proud při MS analýze.

4.4 NanoLC-MS/Q-TOF analýza proteinů štěpených trypsinem

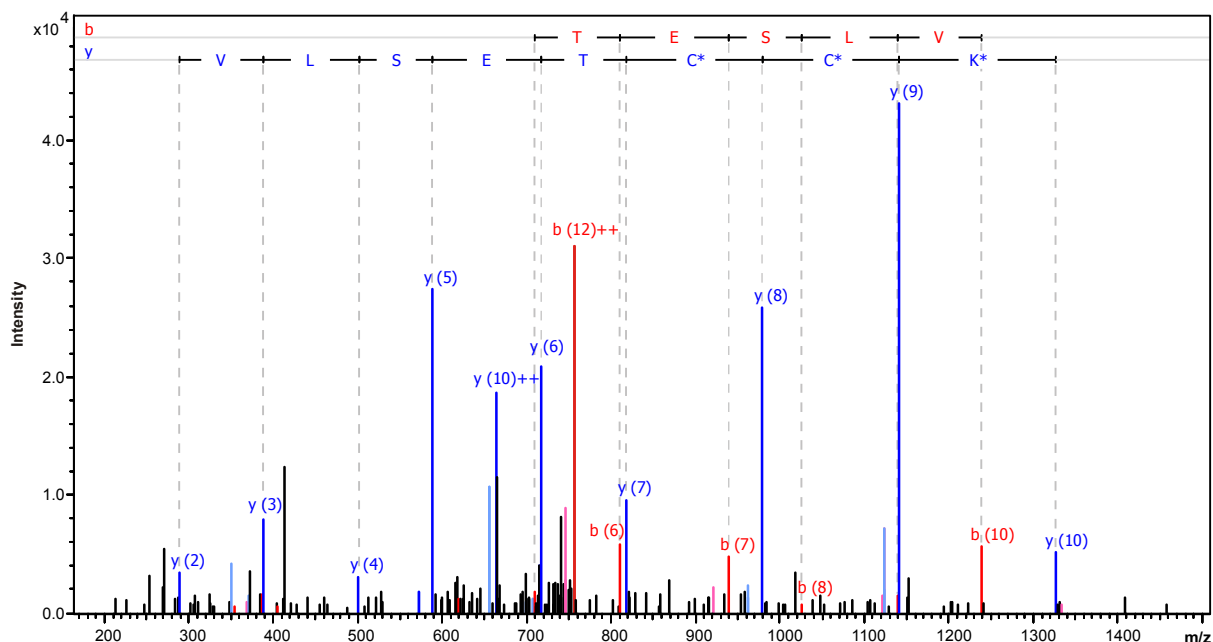
Další metoda použitá pro analýzu posttranslačně modifikovaných proteinů byla metoda nano-LC ve spojení s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu MaXis Q-TOF. Byly získány peptidové profily enzymatických štěpů a peptidová spektra. Této metody jsem využila hlavně pro srovnání peptidových spekter z nanoLC a z CZE-MS/IT. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Proteinscape s porovnáním se specifickou databází vygenerovanou z databáze SwissProt. Opět byly sledovány karboxymethylace lysinu (CML).

Na obrázku 11 a 12 MS/MS spekter jsou znázorněny peptidová spektra karboxymethylace lysinu u fragmentu VTKCCTESLVNR, na pozici 498 v polypeptidovém řetězci albuminu. Modifikace byla nalezena u albuminu glykovaného ribózou. Peptidová spektra jsou shodná. U nano-LC je výrazná intenzita iontu s označením $y(12)^{++}$. Je to z toho důvodu, že každá metoda používá jiného principu získávání dat. U nano-LC je to MS s analyzátozem doby letu, kdežto u CE-MS je analyzátozem iontová past.

