

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Metody studia struktury proteinů

Kateřina Sýsová

Bakalářská práce

2017

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Methods for studying of protein structure

Kateřina Sýsová

Bachelor's thesis

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Sýsová**
Osobní číslo: **C13392**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Metody studia struktury proteinů**
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 :

Vypracovat teoretickou rešerši týkající se metod pro studium struktury proteinů. V první části se zaměřit na obecnou definici pojmu proteomika, genomika a zároveň stručně popsat proteiny. Druhou část věnovat klasifikaci a popisu jednotlivých metod pro studium struktury proteinů. Zaměřit se hlavně na separační metody, hmotnostní spektrometrii, peptidové mapování, rentgenovou krystalografii. Věnovat pozornost novým trendům v této oblasti, např. Shot-gun, nové kvantitativní metody. V poslední části se věnovat využití proteomiky v medicíně a její využití v současnosti.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Katarína Vorčáková

Katedra biologických a biochemických věd


Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2017.

Kateřina Sýsová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Kataríně Vorčákové, Ph.D. za její odborné vedení při psaní, za ochotu kdykoliv pomoc, trpělivost a za čas, který věnovala čtení a kontrole této práce.

ANOTACE

Bakalářská práce se zaměřuje na proteiny, jejich strukturu a funkci. Dále je zde popsána struktura aminokyselin, vznik peptidové vazby, vznik samotných peptidů a jejich funkce.

V další části se věnuje popisu jednotlivých metod studia struktury proteinů. Nejdříve z historického hlediska a poté se zaměřuje hlavně na separační metody, tedy chromatografii a elektroforézu, hmotnostní spektrometrii, 2-D elektroforézu, peptidové mapování, rentgenovou krystalografii a NMR spektroskopii. Velká pozornost je vztažena na nové trendy v této oblasti jako je shotgun, LC (Liquid Chromatography – kapalinová chromatografie) peptidů, kvantitativní metody a label free. Nakonec se zabývá důležitým využitím proteomiky v medicíně.

KLÍČOVÁ SLOVA

Proteomika; separační metody; hmotnostní spektrometrie; peptidové mapování; rentgenová krystalografie; shotgun.

TITLE

Methods for studying of protein structure

ANNOTATION

The thesis is focused on proteins, their structure and function. Further, it described the structure of amino acids, formation of peptide bond and peptides, and their functions.

The next section deals with the description of different methods to study of the structure of proteins. First, from a historical point of view, and then it is focused mainly on separation methods, namely chromatography, and electrophoresis, mass spectrometry, 2-D electrophoresis, peptide mapping, X-ray crystallography and NMR spectroscopy. Much attention is related to the new trends in this area as the shotgun, LC (Liquid Chromatography) peptides, quantitative method and label free. Finally, it discusses using proteomics important in medicine.

KEYWORDS

Proteomics; Separation methods; Mass Spectrometry; Peptide Mapping; X-ray crystallography; shotgun.

OBSAH

1	ÚVOD.....	13
2	Aminokyseliny.....	14
2.1	Struktura aminokyselin	14
2.2	Peptidová vazba	15
2.3	Peptidy.....	15
2.3.1	Vznik peptidů – peptidová vazba.....	15
2.3.2	Funkce peptidů.....	16
2.4	Proteiny	16
2.4.1	Struktura proteinů	16
2.4.2	Funkce proteinů v organismu	17
3	Proteomika.....	17
3.1	Historie.....	17
3.1.1	Elektroforéza.....	17
3.1.2	Chromatografie	18
3.1.3	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS)	19
3.1.4	Současnost	20
3.2	Proteom	21
3.3	Genomika	21
3.4	Oblasti působení proteomiky	22
4	Metody proteomiky.....	23
4.1	Separční metody	23
4.1.1	Chromatografie	23
4.1.2	Elektroforéza.....	27
4.2	Hmotnostní spektrometrie.....	30
4.2.1	Princip.....	30
4.2.2	Hmotnostní spektrometr	31

