UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012 Aneta Kyralová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza fosforylovaných peptidů a proteinů s využitím kapilární elektroforézy

Bakalářská práce

AUTOR: Aneta Kyralová

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Václav Staněk, Ph.D.

2012

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Aneta Kyralová**
Osobní číslo:	**C09366**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Klinická biologie a chemie**
Název tématu:	**Analýza fosforylovaných peptidů a proteinů s využitím kapilární elektroforézy**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

1. V dostupné literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte odkazy týkající se fosfopeptidů a fosfoproteinů.
2. Charakterizujte význam a funkce fosforylace u proteinů a stručně popište principy jednotlivých technik kapilární elektroforézy. Dále se zaměřte na využití vybraných technik kapilární elektroforézy pro analýzu fosforylovaných proteinů a peptidů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Václav Staněk, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**

prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12.7.2012

Aneta Kyralová

Ráda bych zde poděkovala Ing. Václavu Staňkovi, Ph.D. za ochotu, rady a trpělivost během mé práce.

SOUHRN

Předložená bakalářská práce se zabývá studiem možností separace a analýzy fosfopeptidů a fosfoproteinů pomocí technik kapilární elektroforézy. V práci jsou popsány teoretické aspekty kapilární elektroforézy a jejích technik, funkce a význam proteinových fosforylací a některé v literatuře publikované výsledky o využití kapilární elektroforézy pro separace fosforylovaných a defosforylovaných peptidů a pro analýzu vzorků obsahujících tau protein.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kapilární elektroforéza; Fosforylované proteiny; Fosfopeptidy; Tau protein.

SUMMARY

Possibilities of separation and analysis of phosphopeptides and phosphoproteins using capillary electrophoresis techniques were investigated. This work describes theoretical aspects of capillary electrophoretic separation and CE techniques, an importace of protein phosphorylation and some published applications of CE techniques for separation of phosphorylated and dephosphorylated peptides and for analysis of tau protein samples.

KEYWORDS

Capillary electrophoresis; Phosphorylated proteins; Phosphopeptides, Tau protein

OBSAH

1 Úvod 11

2 Kapilární elektroforéza 12

2.1 Principy CE 12

2.1.1 Elektroforetická pohyblivost 12

2.1.2 Elektroosmotický tok (EOF) 13

2.1.3 Jouleovo teplo 15

2.2 Instrumentace 15

2.2.1 Dávkování vzorku 15

2.2.2 Kapiláry 16

2.2.3 Detekce 16

2.2.4 Zdroj vysokého napětí 17

2.2.5 Pracovní elektrolyt 17

2.3 Techniky CE 17

2.3.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE) 17

2.3.2 Kapilární gelová elektroforéza (CGE) 18

2.3.3 Micelární elektrokinetická kapilární elektrochromatografie (MEKC) 18

2.3.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC) 18

2.3.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) 19

2.3.6 Kapilární izotachoforéza (CITP) 19

3 Proteiny a peptidy 20

3.1 Struktura 20

3.1.1 Primární struktura 20

3.1.2 Sekundární struktura 21

3.1.3 Terciární struktura 21

3.1.4 Kvartérní struktura 21

3.2 Vlastnosti 22

3.2.1 Stereochemie 22

3.2.2 Acidobazické vlastnosti 22
3.2.3 Fyzikální vlastnosti 22
3.3 Rozdělení bílkovin 23
4 Fosfoproteiny a fosfopeptidy (fosforylace) 24
4.1 Transkripce 24
4.2 Translace 24
4.3 Post-translační modifikace 25
4.3.1 Fosforylace 25
4.3.2 Fosforylace tyrosinu 28
5 Využití kapilární elektroforézy pro analýzu fosfopeptidů a fosfoproteinů 29
6 Závěr 43
7 Použitá literatura 44

SEZNAM ZKRATEK

CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MES	2-(*N*-morfolin)etansulfonová kyselina
PAGE	polyakrylamidový gel
SDS	dodecylsíran sodný
TRIS	2-amino-2-hydroxymetyl-propan-1,3-diol
UV	ultrafialový

1 Úvod

Kapilární elektroforéza (CE) je analytická metoda, pomocí které se separují nabité nebo nenabité částice v úzké kapiláře za použití vysokého napětí. Elektroforéza je široce využívaná v analýze biologických makromolekul. Jednotlivé elektroforetické techniky jsou relativně jednoduché a levné a některé z nich jsou vhodné pro sériová stanovení, např. v klinických laboratořích [1,2].

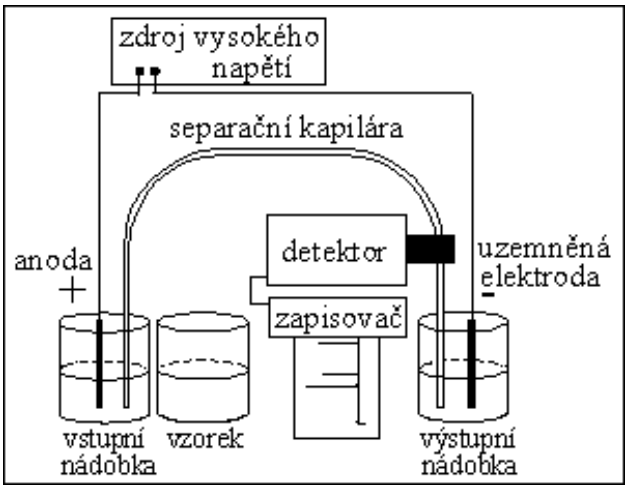
Počátky elektroforézy se datují na konec 19. Století, kdy takovým prvním milníkem byla práce o migraci iontů v elektrolytech publikovaná Kohlrauschem v roce 1897. První příbuznou techniku CE, kapilární zónovou elektroforézu (CZE) představil S. Hjertén, který provedl první experiment v křemenné kapiláře s vnitřním průměrem 1-3 mm. Dalším důležitým krokem ve vývoji CE byla redukce vnitřního průměru kapiláry na 0,2-0,5 mm, díky této redukci byla odstraněna nutnost otáčení kapiláry. Brzy poté Everaerts a Hoving-Keulemans izotachoforeticky oddělili některé organické kyseliny v polytetrafluoroethylenových kapilárách o vnitřním průměru 0,5 mm [3]. J. Jorgenson a K. Lukacs použili poprvé v roce 1981 křemenné kapiláry o vnitřním průměru 75 μm jako separační kolony v kapilární zónové elektroforéze. V roce 1984 položil základy pro micelární elektrochromatografii S. Terabe tím, že poprvé použil tenzid při separaci neutrálních látek [4].

Kapilární elektroforéza je univerzální metoda, která zahrnuje několik technik. Vlastní separační mechanismy jednotlivých technik se odlišují i v závislosti na použitém médiu v kapiláře. Mezi techniky CE patří:

- Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC nebo MECC)
- Kapilární elektrochromatografie (CEC)
- Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
- Kapilární izotachoforéza (CITP)

2 Kapilární elektroforéza

Pod názvem kapilární elektroforéza se v literatuře označují techniky, jejichž společným rysem je separace látek účinkem elektrického pole během migrace v roztoku a kapilární formát jejich instrumentace. Uspořádání přístroje pro kapilární elektroforézu je znázorněno na obrázku 1[4]. Hlavní části přístroje jsou: zdroj vysokého napětí, separační kapilára procházející detekčním systémem, který je propojen se zařízením pro sběr dat, a automatický dávkovač vzorku. Většinou je přístroj pro CE ovládán a kontrolován počítačem [5,6].



Obrázek 1: Schéma přístroje pro CE [4]

2.1 Principy CE

2.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Vlastní separace pomocí kapilární elektroforézy je založena na odlišné rychlosti nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu iontů je dána vztahem

$$v = \mu_e E$$

kde v je rychlost pohybu iontů, μ_e je elektroforetická pohyblivost a E je intenzita elektrického pole. Intenzita elektrického pole je funkcí vloženého napětí a celkové délky kapiláry [7]. Pohyblivost iontů se řídí jejich velikostí a počtem nábojů. Menší ionty se pohybují rychleji než větší ionty se stejným nábojem. Podobně, ionty nesoucí více nábojů se pohybují rychleji než ionty nesoucí pouze jeden náboj, byť se stejnou velikostí. Během

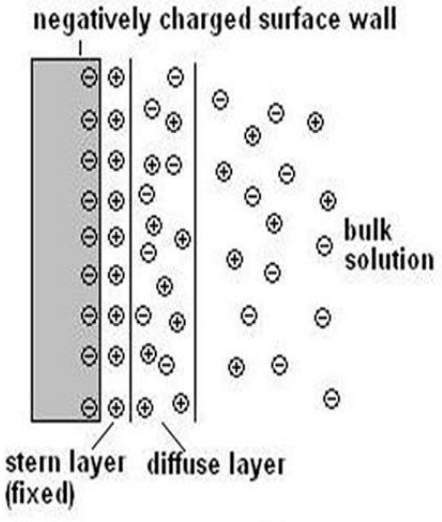
elektroforézy se ustanovuje rovnovážný stav, kdy se elektrická síla vyrovná se třecí silou prostředí, ve kterém se pohybuje nabitá částice. V tomto bodě jsou tedy obě síly stejné, ale mají opačný směr. To vyjadřuje vztah:

$$qE = 6\pi\eta r v$$

kde q je náboj, η je viskozita roztoku a r je poloměr iontů [5,7].

2.1.2 Elektroosmotický tok (EOF)

Vložené napětí způsobí v kapiláře naplněné roztokem elektrolytu tok podél kapiláry. Tento tok čerpá ionty podél kapiláry směrem k detektoru a nazývá se elektroosmotický tok. Pro CE se běžně používají kapiláry z taveného křemene. Povrch vnitřku kapiláry nese ionizovatelné silanolové skupiny, které snadno disociují a předávají kapilární stěně záporný náboj. Když je kapilára naplněná roztokem pufru (pracovní elektrolyt), záporný náboj kapilární stěny přitahuje kladný náboj iontů pocházejících z pufru. Tím se vytváří elektrická dvojvrstva a rozdíl potenciálů (zeta potenciál) u kapilární stěny, jak znázorňuje Sternův model na obrázku 2. Tento model elektrické dvojvrstvy zahrnuje pevnou vrstvu naadsorbovaných iontů a difúzní vrstvu, ve které může dojít k pohybu iontů tepelným pohybem. Zeta potenciál se vytváří v daném místě elektrické dvojvrstvy a exponenciálně klesá s rostoucí vzdáleností od vnitřního povrchu stěny kapiláry.



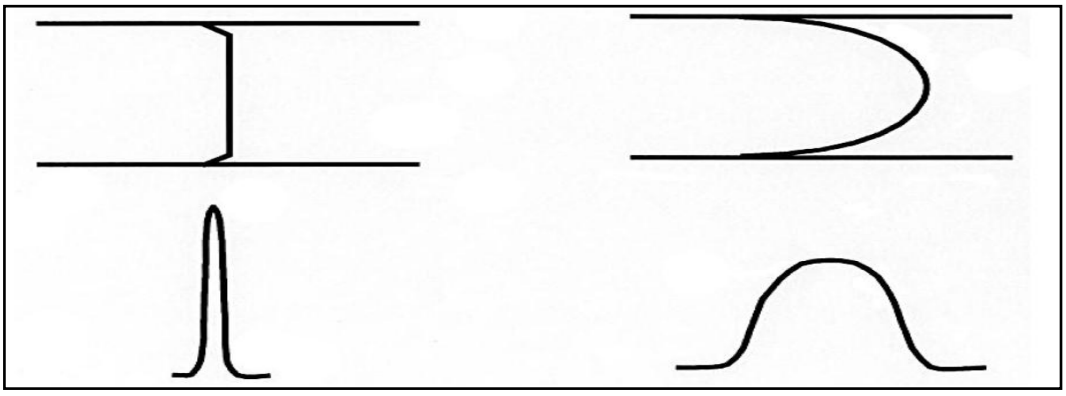
Obrázek 2: Sternův model elektrické dvojvrstvy

Pokud vložíme napětí na kapiláru, kationty v difúzní vrstvě migrují směrem ke katodě a pohyb kationtů je doprovázen pohybem pracovního roztoku. Výsledkem je tedy tok iontů ve směru ke katodě, rychlostí popsanou vztahem

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta} E$$

kde ε je dielektrická konstanta pracovního elektrolytu, ζ je zeta potenciál, η je viskozita pracovního elektrolytu a E je intenzita elektrického pole [5,7,8].