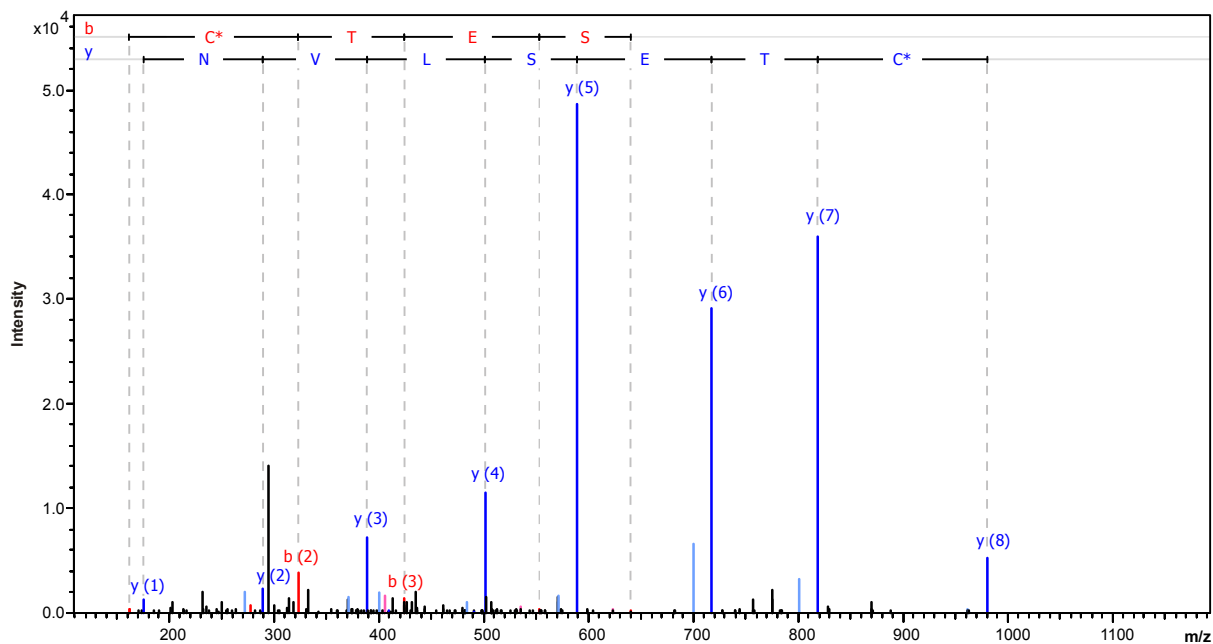
Na obrázku 13 a 14 MS/MS spekter jsou znázorněna peptidová spektra, u kterých nebyla nalezena karboxymethylace lysinu. Jedná se o fragment CCTESLVNR, v pozici 345 - 353 v polypeptidovém řetězci albuminu. U spekter získaných pomocí nano-LC-MS/QTOF je potlačena série b-iontů, mimo iontu b(2). U této metody se vlastnost potlačení série b-iontů výrazně uplatňuje. Naopak série y-iontů je zřetelnější a více citlivá, to lze potvrdit výskytem iontu y(8) u spektra využívající MS/QTOF oproti spektru, které bylo pořízeno z analýzy ve spojení s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí, kde se tento iont neobjevil. Závěrem lze říci, že spektra pořízená pomocí těchto dvou různých metod jsou si podobná.



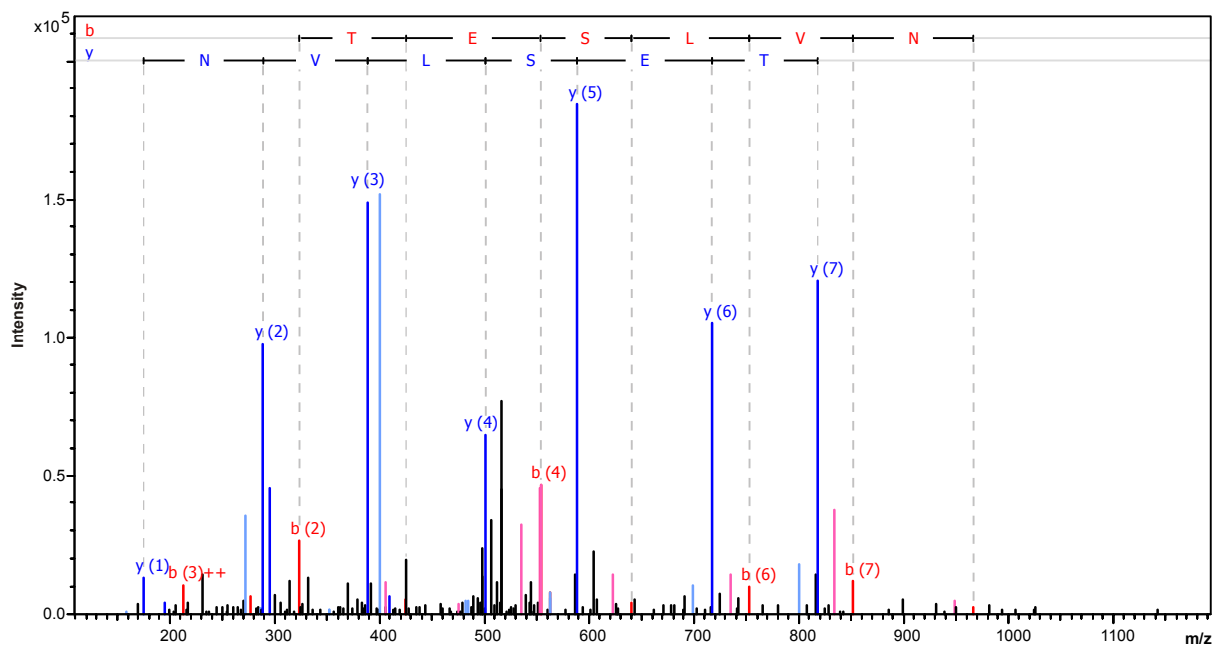
Obr. 11 MS/MS spektrum peptidu z albuminu obsahující karboxymethyl lysin v poloze 498 získané z nano-LC/MS.