4.2.3	Tandemový hmotnostní spektrometr	33
4.3	Peptidové mapování	34
4.3.1	Štěpení proteinů	34
4.3.2	Separace peptidů po hydrolýze	35
4.3.3	Detekce peptidů	35
4.4	Rentgenová krystalografie	35
4.4.1	Postup a princip	36
4.4.2	Proteinová krystalografie	38
4.5	NMR spektroskopie	38
4.5.1	Interakce jaderného spinu s magnetickým polem.....	39
4.5.2	Konstrukce NMR spektrometru.....	39
4.5.3	Měření.....	40
4.5.4	Magnetické interakce jader.....	40
4.5.5	Protein data bank (PDB).....	40
4.6	2-D elektroforéza proteinů	41
4.6.1	Izoelektrická fokusace	42
4.6.2	SDS-PAGE elektroforéza	42
4.7	Proteomika v současnosti.....	43
4.7.1	Shotgun	43
4.7.2	LC peptidů	43
4.7.3	Kvantitativní metody	44
4.7.4	Label Free	48
4.8	Klinická proteomika.....	49
5	Proteomika v medicíně	50
5.1	Beta amyloid, tau protein	50
6	Závěr	52
7	Zdroje.....	53

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2-DE	dvojměrná elektroforéza (Two-Dimensional Electrophoresis)
AK	aminokyseliny
Ab-40	kratší izoforma beta-amyloidu končící valinem
Ab-42	delší izoforma beta-amyloidu končící na alaninu
APEX	absolutní proteinové vyjádření (Absolute Protein Expression)
AQUA	absolutní kvantitativní množství (Absolute Quantification of Abundance)
C	konstanta závislá na tvaru částic a tloušťce elektrické dvojvrstvy
CI	chemická ionizace (Chemical Ionization)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)
CW-NMR	po sobě jdoucí vlny/spektra nukleární magnetické rezonanční spektroskopie (Continuous-Wave Nuclear Magnetic Resonance)
E	intenzita elektrického pole
EI	ionizace elektronovým paprskem (Ionization Electric Beam)
emPAI	exponenciální index proteinového množství (Protein Abundance Index)
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
EuPA	evropská asociace proteomiky (European Proteomics Association)
FAB	ionizace rychlými atomy a ionty (Fast Atom Bombardment and Ions)
FI, FD	ionizace působením elektrostatického pole (Ionization Effect of an Electrostatic Field)
FID	volný indukční rozklad (Free Induction Decay)
FT	Fourierova transformace (Fourier Transform)
FT-NMR	nukleární magnetická rezonanční spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier Transform – Nuclear Magnetic Resonance)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HIV	virus lidské imunodeficiency (Human Immunodeficiency Virus)
<i>hkl</i>	Millerovy indexy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HUGO	organizace lidského genomu (Human Genome Organization)
HUPO	organizace lidského proteomu (Human Proteome Organization)
iCAT	izotopově kódovaná afinitní značka (Isotope-coded Affinity Tags)
ICR	ion-cyklotronová rezonance (Ion-Cyclotron Resonance)
IEF	izoelektrická fokusace (Isoelectric Focusing)
iTRAQ	izobarická značka pro relativní a absolutní kvantifikaci (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
MALDI	matricově-asistovaná laserová desorpční ionizace (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)

<i>n</i>	řád interference
NMR	nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Polyakrylamide Gel Electrophoresis)
PAI	index proteinového množství (Protein Abundance Index)
PD	desorpce plazmou (Plasma Desorption)
PDB	proteinová banka (Protein Data Bank)
pI	isoelektrický bod
PISS	pseudo-interní standardy (Pseudo-Internal Standards)
PMF	peptidové mapování (Peptide Mass Fingerprinting)
RP-HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography)
RTG	rentgenové záření
SDS	dodecylsulfát sodný (Sodium Dodecyl-Sulfate)
SILAC	izotopově stabilně značené aminokyseliny v buněčných kulturách (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
TOF	doba průletu (Time-of-Flight)
TOP3	tři tryptické peptidy (Three Tryptic Peptides)
TSI	ionizace termosprejem (Thermospray Ionization)

1 ÚVOD

Proteomika je vědní obor, který se zabývá hodnocením exprese genetické informace na úrovni proteinů. Také zkoumá jejich struktury a samotné interakce mezi nimi. Cílem proteomiky je identifikace všech bílkovin kódovaných lidským genomem a zároveň se snaží pochopit jejich funkci, strukturu a vytvořit tak 3-D mapu buňky (určit lokalizaci jednotlivých bílkovin) [1].