Protože je elektroosmotický tok vyvolán nábojem na vnitřním povrchu kapiláry, je profil tohoto toku plochý (pístový) na rozdíl od parabolického profilu laminárního proudění (obr. 4), a proto má malý vliv na rozmývání zón separovaných látek. Toho faktu je vyžito u kapilární elektrochromatografie (CEC), kdy je separační kapilára naplněná stacionární fází podobně jako u HPLC, ale díky pístovému profilu elektroosmotického toku se u CEC dosáhne mnohem vyšší separační účinnosti. Další výhodou EOF je, že způsobuje pohyb téměř všech iontů ve stejném směru bez ohledu na náboj [7].



a) Elektroosmotický tok (CE) b) Laminární tok (HPLC)

Obrázek 3: Srovnání profilu EOF u CE a laminárního toku u HPLC a jejich vliv na tvar píků rozdělovaných látek [6]

2.1.3 Jouleovo teplo

Při průchodu elektrického proudu kapilárou se generuje tepelná energie tzv. Jouleovo teplo. Toto teplo závisí na procházejícím elektrickém proudu, dále je určeno rozměry kapiláry, vodivostí elektrolytu a napětím. Vznikající teplo v kapiláře je nežádoucí, protože vyvolává nerovnoměrný teplotní gradient, změnu viskozity elektrolytu a následně rozšíření zón analytů. Hlavní výhodou provádění elektroforézy v úzkých kapilárách je eliminace Jouleova tepla [7].

2.2 Instrumentace

2.2.1 Dávkování vzorku

Roztok vzorku může být dávkován do kapiláry pomocí několika technik. Všechny techniky vyžadují ponoření konce kapiláry do roztoku vzorku a vyvinutí určité síly k nasátí vzorku do kapiláry. Je důležité, aby bylo možné reprodukovatelně dávkovat velmi malé (nanolitry). V praxi se nejčastěji používají techniky hydrodynamické a elektrokinetické [5-7].

a) Elektrokinetické technika

Provádí se tak, že se jeden konec kapiláry ponoří do nádobky s roztokem vzorku, do které je zároveň ponořena i pracovní elektroda. Na elektrodu se poté vkládá nízké napětí v krátkých intervalech, které způsobí migraci nabitých částic do kapiláry. Nevýhodou této techniky je, že pohyblivější částice migrují do kapiláry ve větším množství než méně pohyblivé částice.

b) Hydrodynamická technika

Nasávání vzorku do kapiláry lze provést třemi způsoby: pomocí gravitačního průtoku, rozdílu tlaků nebo vytvořením vakua. Gravitační spád vzniká

zvednutím nádobky s roztokem vzorku nad nádobku s pufrem a nad detektor. Rozdíl tlaků vzniká působením tlaku na konci kapiláry. Podtlak se vytváří na výstupním konci kapiláry. Výhodou této techniky je, že do kapiláry nadávkují všechny složky vzorku (i elektroneutrální).

2.2.2 Kapiláry

V praxi se pro většinu separací používají kapiláry z taveného křemene, protože křemen umožňuje generovat EOF, je chemicky a elektricky inertní a UV transparentní. Kapiláry jsou potaženy ochrannou vrstvou polyamidu. V místě detekce se vytváří optické „okno“ odstraněním malé části polyamidového povlaku. Odstranění se provádí pomocí žiletky, vyleptáním pomocí zahřáté koncentrované kyseliny sírové nebo opálením. Jako alternativní materiál separační kapiláry lze použít teflon [7,8]. Většinou se používají kapiláry s vnitřním průměrem 25 – 200 μm s efektivní délkou 50 – 75 cm. Efektivní délka je definovaná jako vzdálenost kapiláry z místa dávkování do místa detekce. Tato délka je důležitá, protože z její velikosti se určuje pohyblivost. Celková délka kapiláry je pak o několik cm delší v závislosti na použitém přístroji. U některých komerčně dodávaných přístrojů se lze setkat s kazetami, v nichž je kapilára uložena. Tato kazeta je pak vybavena chladicím zařízením, aby se eliminoval vliv generovaného Jouleova tepla.

2.2.3 Detekce

Mezi nejvíce využívanou detekční techniku patří absorpce UV záření. Při použití kapilár z taveného křemene lze použít vlnovou délku 200 nm a více. Lineární detekční rozsah je omezen kvůli krátké optické dráze paprsku, která je daná vnitřním průměrem kapiláry. Některé látky, jako např. peptidy, nejsou silnými chromofory, a jejich detekce pomocí UV pak může být zajištěna přidáním pomocné látky do pracovního elektrolytu, která dobře absorbuje v UV oblasti. Průchod analyzovaného peptidu detektorem pak způsobí pokles absorbance [7].

Díky malým rozměrům kapiláry a malým dávkovacím objemům vzorku musí být detekční techniky pro CE velmi citlivé. Citlivost i rozsah detekce lze zlepšit zvětšením vnitřního průměru kapiláry. Speciální konstrukce kapilár může být využita i k prodloužení

optické dráhy, např. vytvořením bubliny v kapiláře v místě detekce (tzv. bubble cell). Spolu s tím dochází i k poklesu rychlosti toku elektrolytu v rozšíření kapiláry.

2.2.4 Zdroj vysokého napětí

Separace jsou prováděny při napětí 5 – 30 kV a odpovídajícímu proudu v rozmezí 0 – 300 μA. Velikost generovaného proudu je třeba kontrolovat, protože separace prováděné při proudech nad touto hodnotou může vést k nestabilitě a k nereprodukovatelnosti stanovení [5]. Pracovní napětí vkládané na elektrody je buď kladné nebo záporné, v závislosti na požadavcích při analýze Změna polarity se provádí přímo na vysokonapěťovém zdroji, uzemňovací elektroda je připojena blíže k detektoru a elektroda s větším potenciálem je připojena na druhém konci. [7].

2.2.5 Pracovní elektrolyt

V CE může být použito mnoho roztoků, které plní funkci pracovního elektrolytu neboli pufru. Nejčastěji používanými pufry jsou fosfáty, acetáty, boritany a vnitřní soli jako TRIS a MES, které jsou využívány pro separaci proteinů a peptidů. Na správném výběru elektrolytů závisí řada faktorů jako rozpustnost, stabilita analytu v elektrolytu, stupeň ionizace, vliv pH, odvod tepla generovaného při průchodu proudu kapilárou atd. Elektrolyty mohou obsahovat řadu aditiv v závislosti na použité technice CE. Příkladem může být použití micel v MEKC. Přídavek organických rozpouštědel do elektrolytů umožňuje analýzu těch látek, které nejsou za běžných podmínek rozpustné. Organická rozpouštědla také snižují velikost EOF, což může mít vliv na lepší analýzu, byť na úkor času separace [6,8].

2.3 Techniky CE

2.3.1 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Tento způsob separace, při kterém látka migruje kapilárou, je nejvyužívanější. Nabízí efektivní rozdělení látek a rychlou analýzu. Elektrolyt může být kyselý (citrát, fosfát), zásaditý (boritany) nebo amfoterický. Pokud vložíme napětí na elektrody, ionty začnou v kapiláře migrovat směrem k opačně nabité elektrodě lineární rychlostí. Vnitřní povrch kapiláry je pokryt silanolovými skupinami, které v závislosti na pH elektrolytu ionizují. Při pH > 3 dochází k disociaci a záporně nabitý povrch kapiláry vyvažují kladné

ionty elektrolytu, čímž se vytváří elektrická dvojvrstva a zeta potenciál. Kladně nabité ionty z této difúzní vrstvy putují směrem ke katodě, s sebou strhávají i elektrolyt a vytváří se EOF. Pokud je EOF větší jak elektroforetická migrace putují ke katodě i záporně nabité ionty [9,10].

2.3.2 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Tato technika představuje separaci v kapiláře vyplněné agarosovým nebo polyakrylamidovým gelem (PAGE). Kapilára je tedy vyplněna elektrolytem impregnovaným do gelu. Separační mechanismus je založen na rozdílu molekulových hmotností. V gelu s různou velikostí pórů migrují nabité molekuly matricí gelu různou rychlostí, jsou různě zadržovány. Vedle toho funguje gel jako médium, které zabraňuje adsorpci molekul na vnitřní stěnu kapiláry a eliminuje EOF. CGE se využívá zejména při separaci makromolekul [6,9].

2.3.3 Micelární elektrokinetická kapilární elektrochromatografie (MEKC)

MEKC systém obsahuje dvě fáze – vodnou fázi a micelární fázi, separační mechanismus je tedy založen na rozdělení rozpuštěné částice mezi micely a vodnou část. Micely se vytváří v základním elektrolytu přidáním povrchově aktivní látky. MEKC se nejčastěji provádí s aniontovými povrchově aktivními látkami jako je např. dodecylsulfát sodný (SDS). V případě použití těchto látek, mají hydrofobní konce skupin tendenci se orientovat do středu micely a nabité skupiny směrem k povrchu micely. Povrch micel SDS má záporný náboj. Tyto micely vykazují velkou elektroforetickou pohyblivost směrem k anodě, která je v opačném směru než EOF směřující ke katodě. Pokud velikost EOF převažuje mírně nad elektroforetickou pohyblivostí, pohybuje se vodná fáze rychleji než micelární. Látky se dělí mezi dvě fáze, což vede k jejich zadržování na základě rozpustnosti micel. Hydrofobní látky interagují silněji s micelami a tak migrují pomaleji než hydrofilní látky. MEKC se využívá pro separace neutrálních molekul [6].

2.3.4 Kapilární elektrochromatografie (CEC)

CEC je chromatografická separační technika, ve které je kapalná mobilní fáze řízena hnací elektroosmotickou silou. Využívají se křemenné kapiláry s vnitřním průměrem 50 – 200 μm, uvnitř pokryté vrstvou polyimidu, které fungují jako stacionární

fáze. Jako kapalnou fázi lze použít například acetonitril. Neutrální částice se oddělují na základě rozdílné interakce mezi stacionární a mobilní fází, jako v HPLC. Nabité látky jsou oddělovány i pomocí jejich různých elektroforetických pohyblivostí. CEC může nabídnout účinné separace složitých směsí jako např. biologických významných látek v komplexních matricích [11,12].

2.3.5 Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Technika se běžně provádí v plochých deskách nebo v křemenných kapilárách gelového formátu, jejichž vnitřek je potažen polyakrylamidem. Oddělování neutrálních molekul probíhá v gradientu pH, který je generován amfolyty působením vloženého napětí. Analyty jsou fokusovány v izoelektrickém bodě v pH gradientu mezi dvěma elektrolyty, hydroxid sodným jako katolytem a kyselinou fosforečnou jako amfolytem. V izoelektrickém bodě se vytváří zóny, které je nutno pro vizualizaci obarvit. Při absenci EOF jsou zóny uvolňovány hydrodynamicky nebo chemicky. Během této mobilizace se udržuje napětí, které slouží jako stabilizátor, aby nedocházelo k rozmývání analytu. Tomuto „nastavení“ se nazývá dvoukroková CIEF. V přítomnosti elektroosmózy je mobilizace dosaženo pomocí EOF, což se nazývá jednokroková CIEF. EOF lze eliminovat díky vnitřnímu povrchu kapiláry použitím methylcelulosy nebo nesíťovaného polyakrylamidu. CIEF je vhodná technika pro analýzu amfoterních sloučenin, malých molekul či buněčných struktur [13].