Obr. 12 MS/MS spektrum peptidu z albuminu obsahující karboxymethyl lysin v poloze 498 získané z CE/MS.



Obr. 13 MS/MS spektrum peptidu z albuminu neobsahující karboxymethyl lysin, spektrum získané z nano-LC/MS-QTOF.



Obr. 14 MS/MS spektrum peptidu z albuminu neobsahující karboxymethyl lysin, spektrum získané z CE/MS-IT.

5 Závěr

Cílem práce bylo zjistit konkrétní místa posttranslačních modifikací neenzymaticky glykovaných proteinů, které byly specificky štěpeny pomocí enzymu (trypsin) a v případě kolagenu navíc CNBr. Hlavní detekovanou modifikací byla karboxymethylace lysinu (CML). Nalezené modifikace byly porovnávány mezi jednotlivými proteiny. Jako modelové vzorky proteinů byly vybrány: hovězí sérový albumin, hovězí kolagenu typu I a lidský transferin. Tyto tři proteiny byly inkubovány jednou z modifikujících látek: glukóza, ribóza, glyoxal a glutardialdehyd. Analýza byla provedena pomocí několika technik, jednalo se především o spojení CZE s hmotnostní spektrometrií.

Nejdříve byly optimalizovány separační podmínky na kapilární elektroforéze. Optimalizací bylo zjištěno, že nejlepší účinnosti pro separaci proteinů/peptidů je dosaženo u systému, který využívá jako základní elektrolyt 0,25M kyselinu mravenčí a jako obalovou kapalinu 5mM octanu amonného s isopropanolem v poměru 1:1 (v/v). Doba nástřiku vzorku byla po optimalizaci stanovena na dobu 99 sekund.

Pro zjištění posttranslačních modifikací bylo použito spojení CE s MS. Zde byly vyzkoušeny dvě varianty, kdy kapilární elektroforéza byla spojena s MS/QTOF a MS/IT. Po změření několika vzorků bylo rozhodnuto analýzu posttranslačně modifikovaných proteinů detekovat na systému CE-MS/IT. Pomocí tohoto spojení byla určena konkrétní místa karboxymethylace lysinu v peptidových řetězcích u jednotlivých proteinů. Pro nalezení CML byl použit program Proteinscape s následným porovnáváním pomocí proteinové databáze SwissProt. Bylo prokázáno, že počet modifikací CML roste směrem od glukózy, ribózy ke glyoxalu. U modifikace s glutardialdehydem bylo zjištěno nejnižší pokrytí, tato dioxy-sloučenina je velmi reaktivní a velmi modifikuje jednotlivé proteiny pravděpodobně za tvorby příčných vazeb. Ty pak následně nelze separovat na kapilární elektroforéze.

U metody CE-MS/IT bylo zjištěno, že nejpočetnější výskyt CML je u glykovaného sérového albuminu (BSA). Za nejreaktivnější pozici byla označena pozice 548 na aminokyselině lysin, další významná reaktivní místa byla na pozicích 401, 437, 455 a 498. U transferinu o celkové délce aminokyselinového řetězce 698 byla určena reaktivní místa na pozicích 61 a 477. U kolagenu typu I nebyly nalezeny žádné posttranslační modifikace lysinu. Pravděpodobně z důvodu nízkého pokrytí sekvence proteinu.

V závěru měření bylo provedeno srovnání získaných MS/MS spekter. Spektra byla získána z CE/MS-IT a z nano-LC/MS-QTOF. Byly vybrány albuminové peptidy obsahující CML na pozici 498, aminokyselinová sekvence tohoto peptidu byla VTKCCTESLVNR. Druhé srovnání MS/MS spekter se týkalo srovnání peptidových fragmentů CCTESLVNR v pozici 345 – 353.

6 Literatura

1. <http://www.hupo.org/overview/background/> (14. 3. 2012).
2. **Larsen, M. R., Trelle, M. T., Thingholm, T. E., Jensen, O. N.** *BioTechniques*. 2006, **40**: p. 790-798.
3. **Maillard, L. C.** *C. R. Seances Acad. Sci.* 1912, **154**: p. 66-68.
4. **Lapolla, A., Traldi, P., Fedele, D.** *Clinical Biochemistry*. 2005, **38**: p. 103-115.
5. **Procop, D. J., Kivirikko, K. I.** *Annu. Rev. Biochem.* 1995, **64**: p. 403-434.
6. **Schober, E., Pollak, A., Coradello, H., Lubec, G.** *Diabetologia*. 1982, **23**: p. 485-487.
7. **Cohen, M. P., Urdanivia, E., Surma, M., Yuwu, V.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1980, **95**: p. 765-769.
8. **Van Boekel M. A. M.** *Mol. Biol. Rep.* 1991, **15**: p. 57-64.
9. **Boekel, M. A. M., Hoenders, H. J.** *Federation of European Biochem Scienties*. 1992, **314**: p. 1-4.
10. **Mikulíková, K., Eckhardt, A., Kuneš, J., Zicha, J., Mikšík, I.** *Physiol. Res.* 2008, **57**: p. 89-94.
11. **Bhattacharyya, N., Pal, A., Patra, S., Haldar, A. K., Roy, S., Ray, M.** *International Immunopharmacology*, 2008, **8**: p. 1503-1512.
12. **Wang, H., Liu, J., Wu, L.** *Biochemical Pharmacology*. 2009, **77**: p. 1709-1716.
13. **Racek, J.** *Klinická biochemie*. Praha: Galén. 1999, p. 64-66.
14. <http://www.uniprot.org/uniprot/P02787> (8. 2. 2012).
15. **Murray, R. K.** *Harperova biochemie*. Jinočany: H+H. 2001, p. 705-706.
16. **Winterbourn, Ch. C.** *Toxicology Letters*. 1995, **82/83**: p. 969-974.
17. **Agil, A., Fuller, C. J., Jialal, I.** *Clinical Biochemistry*. 1995, **41**: p. 220-225.
18. **Fujimoto, S., Kawakami, N., Ohara, A.** *Bio. and Pharamc.* 1995, **18**: p. 396-400.
19. **Van Campenhout, A., Van Campenhout, Ch., Olyslager, Y. S., Van Damme, O., Lagrou, A. R., Keenoy, B. M.** *Clinica Chemica Acta*. 2006, **370**: p. 115-123.
20. **Goodarzi, M., T., Rashidi, M., Rezaei, M.** *I. J. of Basic Medici Science*. 2010, **13**: p. 194-200.
21. **Kašička, V.** *Chem. Listy*. 1997, **91**: p. 320-329.
22. **Righetti, P. G.** *Biopharm. Drug Dispos.* 2001, **22**: p. 337-351.
23. **Westermeier, R., Schickle, H.** *Arch. Physiol. Biochem.* 2009, **115**: p. 297-285
24. **Kašička, V.** *Electrophoresis*. 2012, **33**: p. 48-73.