2.3.6 Kapilární izotachoforéza (CITP)

V CITP systému migruje vzorek mezi vedoucím a koncovým elektrolytem. Vedoucí elektrolyt obsahuje koion s větší mobilitou než mají ostatní složky vzorku, naproti tomu koncový elektrolyt obsahuje koion s menší mobilitou než mají ostatní složky vzorku. V aniontové CITP se používají jako vedoucí elektrolyt anionty, nejčastěji chloridy, aminokyseliny (histidin, alanin) nebo neutrální látky. V kationtové CITP se jako vedoucí elektrolyt používají nečastěji draselné nebo amonné soli. Touto metodou je možné stanovovat anionty i kationty, ale nikdy ne současně. Složky vzorku jsou oddělovány vlivem napětí a tvoří diskrétní zónu, která je v kontaktu jak s vedoucím, tak s koncovým elektrolytem. Jakmile systém dosáhne rovnováhy, všechny zóny migrují stejnou rychlostí a jsou uspořádány podle klesající mobility. V závislosti na čase se pak sleduje vodivost při průchodu jednotlivých zón detektorem [14].

3 Proteiny a peptidy

Proteiny jsou základní součástí živé hmoty, součástí většiny buněk, kde plní úkol stavební a jsou na ně rovněž vázány životní pochody organismu. Základními stavebními prvky molekul peptidů a proteinů jsou aminokyseliny v určitém počtu a pořadí.

Aminokyseliny mají v našem těle důležitou roli, zejména pak právě jako stavební prvky proteinů a peptidů. Pro syntézu těchto sloučenin je důležitých celkem dvacet základních aminokyselin, nejméně devět z nich funguje jako minerály a hormony a musí být získávány z potravy [15]. K vytvoření peptidů se aminokyseliny navzájem propojují peptidovou vazbou. Jedná se o kovalentní vazbu mezi karboxylovým uhlíkem jedné aminokyseliny a koncovou amino- skupinou druhé aminokyseliny. Dipeptidy, tripeptidy, oligopeptidy a polypeptidy jsou složeny z dvou, tří a více molekul aminokyselin. Polypeptidy jsou polymery aminokyselin s molekulovou hmotností menší jak 10 kD. Proteiny jsou pak makromolekuly, kdy každý polymer je tvořen velkým počtem aminokyselinových molekul. Každá bílkovina nese ve své molekule uhlík, vodík, kyslík a dusík. Mnoho proteinů obsahuje síru a některé i fosfor [16].

3.1 Struktura

Přesná sekvence aminokyselin v peptidovém řetězci je určena geneticky. Syntetizovaný polypeptidový řetězec se skládá do trojrozměrného tvaru, který je pro něj charakteristický. Daná konformace je závislá na aminokyselinové sekvenci a je stabilizovaná násobnými slabými interakcemi. Jakýkoliv vliv narušující tyto interakce vede k narušení původní konformace a tento proces nazýváme denaturace [17].

3.1.1 Primární struktura

Primární struktura je sekvence aminokyselin tvořená převážně peptidovými vazbami. Tam, kde peptidový řetězec nese cystein, může být včleněna do postranního řetězce disulfidická vazba, která propojuje dva cysteinové zbytky v řetězci. Aminoskupina na jednom konci a karboxylová skupina na druhém zůstávají volné, nazývají se jako N-terminální a C-terminální konce peptidového řetězce. Jednotlivé aminokyseliny jsou pak číslovány od N-konce k C-konci [16].

3.1.2 Sekundární struktura

Sekundární struktury tvoří trojrozměrné konformace proteinů. Molekulární řetězce bílkovin jsou obvykle uspořádány do strukturálních segmentů s různou konformací jako je pravidelně vinutá α-šroubovice, rovný β-skládaný list, zahnutý β-ohyb nebo nepravidelně uspořádaná ω konformace. Neopakující se sekvence β-ohybu navzájem propojují opakující se jednotky α-šroubovice a β-skládaného listu. Asi polovina peptidového řetězce průměrného globulárního proteinu je uspořádána v pravidelných sekvencích α-šroubovice a β-skládaného listu, zbytek se skládá z nepravidelných smyček. Zcela hydrofilní segmenty z polárních aminokyselin tvoří nepravidelné a neuspořádané smyčky. Hydrofobní segmenty složené z nepolárních aminokyselin tvoří buď α-šroubovice nebo β-skládaný list [16].

3.1.3 Terciární struktura

Terciární struktura je trojrozměrná struktura, kde umístění atomů v prostoru vytváří polypeptidový řetězec. Terciární struktura složená z menších polypeptidů (přibližně 200 aminokyselin) vytváří obvykle jeden strukturální prvek. Trojrozměrná struktura větších polypeptidů vykazuje přítomnost dvou i více strukturálních podjednotek. Poté co je polypeptidový řetězec organizován do struktur jako je α-šroubovice, β-skládaný list a dalších, vznikají kombinace těchto struktur nazývané jako supersekundární struktury. Několik sousedních sekundárních struktur řetězce se může skládat a stáčet a vytvářet tak kompaktně zformované globulární části nazývané domény. Protein může obsahovat jednu nebo více postupně jdoucích domén. Výsledkem prostorového uspořádání strukturních domén v polypeptidovém řetězci je trojrozměrná struktura nazývaná jako terciární. Je to konečná nativní konformace monomerů bílkovin skládajících se z jednoho řetězce. Terciární struktury polypeptidových řetězců jsou stabilizovány především hydrofobními interakcemi mezi nepolárními skupinami aminokyselin postranních řetězců [16,17].

3.1.4 Kvartérní struktura

Většina proteinů jsou oligomery, jejichž molekuly se skládají ze dvou nebo více stejných či rozdílných podjednotek, které drží pohromadě pomocí nekovalentních vazeb. Prostorové uspořádání těchto podjednotek tvoří kompletní tvar představovaný kvartérní strukturou. Pokud má protein identické podjednotky, hovoříme o homodimeru, jsou-li

podjednotky rozdílné, nazýváme jej heterodimer. Podjednotky drží pohromadě především vodíkovými vazbami a iontovými vazbami mezi polárními aminokyselinami a některými hydrofobními interakcemi mezi nepolárními aminokyselinami. Stejné podjednotky jsou uspořádány symetricky v kvartérní struktuře a udělují tím bílkovině rotační symetrie [16].

3.2 Vlastnosti

3.2.1 Stereochemie

Jedním z hlavních rysů všech aminokyselin (kromě glycinu) je, že mají ve své molekule chirální uhlík. Dalším rysem je, že všechny aminokyseliny v živých organismech jsou ve své podstatě asymetrické. Aminokyseliny v proteinech mají vždy L-konfiguraci, která je aktivní. Totéž platí prakticky o všech biomolekulách, které jsou chirální; jeden enantiomer je biologický aktivní, zatímco druhý není. V případě aminokyselin se malé množství enantiomerů D nachází v přírodě, např. v buněčných stěnách mikroorganismů [18].

3.2.2 Acidobazické vlastnosti

Aminokyseliny s α-amino- skupinou mají pKa v rozmezí hodnot 9 – 10, kdežto α-karboxylové kyseliny mají pKa okolo 2 – 2,5. Díky tomu pak v roztoku existují jako neutrální molekuly. Jejich hodnoty pKa jsou nižší než u monofunkčních karboxylových kyselin a aminů, protože kladný náboj na aminoskupině při nízkém pH stabilizuje záporný náboj karboxylové skupiny. Chování proteinů z velké části závisí tedy na pH. Isoelektrický bod je hodnota pH, při kterém ionty nemigrují v elektrickém poli. pH isoelektrického bodu závisí na disociačních konstantách kyselých i zásaditých skupin. Isoelektrický bod proteinů je tak závislý na poměru počtu volných karboxylových a volných aminoskupin, které naopak závisí na složení aminokyselin v proteinovém řetězci [18, 19].

3.2.3 Fyzikální vlastnosti

Neméně důležitá je i klasifikace aminokyselin na základě hydrofobních a hydrofilních vlastnostech postranního řetězce. Čím větší je kladný náboj postranního řetězce, tím větší je hydrofobnost molekuly. Naopak čím větší je záporný náboj, tím větší je hydrofilicita molekuly. Na základě toho byly aminokyseliny rozděleny do tří skupin, které se mohou navzájem prolínat. Polární aminokyseliny a amidy jsou hydrofilní,

hydroxy- aminokyseliny jsou přechodné a alifatické i aromatické aminokyseliny jsou hydrofobní [18].

3.3 Rozdělení bílkovin

Proteiny jsou klasifikovány na základě jejich chemického složení a jejich molekulární struktury. Lze je dělit i podle jejich rozpustnosti, ale toto dělení je poněkud komplikované [20]. Patří mezi ně:

- Albuminy
- Globuliny
- Histony
- Gluteliny
- Prolaminy
- Skleroproteiny
- Složené bílkoviny

  Jedná se o speciální třídu bílkovin, které mají neaminokyselinovou část (tzv. prostetickou skupinu) připojenou k bílkovinné část řetězce. Mezi tyto bílkoviny patří [20]:

  - Metaloproteiny
  - Glykoproteiny
  - Lipoproteiny
  - Nukleoproteiny
  - Chromoproteiny
  - Fosfoproteiny

4 Fosfoproteiny a fosfopeptidy (fosforylace)

Bílkoviny se tvoří procesem zvaným proteosyntéza. Tento proces se skládá ze dvou kroků, kdy prvním je transkripce a druhým je translace. Posttranslační modifikace pak upravují bílkoviny, kdy může dojít ke vzniku např. fosforylovaných proteinů.

4.1 Transkripce

Transkripcí se rozumí přenos genetické informace z DNA do RNA molekuly. Jedná o proces vytvoření vlákna RNA na principu komplementarity k vláknu DNA, kdy proti adeninu v DNA je řazen uracil v RNA. Pracovním vláknem je označováno jedno vlákno DNA, které slouží jako matrice pro vytvoření RNA. Druhé vlákno je paměťové vlákno a za normálních podmínek k jeho transkripci nedochází. Transkripce probíhá od 5´ konce vlákna ke 3´ konci. Mezi hlavní enzymy podílející se na transkripci patří DNA dependentní RNA polymerasy. U eukaryotických buněk se transkripce účastní řada bílkovin, které se nazývají transkripční faktory a rozlišují se římskými číslicemi. Transkripcí u eukaryot vzniká RNA prekursorového typu, ze které se stává definitivní funkční molekula až postrankripčními úpravami [21].

4.2 Translace

Jedná se o přenos genetické informace z kódu mRNA do pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. K tomuto procesu je nutné, aby v buňce byly přítomny, kromě materiálu a zdroje energie, také další látky jako jsou ribozomy, mRNA, tRNA a enzymy zajišťující odpovídající reakce. U prokaryotických organismů probíhá translace souběžně s transkripcí. U eukaryot vzniká transkripcí hnRNA a poté dochází k posttranskripčním úpravám. Konečná molekula mRNA je transportována z jádra do cytoplazmy pomocí transportních proteinů a až v cytoplazmě dochází na ribozomech k translaci. Před zahájením samotné translace musí být aminokyseliny aktivovány pomocí ATP. Pomocí enzymů aminoacyl-transfer-RNA-syntetasy jsou připojeny aktivované aminokyseliny na 3´OH konec své tRNA. Translace je pak zahájena spojením iniciační tRNA, což je tRNA nesoucí metionin, s GTP a s eIF2 do komplexu. Tento komplex je vázán na malou ribozomální podjednotku a poté je pomocí eIF k této malé podjednotce připojena molekula mRNA. Štěpením ATP se získává energie, a proto se mRNA posunuje po malé podjednotce ribozomu, dokud nenarazí na triplet AUG. Vzniklý komplex je spojen s větší podjednotkou ribozomu za pomocí energie, která vzniká štěpením GTP. Tímto vzniká

ribozom, kde je Met-tRNA na peptidovém místě, na aminoacylové místo je řazena tRNA odpovídající druhému tripletu pomocí elongačního faktoru. Pomocí ribozomálních peptidů dochází k vytvoření peptidové vazby mezi metioninem a druhou aminokyselinou. Celý proces končí tím, že bílkovinný faktor uvolní hotový polypeptid z ribozomu [21].

4.3 Post-translační modifikace

Jedná se o soubor kovalentních změn, tyto změny jsou prováděny po překladu sekvence nukleotidů mRNA do aminokyselinové sekvence na ribozomu. Post-translační modifikace lze rozdělit do dvou kategorií. První z nich je kovalentní vazba jedné nebo více skupiN (např. fosforyl nebo acetyl) na jeden nebo více postranních řetězců aminokyselin v bílkovině. Do druhé skupiny patří hydrolytické štěpení jedné nebo více peptidových vazeb v bílkovině pomocí enzymu protein-hydrolasa. Téměř všechny ze zhruba 200 druhů post-translačních modifikací, které mají kovalentně vázány skupiny k postranním řetězcům v proteinech, se provádí pomocí enzymů, bílkovin s katalytickou aktivitou [22].

Post-translační modifikace mají především dva cíle. Jedním je řízení buněčné lokalizace. Kovalentní modifikace sekvencí aminokyselin specifickými faktory je prostředek pro regulaci jaderné lokalizace. Druhým cílem je řízení interakce protein-protein. Spektrum modifikací je široké a zahrnuje všechny bílkovinné modifikace používané buňkou pro kontrolu funkce proteinu. Každá modifikace může sloužit pro konkrétní účel a může proběhnout jako reakce na určitý podnět. Jedná se o změny reverzibilní, které umožňují dynamické modifikace systému [23].

4.3.1 Fosforylace

Nejrozšířenější post-translační modifikací proteinů je reverzibilní fosforylace proteinů, která hraje regulační roli v téměř každé činnosti buňky [25]. K fosforylaci dochází především na serinu a threoninu, ale můžeme ji pozorovat i na tyrosinu ve formě stabilních fosfomonoesterů. Nicméně i další aminokyseliny jako histidin, arginin a lysin také mohou být fosforylovány. Odhaduje se, že asi jedna třetina z potenciálních 30 000 lidských bílkovin může být v určité fázi svého životního cyklu v eukaryotické buňce substrátem pro fosforylaci. Reverzibilní fosforylace proteinů ovlivňuje základní buněčné procesy, včetně metabolismu, růstu, diferenciaci, imunitě, učení a paměti. Fosforylace a

defosforylace jsou regulovány pomocí specifických enzymů, protein-kináz a protein-fosfatáz, obě tyto reakce jsou řízeny odděleně [22-24].

Dynamika fosforylace proteinů je rozhodující pro post-translační modifikace v mnoha eukaryotických signálních drahách. Zahájení signálu může nastat, když je fosforylován postranní řetězec proteinu. Ke zrušení signálu může dojít dvěma cestami. Jednou je proteolytické rozložení fosforylovaného proteinu. Druhá a častější cesta je hydrolytické odstranění $-PO_3^{2-}$ skupiny, které zachovává bílkovinnou kostru pro další děje. Anorganický fosfát se při fyziologickém pH vyskytuje nejčastěji ve formě dianiontu HPO_4^{2-} nebo v kyselině fosforečné. Centrální atom má oxidační stav 5+ a je elektrofilní, periferní kyslík je záporně nabitý a je potenciálním nukleofilem generujícím reaktivitu pro fosfáty. Fosfátové skupiny jsou při fyziologickém pH stabilní, ale mohou absolvovat adiční nebo eliminační reakce katalyzované enzymy. Anorganický pyrofosfát $P_2O_7^{2-}$ je tetraaniontem kyseliny pyrofosforečné, ve kterém je jeden z kyslíků aniontem anorganického fosfátu druhé molekuly, eliminací vody vzniká anhydridová vazba. Tato anhydridová vazba v pyrofosfátu je více destabilizovaná než esterová vazba v monofosfátu a tak je chemicky aktivnější pro přenos fosfátové skupiny. Fosfodiesterové vazby se nacházejí v trifosfátovém řetězci jako je v ATP nebo v internukleotidových vazbách jako jsou v RNA nebo DNA. ATP jako kosubstrát v podstatě všech protein-kináz má tři postranní fosfátové řetězce v anhydridové vazbě, což je strukturní základ pro termodynamickou aktivaci pro přenos buď α, β nebo γ fosfátové skupiny na nukleofilní alkoholovou skupinu řetězce serinu, threoninu nebo tyrosinu. Mg^{2+} ionty váží do komplexu dva kyslíky fosfátové skupiny v ATP, snižují tak bariéru pro selektivní přenos fosforylové skupiny na nukleofil. Mechanismus přenosu γ-PO_4^{2-} skupiny na postranní řetězec zahrnuje selektivní atak elektrofilního γ-P z komplexu Mg-ATP. Vazebná místa bílkovin, které jsou fosforylovány, se v serinu, threoninu i tyrosinu od sebe liší. Tetraanion ATP je stabilní ve vodném roztoku, pyrofosfátové vazby jsou aktivovány, aby řídily fosforylace nukleofilních postranních řetězců. Zavedení PO_4^{2-} skupiny k jednomu nebo k více postranním řetězcům složených bílkovin dává možnost vzniku spojení vodíkovou vazbou, která může způsobit nepatrnou reorganizaci bílkovinného mikroprostředí, které řídí konformační změny [22].

Na základě strukturních a funkčních parametrů se eukaryotické protein-kinázy dělí do několika podskupin. Ser/Thr kinázyse dělí na:

- Cyklické nukleotid-dependentní protein kinázy (cAPK, cGPK)
- Fosfolipidové dependentní protein kinázy
- Ca^{2+}/kalmodulin dependentní protein kinázy
- Ribozomální S6 protein kinázy
- Cyklické dependentní kinázy (cdk, cdc2-kináza)
- Raf kinázy
- Mitogen aktivující kinázy (MAP-kináza)
- Kasein kinázy CK1
- Kasein kinázy CK2 a glykogen syntetická kinázy 3
- DNA-dependentní kinázy

Tyrosinové kinázy mohou být rozděleny do dvou hlavních podskupin:

- Cytoplazmatické tyrosin kinázy zahrnující poddruhy Src, Csk, Btk, Syk, JAK, FAK, Abl a Fps/Fes-like kinázy
- Transmembránové receptorové Tyr-kinázy

Katalytické domény eukaryotických protein kináz jsou lemovány vysoce variabilními regulačními doménami, které obsahují vazebná místa pro příslušné regulační proteiny, motivy řídící intracelulární translokaci a obsahují moduly pro příjem vstupních signálů. Tyto regulační domény jsou zodpovědné za velkou variabilitu protein kináz v reakci na různé vstupní signály. Aktivita enzymů je regulována, závisí na aktivaci pomocí signálů. Bez signálu zůstává enzym neaktivní. Regulace činnosti protein-kináz probíhá na základě mechanizmu nazývaného jako intrasterická kontrola. Na rozdíl od alosterické interakce, kdy se na enzym váže ligand strukturně odlišný od substrátu, intrasterické kontroly je dosaženo pomocí tzv. pseudosubstrátové domény. To je peptidová sekvence, která se vztahuje k aktivnímu místu v důsledku strukturní analogie se sekvencí fosforylované bílkoviny, kromě toho, že neobsahuje fosforylované aminokyseliny. Odstranění pseudosubstrátové sekvence, např. pomocí proteolýzy, vede k aktivní protein-kináze. Pseudosubstrátová doména může být lokalizovaná buď na stejném polypeptidovém řetězci jako katalytické centrum jako např. v případě protein-kinázy nebo na samostatných regulačních podjednotkách jako v případě cAMP-dependentní protein kinázy. Další typ

intrasterického kontrolního mechanismu je pro některé Tyr-kinázy poddruhu Src. Zde je pevně v neaktivním stavu v intramolekulární interakci s C-terminálním fosforylovaným zbytkem s SH2 doménou, např. aminokyselinová sekvence se specificky váže na fosforylovaný zbytek tyrosinu. Pro aktivaci je nutná defosforylace proteinu prostřednictvím tyrosin-fosfatázy [25].

4.3.2 Fosforylace tyrosinu

Fosforylované tyrosinové proteiny představují pouze malou část z buněčných fosfoproteinů. Jsou doménou spíše eukaryotických buněk, kde hrají důležitou roli v centrálních dějích buněčného života. Tyrosinové fosforylace se účastní fyziologických procesů, které jsou spojeny s mnohobuněčnými organismy, zejména tvorba a regenerace tkání, např. hrají klíčovou roli při regeneraci jater, proces vyplývající z poškození a ztráty tkáně je zaměřen na stimulaci kompenzačního růstu jater s funkcí, která podporuje tělesnou homeostázu, podílí se i na imunitním dohledu. Vývoj, údržba a opravy tkání jsou regulovány přímým kontaktem mezi buňkami a interakcemi mezi buňkami a intracelulární matrix, obojí zprostředkované adhezivními molekulami. Cytoplazmatické tyrosinové protein- kinázy nazývané fokální adhezivní kinázy (FAK) hrají klíčovou roli v této interakci, protože zprostředkovávají signály z buněčného prostředí. Tyto signály jsou přijímány speciálními transmembránovými proteiny – integriny. Integriny jsou adhezivní molekuly, které mají dva účely: připojení extracelulární struktury k cytoskeletovým proteinům a jednak regulaci řady buněčných odpovědí včetně cytoplazmatické koncentrace iontů a genové exprese. Tkáňový vývoj, opravy a homeostáza nejsou řízeny pouze adhezivními molekulami, ale i řadou polypeptidových hormonů jako např. růstovými faktory nebo cytokiny. Většina z těchto faktorů může vyvolat fosforylaci tyrosinu. Fosforylace tyrosinu také poskytuje sekundární výstupní signál pro receptory, které nemají vnitřní kinázovou aktivitu, ale komunikují po aktivaci s různými cytoplazmatickými nebo membránově vázanými tyrosin-kinázami. Tento mechanismus činnosti je charakteristický pro B a T buněčné receptory a cytokiny. Fosfotyrosin je rozpoznán vazebnými místy na bílkovinách, což vede k reverzibilní interakci na principu zámek a klíč. Tyto receptory se nazývají SH2 domény. Mnoho signálních bílkovin nese jednu nebo více SH2 domén, které jim umožňují komunikaci s fosforylovanými tyrosinovými proteiny. SH2 domény rozlišují mezi různými fosfotyrosinovými zbytky na základě strukturních parametrů, což napomáhá ke vzniku signálních transdukčních komplexů [25,26].

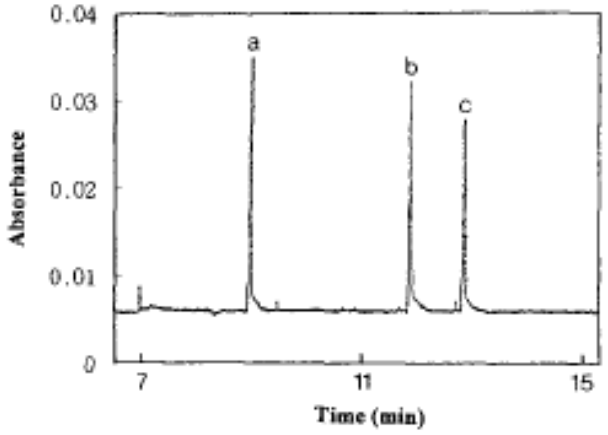
5 Využití kapilární elektroforézy pro analýzu fosfopeptidů a fosfoproteinů

Fosfoproteomika se zabývá analýzou fosforylace proteinů. K hlavním cílům patří identifikace fosfopeptidů a fosfoproteinů a také kvantifikace fosforylace. I přesto, že analytické separační techniky prošly během posledních let vývojem, není analýza fosfoproteinů rutinní záležitostí. Univerzální metoda pro analýzu fosforylovaných proteinů a peptidů neexistuje, proto je nutné vybírat z dostupných metod, kde musíme vzít v potaz určité parametry ovlivňující volbu metody jako je typ fosforylované aminokyseliny, zda máme k dispozici samotný fosfoprotein či směs a jakou informaci chceme získat [27].

Jelikož má fosforylace velký význam, bylo na vývoj metod pro charakterizaci fosforylace na serinu, threoninu a tyrosinu vynaloženo velké úsilí. Klasické metody zahrnují začlenění nuklidu ^{32}P do bílkovinného řetězce s použitím radioaktivního ATP. Radioaktivní proteiny jsou pak detekovány během frakcionace např. kapalinovou chromatografií nebo dvojrozměrnou gelovou elektroforézou. Tyto techniky jsou ale pracné, vyžadují velké množství fosforylovaných proteinů a značné množství radioaktivních látek [28].