25. **Churáček, J.** *Analytická separace látek*. Praha: SNTL. 1990, p. 305.
26. **Klouda, P.** *Moderní separační metody*. Ostrava: Pavel Klouda. 2003, p. 33-37.
27. **Haselberg, R., Gerhardus, J., Somsen, G. W.** *Electrophoresis*. 2011, **32**: p. 66-82.
28. **Kašička, V.** *Electrophoresis*. 1999, **20**: p. 15-16.
29. **Bailey, C. J.** *Biochem J.* 1973, **135** (4): p. 884-891.
30. **Townshend, A. et al.** *Encyklopedia of Analytical Science*. London: Academic Press. 1995, p. 1097-1104.
31. **Messana, I., Rossetti, D. V., Cassiano, L., Misiti, F., Giardina, B., Castagnola, M.** *Journal of Chromatogr. B.* 1997, **699**: p. 149-171.
32. **Janini, G. M., Zhou, M., Yu, L. R., Blonder, L., Gignac, M., Conrads, T. P., Issaq, H. J., Veenstra, T. D.** *Anal. Chem.* 2003, **75**: p. 5984-5993.
33. **Petr, J.** *Chem. Listy*. 2009, **103**: p. 661-666.
34. **Tůma, P., Samcová, E.** *Chem. Listy*. 2007, **101**: p. 200-207.
35. **Kim, J. B., Okamoto, Y., Terabe, S.** *Journal of chromatography A*, 2003, **1018**: p. 251-256.
36. **Wang, Y., Xie, Y., Bernier, M., Wainer, I. W.** *Journal of Chromatogr. A.* 2009, **1216**: p. 3533-3537.
37. **Chen, Y., Zhang, L., Xu, L. J., Lin, J. M., Chen, G. N.** *Electrophoresis*. 2009, **30**: p. 2300-2306.
38. **Zhang, L. Y., Sun, M. X.** *Journal of Chromatogr. B.* 2009, **877**: p. 4051-4054.
39. **Lacroix, M., Poinot, V., Fournier, C., Couderc, F.** *Electrophoresis*. 2005, **26**: p. 2608-2621.
40. **Manz A., Graber N., Widmer H. M.** *Sensors and Actuators B Chem.* 1990, **1**: p. 244-248.
41. **Lee S. J., Lee S. Y.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, **64**: p. 289-299.
42. **Mello, A.** *Lab Chip*. 2002, **2**: p. 48-54.
43. **Smejkal, P., Foret, F.** *Chem. Listy*. 2012, **106**: p. 104-112.
44. **Kaniansky, D., Masár, M., Bodor, R.** *Chem. Listy*. 2003, **97**: p. 607-618.
45. **Pecková, K., Mocko, V., Opekar, F., Swain, G. M., Zima, J., Barek, J.** *Chem. Listy*. 2006, **100**: p. 124-132.
46. **Štosová, T., Havliš, J., Lenobel, R., Šebela, M.** *Chem. Listy*. 2005, **99**: p. 896-905.
47. **Havliš J., Shevchenko A.** *Anal. Chem.* 2004, **74**: p. 3029-3036.
48. **Vaňková, H.** *Chem. Listy*. 1999, **93**: p. 120-127.

49. Ver Berkmoes N. C., Hervey W. J., Shah M., Land M., Hauser L., Larimer F. W., Van Berkel G. J., Goeringer D. E. *Anal. Chem.* 2005, **77**: p. 923-932.
50. Han, X., Aslanian, A., Yates, J. R. *Chemical Biology*. 2008, **12**: p. 483-490.
51. Štulík, K. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. 2004, p. 210-211.
52. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. *Science*. 1989, **246**: p. 64-71.
53. Von Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E. *Electrophoresis*. 2001, **22**: p. 1251-1266.
54. Jenkins, R. E., Pennington, S. R. *Proteomics*. 2001, **1**: p. 3.
55. Smith, R. D., Barinaga, C. J., Udseth, H. R. *Anal. Chem.* 1988, **60**: p. 1948-1952.
56. Holčápek, M., Lísa, M., Jirásko, R. *Sborník 12. ročník Školy hmotnostní spektrometrie*. Pardubice: Univerzita Pardubice. 2011.
57. Britz-McKibbin, P., Terabe, S. *Journal of chromatography A*. 2003, **1000**: p. 917-934.
58. Gottardo, R., Mikšík, I., Aturki, Z., Sorio, D., Seri, C., Fanali, S., Tagliaro, F. *Electrophoresis*. 2012, **33**: p. 599-606.
59. Zmatlíková, Z. *Analýza posttranslačně modifikovaných proteinů metodami kapilární elektroforézy*, Diplomová práce - Univerzita Pardubice. 2009.
60. Zmatlíková, Z., Sedláková, P., Lacinová, K., Eckhardt, A., Pataridis, S., Mikšík, I. *Journal of chromatography A*. 2010, **1217**: p. 8009-8015.
61. Mikulíková, K., Eckhardt, A., Pataridis, S., Mikšík, I. *Journal of chromatography A*. 2007, **1155**: p. 125-133.
62. <http://www.uniprot.org/uniprot/P02769> (16. 5. 2012).
63. <http://www.uniprot.org/uniprot/P02453> (16. 5. 2012).

SEZNAM PŘÍLOH

- P I Aminokyselinové sekvence lidského transferinu [14].
- P II Aminokyselinová sekvence albuminu (BSA) [62].
- P III Aminokyselinová sekvence hovězího kolagenu typu I [63].

Příloha P I: Aminokyselinová sekvence lidského transferinu

Sekvence lidského transferinu z databáze SwisProt (P 02787)

10 20 30 40 50 60
MRLAVGALLV CAVLGLCLA V PDKTVRWCA V SEHEATKCQ S FRDHMKSVI P SDGPSVACV K

70 80 90 100 110 120
KASYLDCIRA IAANEADAV T LDAGLVYDA Y LAPNNLKP V AEFYGSKE D QTFYYAVAV V

130 140 150 160 170 180
KKDSGFQMN Q LRGKKSCH T LGRSAGWN I IGLLYCDL PE PRKPLEKAVA NFFSGSCAP C

190 200 210 220 230 240
ADGTDFFQL C QLCPGCGCS T LNQYFGYSG A FKCLKDGAG D VAFVKHSTI F ENLANKADR D

250 260 270 280 290 300
QYELLCLDNT R KPVDEYKDC HLAQVPSHT V VARSMGGKE D LIWELLNQA Q EHFGKDKSKE

310 320 330 340 350 360
FQLFSSPHG K DLLFKDSA H FLKVPPRMD A KMYLGYEYV T AIRNLREGT C PEAPTDECK P

370 380 390 400 410 420
VKWCALSHHE R LKCEWSVN S SVGKIECVS A ETTEDCIAK I MNGEADAMS L DGGFVYIAG K

430 440 450 460 470 480
CGLVPVLAEN Y NKS DNCE DT PEAGYFAIA V VKKSASDLT W DNLKGK**KSCH** **TAVGR** TAGWN

490 500 510 520 530 540
IPMGLLYNK I NHCRFDEFF S EGCAPGSKK D SSLCKLCMG S GLNLCEPNN K EGYGYTGA F

550 560 570 580 590 600
RCLVEKGDVA F VKHQ T V P Q N TGGKNPDPWA KNLNEKDYEL LCLDGTRKP V EEYANCHLAR

610 620 630 640 650 660
APNHAVVTR K DKEACVHKI L RQQQH LFGSN VTDCSGNFCL FRSETKDLL F RDDTVCLAKL

670 680 690
HDRNTYEKYL GEEYVKA VGN LKRCSTSSL EACTFRRP

Příloha P II: Aminokyselinová sekvence BSA

Sekvence hovězího albuminu z databáze SwisProt (P 02769)

10 20 30 40 50 60
MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIÄ FSQYLQQCPF

70 80 90 100 110 120
DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCCEKQEP

130 140 150 160 170 180
ERNECFLSHK DDSPDLPKLK PDPNTLCDEF KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY

190 200 210 220 230 240
ANKYNGVFOE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVÄ

250 260 270 280 290 300
RLSQKFPKAE FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE

310 320 330 340 350 360
CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR

370 380 390 400 410 420
HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAQDDPH ACYSTVFDKL KHLVDEPQNL IKQNCQDFEK

430 440 450 460 470 480
LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTEDYLSLIL

490 500 510 520 530 540
NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP

550 560 570 580 590 600
DTEKQIKQT ALVELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV

STQTALA

Příloha P III: Aminokyselinová sekvence hovězího kolagenu typu I.

Sekvence hovězího kolagenu z databáze SwisProt (P 02453, alfa 1, typ I).