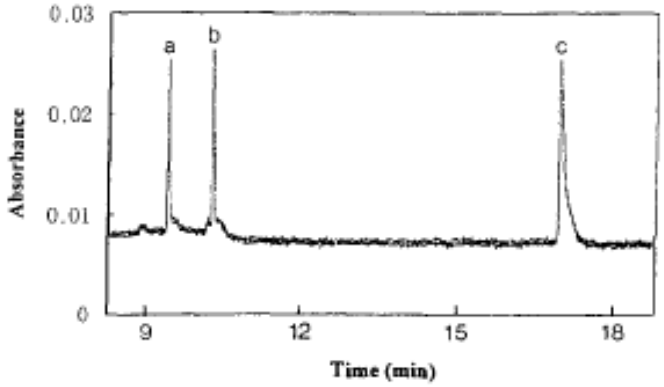
Kapilární elektroforéza je technika pro vysoké rozlišení a separaci stanovovaných molekul různých velikostí od nízkomolekulárních látek až po biologické makromolekuly. Ve studii [29] byly pro elektroforetickou separaci použity tři dvojice fosforylovaných peptidů, obsahujících serin, threonin a tyrosin, a jejich nefosforylovaných analogů pro účely dalších biochemických studií makromolekulárních interakcí. Analytické parametry byly optimalizovány pro dosažení lepších výsledků (složení, koncentrace a pH pracovního elektrolytu). Metoda MALDI-TOF-MS byla využita pro kontrolu molekulové hmotnosti fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů. Počáteční fáze výzkumu byla zaměřena na hodnocení a vývoj metod pro kontrolu čistoty fosfotyrosinu po organické syntéze. Poté byla metoda použita pro separaci ostatních peptidů. Stanovení bylo provedeno v elektrolytu s extrémní hodnotou pH = 11 pro tyrosin a pH = 2,5 pro serin a threonin. Důvodem vyšších hodnot pH byla adsorpce peptidů na kapilární stěnu, pokud je pH elektrolytu kyselé, kapilára uvnitř zůstává neutrální. Na obrázku 4 je zobrazena separace dvojice peptidů obsahujících tyrosin. Separace byla provedena ve 20 mM CAPS pufru o pH 11, UV detekce byla provedena při vlnové délce 214 nm. Jako vnitřní standard byl použit 0,2 μM N-FMOC-O-dimethylfosfo-L-tyrosin v CAPS pufru. Pík nefosforylovaného

peptidu obsahujícího tyrosin (YEEI) byl detekován v čase 12 minut, zatímco pík fosforylovaného peptidu (YpEEI) byl detekován v čase 13 minut.

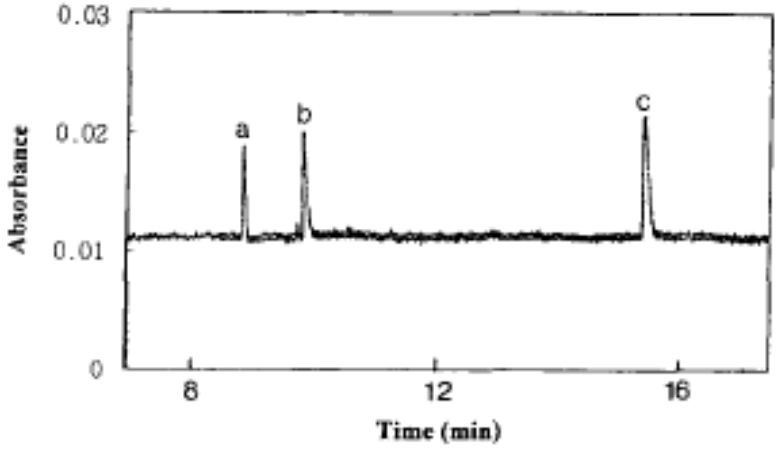


Obrázek 3: Elektroforegram peptidů obsahujících tyrosin. Píky: a) N-FMOC-O-dimethylphospho-L-tyrosine, b) YEEI, c) YpEEI [29]

Obrázky 5 a 6 znázorňují separaci dvojice peptidů obsahujících serin a threonin. Separace probíhaly v citrátovém pufru o pH 2,5 a na UV detektoru byla nastavena vlnová délka 229 nm. Na obrázku č. 5 lze pozorovat, že peptid obsahující nefosforylovaný serin (KRPSQRHGSKY) byl detekován v čase 9,5 minut a fosforylovaný analog (KRPSpQRHGSKY) v čase 10,4 minut. Při separaci peptidů obsahujících threonin se pík nefosforylovaného peptidu (KRTIRR) objevil v čase 8,9 minut, zatímco pík fosforylovaného peptidu (KRTpIRR) až v čase 9,9 minut.



Obrázek 4: Elektroforegram peptidů obsahujících serin. Píky: a) KRPSQRHGSKY, b) KRPpQRHGSKY, c) N-FMOC-Arg-OH [29]

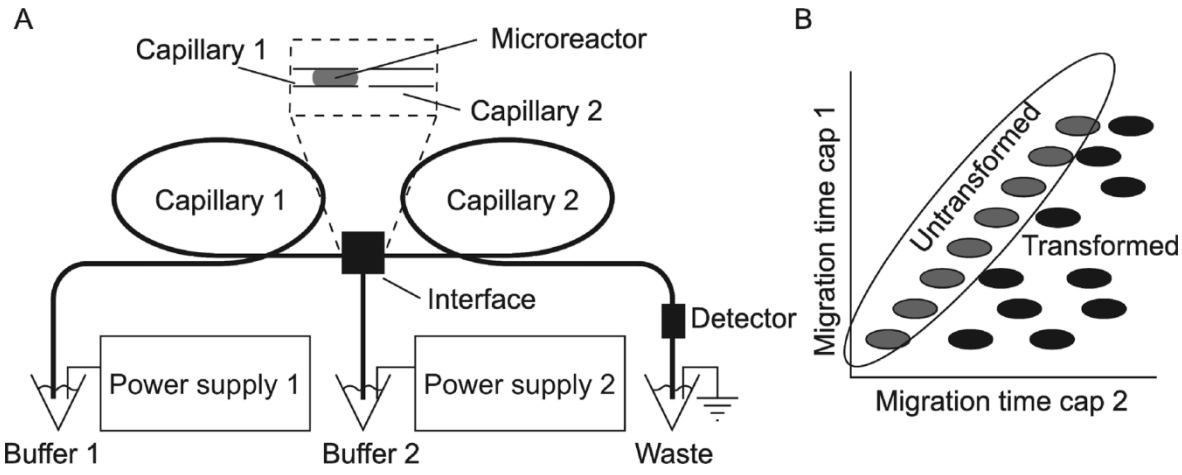


Obrázek 5: Elektroforegram peptidů obsahujících threonin. Píky: a) KRTIRR, b) KRTpIRR, c) N-FMOC-Arg-OH [29]

Výhodnou vlastností těchto analýz je, že migrační pořadí separovaných složek je předvídatelné. Vnitřní standard N-FMOC-O-dimethylfosfo-L-tyrosin obsahuje ve své molekule jednu karboxylovou skupinu. Nefosforylovaný peptid obsahující tyrosin (YEEI) má ve své molekule dvě karboxylové skupiny ze dvou glutaminových zbytků a jednu hydroxylovou skupinu z tyrosinového zbytku, z tohoto důvodu je intenzita negativní ionizace peptidu větší než u standardu při pH 11. Fosforylovaný peptid s tyrosinem obsahuje navíc jednu fosfátovou skupinu, i to přispívá k vyšší intenzitě negativní ionizace. Tyto rozdíly v intenzitě ionizace lze předvídat a migrace složek je následující: 1. vnitřní standard, 2. YEEI a 3. YpEEI, jak vyplývá z obrázku 4. Elektroforegramy peptidů obsahující serin a threonin jsou si podobné. Vnitřní standard N-FMOC-Arg-OH obsahuje ve své molekule jednu amino- skupinu. Peptidy obsahující nefosforylovaný serin (KRPSQRHGSKY) a threonin (KRTIRR) mají čtyři amino skupiny přispívající k pozitivní ionizaci v molekule. Pozitivní ionizace ve struktuře peptidů podporuje elektroforetickou migraci, a proto se tyto peptidy pohybují rychleji než standard [29].

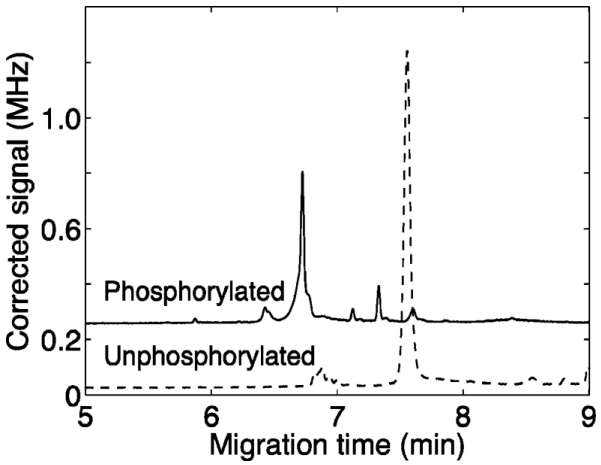
Během posledních 50. let došlo k vyvinutí mnoha dvourozměrných (dvoudimenzionálních) metod pro testování funkčních skupin ve složitých směsích analytů. Jednou z technik je na enzymu založená diagonální kapilární elektroforéza, kde se uplatňují stejné separační režimy v obou dimenzích (rozměrech). Při absenci úpravy analytů mezi jednotlivými separačními dimenzemi budou mít stejné migrační časy a vytvoří body (skvrny), které v grafu mají tvar diagonály. Pokud dojde k úpravě (reakce,

enzymatická modifikace) mezi separačními dimenzemi, dojde i ke změně migračního času a vytvoří se body, které jsou mimo diagonálu (obr. 7b) [30].



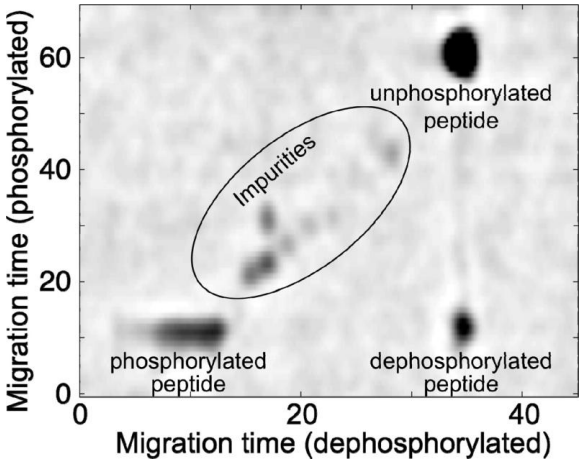
Obrázek 6: Enzymatický diagonální kapilární elektroforetický systém. A – dvoudimenzionální kapilární elektroforéza s identickými separačními módy s využitím mikroreaktoru na konci první kapiláry. B – Dvourozměrný graf znázorňující neupravené a upravené složky [30]

Jedno-dimenzionální separace byla provedena v kapiláře s vnitřním průměrem 50 μm a délce 50 cm a na elektrody bylo vloženo napětí -20 kV. Jako pracovní elektrolyt byl použit 10 mM hydrogenuhličitan amonný o pH = 8. Diagonální kapilární elektroforetický systém byl tvořen dvěma kapilárami o délce 25 cm s vnitřním průměrem 50 μm a vzdálenost mezi konci obou kapilár činila 50 μm. Stejně jako u jedno-dimenzionální separace byl použit 10 mM hydrogenuhličitan amonný o pH = 8 jako pracovní elektrolyt. Vnitřní povrch separačních kapilár byl dynamicky modifikován pomocí směsi UltraTrol™. Jako enzym byla použita alkalické fosfatáza, která byla kovalentně imobilizována na supermagnetických mikročásticích. V experimentu byly použity dva vzorky. Prvním byl monofosfopeptidový standard odvozený od β-kaseinu a druhým byl vzorek enzymaticky štěpeného α-kaseinu. Obrázek 8 pak ukazuje elektroforegram fosfopeptidového standardu a jeho nefosforylované formy. U obou forem je velký rozdíl v mobilitě, což je způsobeno jejich rozdílnými náboji.



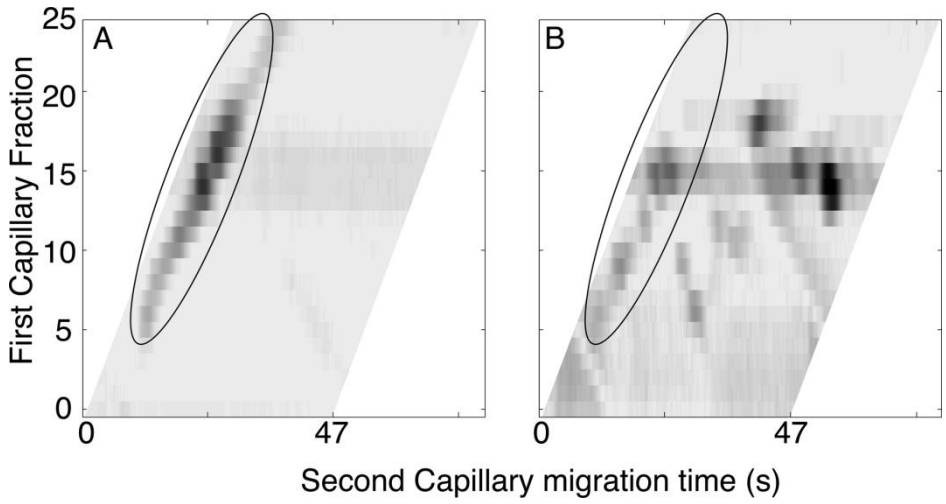
Obrázek 7: Elektroforetická analýza fosforylovaného peptidu a jeho nefosforylované formy [30]

Směs fosforylovaného a nefosforylovaného peptidu byla analyzována pomocí diagonální CE (obr. 9). Poměrně nízká aktivita mikroreaktoru neumožnila úplnou defosforylaci peptidu. Dvoudimenzionální elektroforegram ukazuje řadu bodů na diagonále a jednu složku mimo diagonálu. Toto místo je generováno fosfopeptidem, který byl defosforylován a má totožnou mobilitu s fosforylovaným peptidem v první dimenzi, protože je od něj odvozen. Ve druhé dimenzi má stejnou mobilitu jako nefosforylovaný peptid, protože je totožný s peptidem opouštějícím reaktor. Malé množství defosforylovaného peptidu vyluhovaného z reaktoru může způsobit stopu nacházející se mezi fosforylovaným a nefosforylovaným peptidem. Porovnáním separačních časů dojdeme k závěru, že dvoudimenzionální separace podstatně zkrátila čas separace.



Obrázek 8: Rozdíl v elektroforetických mobilitách fosforylovaného a nefosforylovaného peptidu s nízkou aktivitou reaktoru [30]

Obrázek 10 znázorňuje diagonální kapilární elektroforetickou analýzu složeného vzorku enzymaticky štěpeného α-kaseinu. V prvním případě, kdy nebyl použit mikroreaktor, se elektroforegram se skládá z bodů v diagonále. Ve druhém případě mikroreaktor použit byl a body jsou mimo diagonálu, což naznačuje, že došlo k defosforylaci. V tomto experimentu byl použit mikroreaktor s vysokou aktivitou. Několik peptidů v (digest) obsahovalo více fosforylovaných míst. Částečně defosforované peptidy by v grafu vytvořily horizontální body. Tyto body nebyly zaznamenány, takže došlo k úplné defosforylaci. V této analýze byl identifikován soubor osmi rozlišitelných bodů a použita ne-lineární regrese.



Obrázek 9: Rozdílné mobility analytů z enzymaticky štěpeného α-kaseinu s vysokou aktivitou reaktoru. A – bez použití reaktoru, B – za použití reaktoreu [30]

V tomto experimentu byl použit mikroreaktor obsahující imobilizovanou alkalickou fosfatázu, který byl umístěn na distálním konci první kapiláry. Mikroreaktor odstraňoval z frakce fosfátové skupiny během separační doby předešlé frakce. Jak již bylo naznačeno, nefosforylované peptidy vytvářely v elektroforegramu body ve tvaru diagonály, zatímco peptidy, které byly defosforylovány vytvářely body mimo diagonálu. Použitá metoda poskytovala mnohem rychlejší separaci než dvourozměrná HPLC, papírová chromatografie nebo dvoudimenzionální gelová elektroforéza [30].

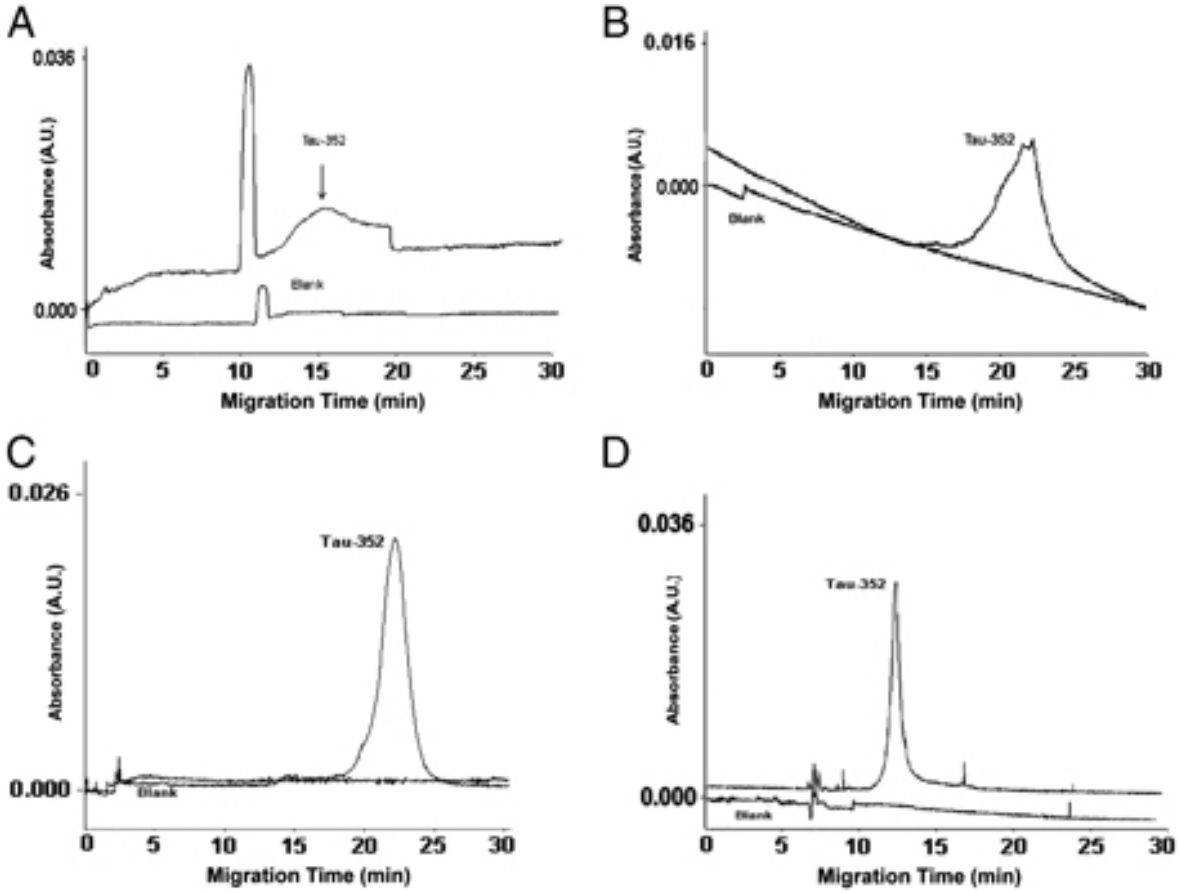
Alzheimerova choroba je jedno z nejčastějších a nejvíce prozkoumaných neurodegenerativních onemocnění, které je spojeno s poruchami Tau (τ) proteinu. Další onemocnění spojené s patologií Tau proteinu je Pickova choroba [31].

Tau protein je fosfoprotein, je to hlavní neuronální mikrotubulární protein. U lidí je gen Tau proteinu lokalizován na dlouhém raménku 17 chromozomu (17q21) a obsahuje celkem 16 exonů. Alternativní sestřih tří určitých exonů produkuje celkem šest izoforem Tau proteinu. Každá z izoforem má své fyziologické funkce a vzájemně se od sebe liší biologickou aktivitou. Hlavní známou biologickou funkcí Tau proteinu je stimulovat stabilizovat mikrotubulární komplex složený z tubulárních podjednotek. Fosforylace Tau proteinu reguluje činnost jeho vazby na mikrotubuly a stimulaci jejich komplexu, určitá úroveň fosforylace je tedy nutná pro optimální funkci Tau proteinu. Hyperfosforylací, zhruba 3x – 4x vyšší úrovní fosforylace, ztrácí Tau protein svoji biologickou aktivitu. Hyperfosforylací je všech šest izoforem Tau proteinu agregováno a spárováno do helikálních filament a vytváří se neurofibrilární síť. Tvorba neurofibrilární sítě je charakteristické poškození mozku při Alzheimerově chorobě [32].

Ve studii [30] byly vyvinuty podmínky pro CZE separaci různých izoforem Tau proteinu a pro separaci fosforylovaných a nefosforylovaných Tau-peptidů. Tato studie kladla značné nároky na podmínky pro separaci, protože pět ze šesti izoforem Tau proteinu má hodnotu pI nad 8,2 (tabulka 1) a dochází k interakcím izorforem s kapilární stěnou. Metoda byla použita k separaci směsí dvou bílkovin nefosforylované formy tau proteinu a pro separaci in vitro fosforylovaného Tau-352 z příslušné nefosforylované formy.

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické parametry izoforem Tau proteinu [33]

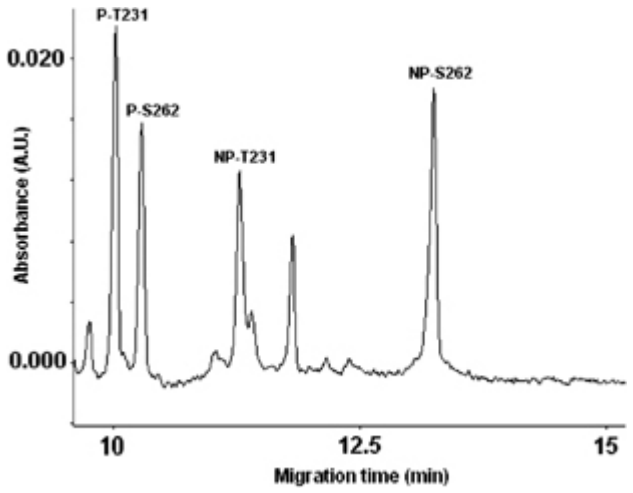
Protein	Zkratka	Číslo aminokyseliny	Molekulová hmotnost (*10^3)	pI
Izoforma 1	Tau-352	352	36,6	9,4
Izoforma 2	Tau-381	381	39,6	8,6
Izoforma 3	Tau-383	383	39,9	9,5
Izoforma 4	Tau-410	410	42,5	6,9
Izoforma 5	Tau-412	412	42,9	9,0
Izoforma 6	Tau-441	441	45,7	8,3



Obrázek 10: CZE analýza izoformy Tau-352 pomocí A – nemodifikované křemenné kapiláry, B – kapiláry pokryté polyakrykamidem, C – kapiláry pokryté polyethylenoxidem, D – kapiláry pokryté polybrenem [33]

Pro minimalizaci kapilárních interakcí s proteiny byly vnitřní povrchy kapilár různě modifikovány. První experiment byl proveden s nemodifikovanou křemennou kapilárou za podmínek, které měly zamezit adsorpci. Mezi různými zásaditými pufry, které byly studovány (boritan sodný, CAPS pufr, CHES pufr o pH v rozmezí od 8,8 do 10,5 a s iontovou silou od 20 mM do 100 mM), se ukázal jako nejlepší 70 mM CHES pufr o pH 10. Na obrázku č. 11a je ale pozorován široký pík, což poukazuje na silnou interakci kapilární stěny a Tau proteinu. Proto byly dále studovány pufry kyselé (fosfátový, octanový a mravenčanový) o pH v rozmezí od 2,0 do 4,5 s iontovou silou od 20 mM do 100 mM, kdy poté nebyl zmiňovaný pík detekován, což ukazuje na nevratnou adsorpci Tau proteinu do kapiláry. Jako první modifikace vnitřního povrchu kapiláry pro analýzu Tau-352bylo použito pokrytí polyakrylamidem, který byl s kapilárou kovalentně spojen polymerní vrstvou. Byly testovány i různé pracovní elektrolyty (tricin, fosfát, mravenčan) o pH v rozmezí od 3 do 8. Za těchto podmínek nebyl zaznamenán EOF, došlo tedy