10 20 30 40 50 60
MFSFVDLRLL LLLAATALLT HGQEEGQEEG QEEDI PPVTC VQNGRLRYHDR DVWKPVPCQI

70 80 90 100 110 120
CVCDNNGNVLCD DDVICDELKD CPNAKVPTDE CCPVCPEGQE SPTDQETTGV EGPKGDTGPR

130 140 150 160 170 180
GPRGPAGPPG RDGIPGQPL PGPPGPPGP GPPGLGGNFA PQLSYGYDEK STGISVPGPM

190 200 210 220 230 240
GPSGPRGLPG PPGAPGPQGF QGPPGEPGE GASGPMGPRG PPGPPGKNGD DGEAGKPRP

250 260 270 280 290 300
GERGPPGPQG ARGLPGTAGL PGMKGRHGF GLDGAKGDAG PAGPKGEPGS PGENGAPGQM

310 320 330 340 350 360
GPRGLPGERG RPGAPGAGA RGNDGATGAA GPPGPTGPAG PPGFPGAVGA KEGGGPQGR

370 380 390 400 410 420
GSEGPQGVRG EPGPPGAGA AGPAGNPGAD GQPGAKGANG APGIAGAPGF PGARGPSGPQ

430 440 450 460 470 480
GPSGPPGPKG NSGEFGAFGS KGDTGAKGEP GPTGIQGGP PAGEEGKRG RGEPPAGLP

490 500 510 520 530 540
GPPGERGGP SRGFPGADGV AGPKGPAGER GAPGPAGPK SPGEAGRPE AGLPGAKGLT

550 560 570 580 590 600
GSPGSPGPDG KTGPPGPAQ DGRPGPPGP GARGQAGVMG FPGPKGAAGE PGKAGERGV

610 620 630 640 650 660
GPPGAVGPAG KDGEAGAQP PGPA GPAGER GEQGPAGSPG FQGLPGPAGP PGEAGKPGEQ

670 680 690 700 710 720
GVPGDLGAPG PSGARGERF PGERGVQGP GPAGPRGANG APGNDGAKGD AGAPGAPGSQ

730 740 750 760 770 780
GAPGLQGMFG ERGAAGLPGP KGDRGDAGPK GADGAPKDG VRGLTGPIGP PGPAGAPGDK

790 800 810 820 830 840
GEAGPSGPAG PTGARGAPGD RGEPPGPPA GFAGPPGADG QPGAKGEPGD AGAKGDAGPP

850 860 870 880 890 900
GPAGPAGPPG PIGNVGAPGP KGARGSAGPP GATGFPGAAG RVGPPGPSN AGPPGPPGA

910 920 930 940 950 960
GKEGSKGPRG ETGPAGRPE VGPPGPPGA GEKGAPGADG PAGAPGTPGP QGIAGQRGVV

970 980 990 1000 1010 1020
GLPGQRGERG FPGLPGPSGE PGKQGPSGAS GERGPPGPMG PPGLAGPPGE SGREGAPGAE

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GSPGRDGSFG AKGDRGETGP AGPPGAPGAP GAPGPVGPAG KSGDRGETGP AGPAGPIGPV

<u>1090</u>	<u>1100</u>	<u>1110</u>	<u>1120</u>	<u>1130</u>	<u>1140</u>
GARGPAGPQG	PRGDKGETGE	QGDRGIKGR	GFSGLQPPG	PPGSPGEQGP	SGASGPAGPR
<u>1150</u>	<u>1160</u>	<u>1170</u>	<u>1180</u>	<u>1190</u>	<u>1200</u>
GPPGSAGSPG	KDGLNGLPGP	IGPPGPRGRT	GDAGPAGPPG	PPGPPGPPGP	PSGGYDLSFL
<u>1210</u>	<u>1220</u>	<u>1230</u>	<u>1240</u>	<u>1250</u>	<u>1260</u>
PQPPQEKAHD	GGRYRADDÄ	NVVRDRDLEV	DTTLKSLSQQ	IENIRSPEGS	RKNPARTCRD
<u>1270</u>	<u>1280</u>	<u>1290</u>	<u>1300</u>	<u>1310</u>	<u>1320</u>
LKMCHSDWKS	GEYWIDPNQG	CNLDAIKVFC	NMETGETCVY	PTQPSVAQKN	WYISKNPKEK
<u>1330</u>	<u>1340</u>	<u>1350</u>	<u>1360</u>	<u>1370</u>	<u>1380</u>
RHVWYGESMT	GGFQFEYGGQ	GSDPADVAIQ	LTFLRLMSTE	ASQNITYHCK	NSVAYMDQQT
<u>1390</u>	<u>1400</u>	<u>1410</u>	<u>1420</u>	<u>1430</u>	<u>1440</u>
GNLKALLLQ	GSNEIEIRAE	GNSRFTYSVT	YDGCTSHTGA	WGKTVIEYKT	TKTSRLPIID
<u>1450</u>	<u>1460</u>				
VAPLDVGAPD	QEFGF'DVGPA	CFL			