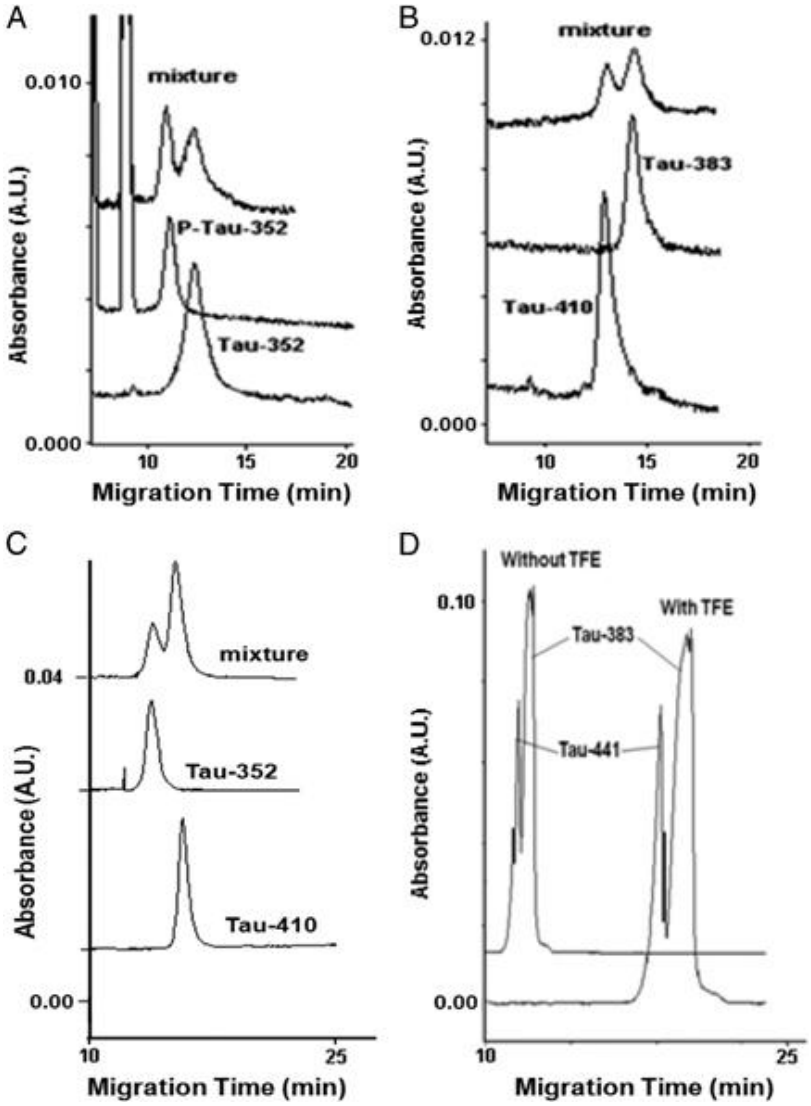
k efektivnímu zastínění silanolových skupin v kapilární stěně. Přesto nebyl zmiňovaný pík zaznamenán. Účinnost separace se zlepšila při použití fosforečnanu sodného o pH 3 jako pracovního elektrolytu (obr. 11b). Delší doba analýzy a ne příliš dobrá účinnost ale vedla k rozhodnutí, že polyakrylamid jako modifikátor povrchu kapiláry není vhodný pro tuto analýzu. Dalším testovaným modifikátorem byl polyethylenoxid, který byl naadsorbován na kapilární stěnu pomocí slabých interakcí. Polyethylenová vrstva v kapiláře byla použita pro analýzu Tau-352 a Tau-441 s různými pufry o pH v rozmezí od 3 do 8. EOF byl asi 5x nižší než při použití nemodifikované kapiláry. Symetrický pík dvou izoforem se objevil při použití fosfátového pufru o pH 3 (obr. 11c). Přídavek SDS do elektrolytu sice zlepšil analýzu Tau-352, nicméně pro Tau-441 přítomnost povrchově aktivní látky vyvolala prodloužení doby analýzy na 40 minut a nízkou reprodukovatelnost jeho stanovení. Jako poslední modifikátor byl testován polybren. Jedná se o kvartérní amin, který velmi silně interaguje se silanolovými skupinami kapilární stěny a eliminuje tak EOF. Tato látka byla použita pro analýzu Tau-352 a Tau-441 s pufy o pH v rozmezí od 3 do 10 (obr. 11d). Bylo zjištěno, že nejúčinnější je fosfátový pufr o pH 3. Fosfáty totiž mohou reagovat s proteiny a stabilizovat tak jejich terciární struktury, ale také mohou zastínit povrch kapilární stěny a tím eliminovat adsorpci proteinů na povrch. Použitá polymerní vrstva způsobila kratší čas separace a dobrou reprodukovatelnost stanovení. Následně byly tímto způsobem analyzovány i další izoformy jako Tau-381, Tau-383, Tau-410 a Tau-412. Každá izoforma byla detekována v čase kratším než 20 minut.



Obrázek 11: Elektroforetická separace dvou párů Tau peptidů – nefosforylovaného a fosforylovaného threoninu 231 a serinu 262 [33]

Nakonec byla vyvinutá metoda použita pro separaci směsi dvou fosforylovaných Tau peptidů, které by mohly mít význam při detekci abnormálních fosforylacích (P-T231, P-S262) a jejich nefosforylovaných analogů (NP-T231, NP-S262). Jak je patrné z obrázku 12, došlo k úplnému oddělení peptidů a doba analýzy byla kratší než 14 minut.

K vyhodnocení rozlišovací schopnosti metody fosforylovaných Tau proteinů a jejich nefosforylované formy posloužil *in vitro* připravený Tau-352. Z obrázku 13 je patrné, že separace proběhla během 15 minut s přijatelným rozlišením. Poté byla testována směs různých izoforem fosforovaných a nefosforylovaných Tau proteinů. K současnému rozddělení všech šesti izoforem nedošlo, přijatelné rozlišení poskytla separace směsí dvou izoforem (obr. 13a). Pro zlepšení separace bylo do pracovního elektrolytu přidáno komplexotvorné činidlo trifluorethanol. Přidání činidla mělo dva hlavní účinky. Prvním účinkem byla modifikace viskozity a relativní permitivity nosného elektrolytu, kdy došlo ke změně zeta potenciálu a k obrácení EOF. Druhý jevem byla změna disociační konstanty aminokyselin v proteinovém řetězci a změna jejich rozpustnosti v důsledku použití organické látky. Dále byl zkoumán vliv alkoholu (methanolu, ethanolu a TFE) na rozlišení Tau-441 a Tau-383. Přídavkem methanolu a ehtanolu v koncentracích od 5 do 20 % se zvýšily migrační časy obou izoforem v důsledku snížení EOF, ale tento přídavek neměl žádný vliv na rozlišení složek. Oproti tomu přídavek 10% TFE měl za následek zvýšení migračních časů a zlepšení rozlišení obou izoforem (obr. 13d).

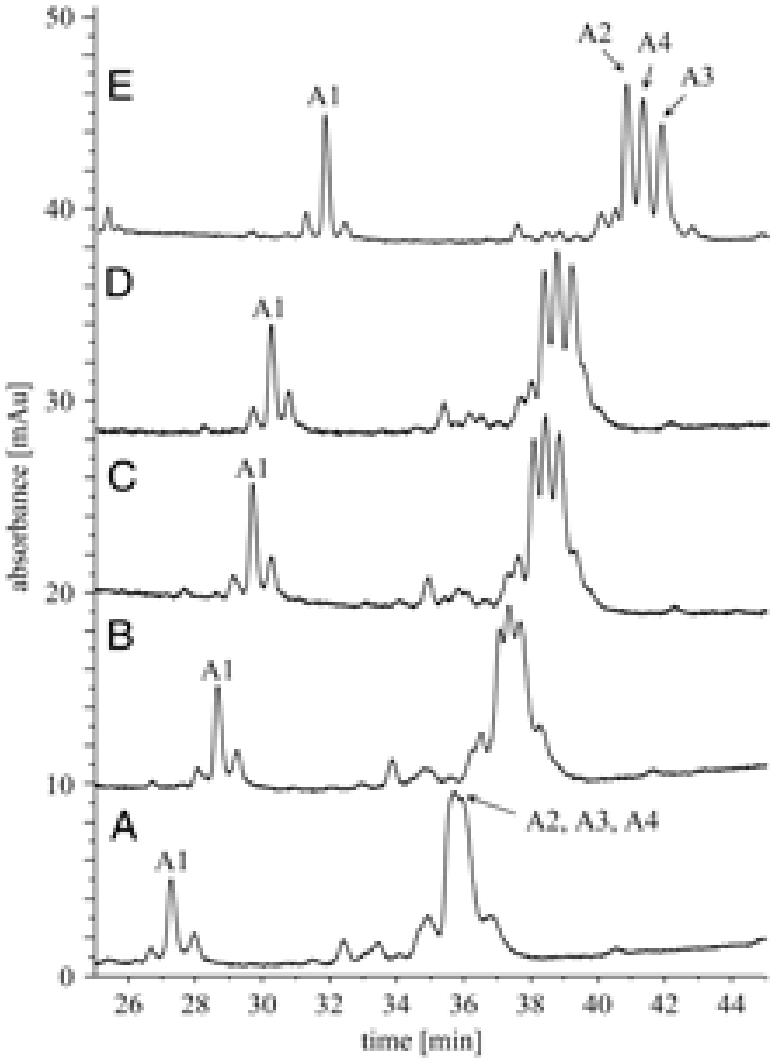


Obrázek 12: Separace fosforylovaných a nefosforylovaných Tau proteinů pomocí kapiláry pokryté polybrenem. A – P-Tau-352 a NP-Tau-352, B – Tau-410 a Tau-383 NP-izoformy, C – Tau-410 a Tau-352 NP-izoformy, D – Tau-441 a Tau-383 NP-izoformy bez a s TFE [33]

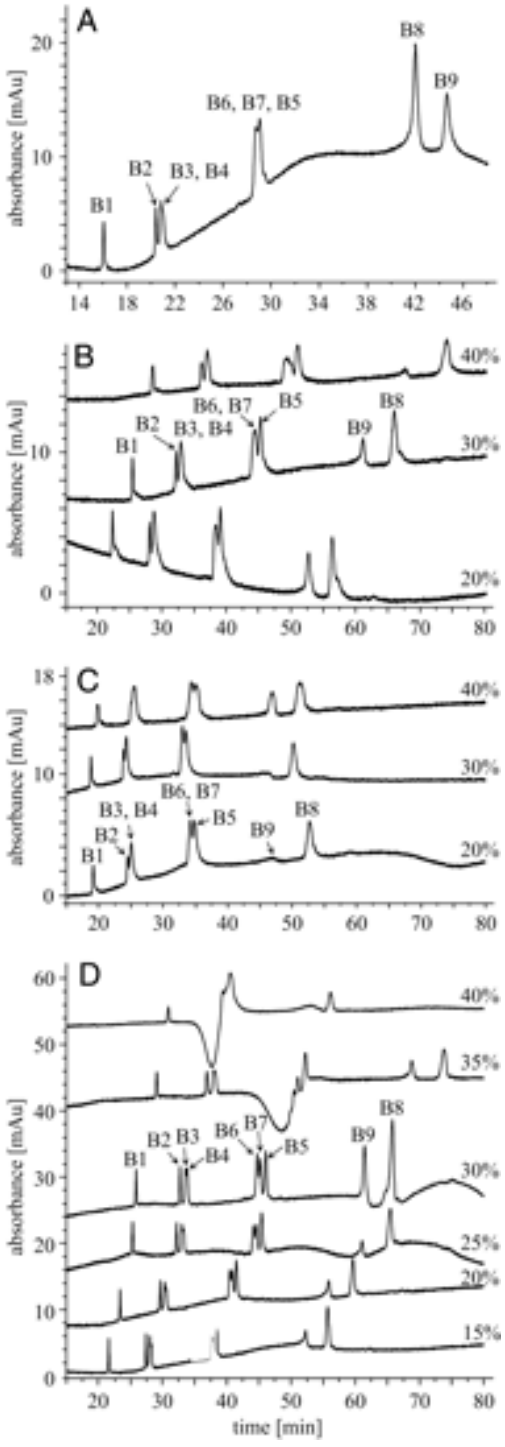
Vyvinutá metoda může být užitečná pro vývoj nových prostředků na podporu diagnostiky neurodegenerativních onemocnění. V současné době není citlivost detekce této metody dostačující pro měření přímo z biologického vzorku, a proto bude předmětem dalších zkoumání studium nových přístupů k označování Tau proteinů fluorescenční látkou [33].

Muetzelburg a Hoffmann [34] vyvinuli systém pro separaci dvojnásobně fosforylovaných sekvencí peptidů. Takto byli schopni studovat aktivitu protein-kináz a protein-fosfatáz v každém místě fosforylace a vzniklé produkty separovat a kvantifikovat pomocí CZE ve mravenčanovém pufru. V této studii jsou sledovány dvě skupiny peptidů,

které odpovídají Tau-226-240 a Tau-386-406, které mohou nést až tři fosforylované skupiny serinu a threoninu. Separační podmínky navržené Gamblem a kol. [35] byly dále optimalizovány zvýšením koncentrace kyseliny mravenčí v pracovním elektrolytu z 5 na 15%. Migrační časy všech izoforem se zvýšily o 2 minuty a to díky eliminaci EOF. Separační účinnost se zvýšila pro všechny tři monofosforylované peptidy (obr. 14e).



Obrázek 13: Vliv různých koncentrací kyseliny mravenčí na separaci peptidů Tau-386-406 obsahujících nefosforylovaný peptid (A1) a tři peptidy fosforylované na pozicicích 15 (A2), 18 (A3) a 19 (A4). Koncentrace kyseliny mravenčí byly v rozmezí od 5 do 15%, odpovídající A) 1,30, B) 1,95, C) 2,60, D) 3,20 a E) 3,95 mol/l kyseliny mravenčí [34]



Obrázek 14: Elektroforegram skupiny peptidů Tau-226-240. A) kyselina mravenčí, B) ethanol, C) methanol, D) TFE v různých koncentracích. B1 – nefosforylovaný peptid, zbývající peptidy jsou fosforylovány na pozicích 6 (B2), 10 (B3) a 12 (B4). Dvojnásobně fosofrylované peptidy na pozicích 6 a 12 (B5), 10 a 12 (B6) nebo 12 a 13 (B7) a trojnásobně fosforylované peptidy na pozicích 6, 12 a 13 (B8) nebo 10, 12 a 13 (B9) [34]

V podmínkách nastavených pro optimalizaci Tau-386-406 nedošlo k oddělení fosfopeptidových izoforem Tau-226-240 (obr. 15a). Tato směs devíti peptidů byla rozdělena pouze částečně, a to se zvyšujícím se počtem fosforylovaných skupin. Nefosforylovaný peptid byl detekován po 15 minutách separace a o pět minut později se objevil monofosforylovaný peptid ve dvou částečně rozlišených vrcholech. Tři dvojnásobně fosforylované peptidy se objevily po dalších osmi minutách v širokém píku. Pouze dva trojnásobně fosforylované byly zcela rozděleny po 41 a 44 minutách. Obrázky č. 15b a c ukazují, že po přídavku methanolu nebo ethanolu do mravenčanového pufru o koncentracích 20 až 40% nedošlo ke zlepšení separace. Dále byl testován přídavek TFE do pracovního elektrolytu. Při použití 15% TFE se separace viditelně zlepšila (obr. 15d) [34].

Využití TFE při separaci je výhodné, protože se jedná o organické rozpouštědlo, které stabilizuje proteinové konformace. Snižuje procházející proud a tím i Joulovo teplo v kapiláře, čímž dochází ke zlepšení účinnosti separace. Navíc může amidové skupině proteinu zabránit tvořit vodíkové můstky s ostatními makromolekulami, a tak zabránit interakcím protein-protein. Také může podpořit rozpustnost bílkovin [33, 34].

6 Závěr

Proteiny představují velmi významnou skupinu biopolymerů, které plní regulační funkce mnoha životně důležitých procesů v živých organizmech. Proteiny mohou podléhat různým posttranslačním modifikacím, z nichž nejčastěji se vyskytujícími jsou fosforylace, které hrají významnou roli v mnoha dějích v buňce. Fosforylované proteiny lze enzymatickým nebo chemickým způsobem štěpit na fosfopeptidy, které lze následně separovat a analyzovat chromatografickými a elektromigračními technikami.

Techniky kapilární elektroforézy, zejména kapilární zónová elektroforéza (CZE), představují v současné době významné instrumentální analytické techniky pro separace látek v kapalné fázi. Díky jednoduché instrumentaci, vysoké separační účinnosti, rychlosti a reprodukovatelnosti analýz, velmi nízkým dávkovaným objemům analyzovaných vzorků, nízké spotřebě rozpouštědel a šetrnosti k životnímu prostředí se CZE zařadila mezi rutinně používané separační techniky.

Tato bakalářská práce shrnuje formou rešerše teoretické principy elektroforetické separace a jednotlivých technik kapilární elektroforézy a popisuje funkce proteinů v živých organizmech a význam proteinových fosforylací. Předložená práce dále poskytuje přehled doposud v literatuře publikovaných výsledků o využití kapilární elektroforézy pro separace fosforylovaných a defosforylovaných peptidů a pro analýzu vzorků obsahujících tau protein, jehož hyperfosforylace hraje významnou roli v patogenezi neurofibrilárních degenerací.

7 Použitá literatura

[1] PALFREY, S. M.. *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1999. ISBN 0-89603-639-1.

[2] GAÁL, O.; MEDGYESI, G. A.; VERECZKEY, L.. *Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1980. ISBN 963-05-1840-6.

[3] CHANKVETADZE, B. *Capillary Elcetrophoresis in Chiral Analysis*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1997. ISBN 0-471-97415-3.

[4] ŠTULÍK, K. A KOLEKTIV. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-08252-9.

[5] ALTRIA, K. D. *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principes, Operation and Applications*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1996. ISBN 0-89603-315-5.

[6] LI, S. F. Y. *Capillary Electrophoresis*: *Principles, Practise and Applications*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1992. ISBN 0-444-89433-0.

[7] HEIGER, D. *High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction*. Waldbronn: Agilent Technologies, 2000. PN 5968-9963E.

[8] FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. *Capillary Electrophoresis for Food Analysis*: *Method Development*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN 0-85404-492-2.

[9] ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. *Chemical Analysis*: *Modern Instrumentation Methods and Techniques*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2007. ISBN 978-0-470-85902-5.

[10] SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. *Hyphenated Techniques in Speciation Analysis*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. ISBN 0-85404-545-7.

[11] BARTLE, K. D.; MYERS, P.. *Capillary Electrochromatography*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001. ISBN 0-85404-530-9.

[12] SVEC, F.; DEYL, Z. *Capillary Electrochromatography*. Amsterdam: Elsevier Science B. V, 2001. ISBN 0-444-50432-X.

[13] RATHORE, A. S.; GUTTMAN; A. *Electrokinetic Phenomena*: *Principles and Applications in Analytical Chemistry and Microchip Technology*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 2004. ISBN 0-8247-4306-7.

[14] WESTON, A. *HPLC and CE: Principles and Practice*. San Diego, CA: Academic Press Inc., 1997. ISBN 0-12-136640-5.

[15] HOUSTON, M. E. *Biochemistry Primer for Exercise Science*. Champaign, IL: Human Kinetics, 2006. ISBN 978-0-7360-5612-0.

[16] DEBAJYOTI, D. *Biochemistry*. Kolkata: Academic Publishers, 2010. ISBN 978-93-80599-17-5.

[17] WALSH, G. *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2002. ISBN 0-471-89907-0.

[18] DOONAN, S. *Peptides and Proteins*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2002. ISBN 0-85404-692-5.

[19] TREHAN, K. *Biochemistry*. New Delhi: New International Ltd., 1990. ISBN 81-224-0248-8.

[20] RASTOGI, S. C. *Biochemistry*. New Delhi: Tata McGraw Hill Publishing Co. Ltd., 2003. ISBN 0-07-052795-4.

[21] SOUKUPOVÁ, M.; SOUKUP, F. *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky II*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-7184-581-7.

[22] WALSH, C. T. *Posttranslational Modification of Proteins*: *Expanding Nature´s Inventory*. Greenwood Village, CO: Roberts and Co. Publishers, 2006. ISBN 0-9747077-3-2.

[23] KRAUSS, G. *Biochemistry of Signal Transduction and Ragulation*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2008. ISBN 978-3-527-31397-6.

[24] CIESLA, J.; FRACZYK, T.; RODE, W. Phosphorylation of Basic Amino Acid Residues in Proteins: Important but Easily Missed. *Acta Biochimica Polonica*, 2011, Vol. 58, p. 137-147.

[25] MARKS, F. *Protein Phosphorylation*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 1996. ISBN 3-527-29241-1.

[26] PAGANO, M. A.; TIBALDI, E.; GRINGERI, E.; BRUNATI, A. M. Tyrosine Phosphorylation and Liver Regeneration: A Glance at Intracellular Transducers. *IUBMB Life*, 2012, Vol. 64, p. 27-35.

[27] HALADA, P. Metodické přístupy současné fosfoproteomové analýzy. *Chemické listy*, 2005, roč. 99, str. 922-929.

[28] D´AMBROSIO, C.; SALZANO, A. M.; ARENA, S.; RENZONE, G.; SCALONI, A. Analytical Methologies for the Detection and Structural Characterization of Phosphorylated Proteins. *Journal of Chromatography B*, 2007, Vol. 849, p. 163-180.

[29] YOO, Y. S.; HAN, Y. S.; SUH, M. J.; PARK, J. Analysis of Phosphopeptides by Capillary Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Chromatrography A*, 1997, Vol. 763, p. 285-293.

[30] WOJCIK, R.; VANNATTA; M.; DOVICHI, N. J. Automated Enzyme-Based Diagonal Capillary Electrophoresis: Application to Phosphopeptide Characterization. *Analytical Chemistry*, 2010, Vol. 82, p. 1564-1567.

[31] DALY, N. L.; HOFFMANN, R.; OTVOS, L; CRAIK, D. J. Role of Phosphorylation in the Conformation of Tau Peptides Implicated in Alzheimer´s Disease. *Biochemistry*, 2000, Vol. 39, p. 9039-9046.

[32] GONG, C. X.; LIU, F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Post-Translational Modifications of Tau Protein in Alzheimer´s Disease. *Journal of Neural Transmission*, 2005, Vol. 112, p. 813-838.

[33] BOHOYO, D.; LE POTIER, I.; RIVIERE, C.; KLAFKI, H.; WILTFANG, J.; TAVERNA, M. A Quantitative CE Method to Analyse Tau Protein Isoforms Using Coated Fused Silica Capillaries. *Journal of Separation Science*, 2010, Vol. 33, p. 1090-1098.

[34] MUETZELBURG, M. V.; HOFFMANN, R. Separation of Multiphosphorylated Peptide Isomers by CZE. *Electrophoresis*, 2008, Vol. 29, p. 4381-4385.

[35] GAMBLE, T. N.; RAMACHANDRAN, C.; BATEMAN, K. P. Phosphopeptide Isomer Separation Using Capillary Zone Electrophoresis for the Study of Protein Kinases and Phosphatases. *Analytical Chemistry*, 1999, Vol. 71, p. 3469-3476.

Obr. 2: Bioscience. *Bioscience* [online]. 2009 [cit. 2012-02-17]. Dostupné z: http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3500/fulltext.asp?bframe=figures.htm&doi=yes