Proč se vlastně používá proteomika a ne genomika? Na základě sekvence DNA nebo mRNA nelze stanovit funkci proteinu. Nemůžeme popsat molekulární mechanismy jenom pomocí studia genomu. Musíme brát na vědomí existenci alternativní translace a špatnou korelaci hladin mRNA a skutečných hladin proteinů. Nakonec můžeme jednoduše odpovědět: nemůžeme použít genomiku, protože proteiny a nikoliv geny vytvářejí fenotyp [2].

Proteom je souhrn všech proteinů, které jsou kódovány a exprimovány přímo v buňce nebo viru. Na základě genetické informace genomu jsou proteiny syntetizovány. Rozdíl mezi genomem a proteomem je, že genom je stabilnější, a proto je stanovení proteomu složitější. Všechny proteiny v buňce se musí stanovit najednou [3].

Ke stanovení proteinů se používají metody založené na rozdělování směsí látek na základě rozdílných fází nebo rozdílných fyzikálních vlastnostech (chromatografie, elektroforéza), pomocí stanovení hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty (hmotnostní spektrometrie), analýzou prostorové struktury proteinů díky difrakci rentgenového záření na monokrystalech (rentgenová krystalografie) anebo nově pomocí nově se rozvíjejících se metod jako je sekvenování DNA (shotgun) a multidimenzionálních metod (LC - Liquid Chromatography peptidů) [1,2,3].

Velmi důležitým přínosem je samotná proteomika v oboru medicíny, kdy pomocí ní dochází ke stanovení biomarkerů nemocí a tím k včasným diagnózám a správné léčbě [4,5].

2 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AK) jsou základní stavební jednotky všech proteinů. Na tvorbě bílkovin se jich podílí dvacet a označují se jako kódující. Na základě své struktury se dělí na AK [6]:

- s postranním alifatickým řetězcem (glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin),
- s karboxylovou nebo amidovou skupinou na postranním řetězci – kyselé skupiny (kyselina asparagová, asparagin, kyselina glutamová, glutamin),
- s aminovou skupinou na postranním řetězci – bazické skupiny (arginin, lysin),
- s aromatickým jádrem nebo hydroxylovou skupinou na postranním řetězci (histidin, fenylalanin, serin, threonin, tyrosin, tryptofan),
- se sírou v postranním řetězci (methionin, cystein),
- na AK obsahující sekundární amin (prolin) [7].

Aminokyseliny, které si organismus syntetizuje sám, se nazývají neesenciální. Jejich syntéza probíhá například transaminací oxokyselin přijatých z potravin. Naopak ty, které musí být do organismu dodány v potravě a které si organismus neumí sám vyrobit, se označují jako esenciální. Jsou to především ty AK, které mají heterocyklický zbytek, aromatický nebo rozvětvený řetězec. Esenciálních aminokyselin je 10 a řadí se mezi ně valin, leucin, isoleucin, methionin, tryptofan, fenylalanin, threonin, lysin, arginin a histidin [6,7].

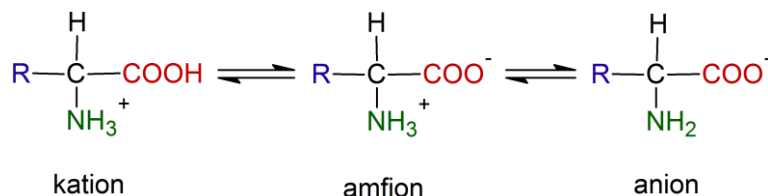
2.1 Struktura aminokyselin

Z chemického hlediska jsou AK substituční deriváty karboxylových kyselin. Obsahují karboxylovou (-COOH) a aminovou (-NH₂) skupinu, která leží na uhlíku vedle karboxylové. Podle této struktury se AK nazývají jako 2-aminokarboxylové kyseliny nebo také α -kyseliny [6,7,8].

Všechny AK, s výjimkou glycinu, mají chirální atom uhlíku, díky kterému jsou schopny otáčet rovinu polarizovaného světla, jsou tedy opticky aktivní. Stejně jako sacharidy se mohou vyskytovat ve dvou konfiguracích, které se označují jako L- a D-konfigurace. Všechny kódované aminokyseliny se v živých organismech vyskytují převážně ve své levotočivé konfiguraci [6,8].

Aminokyseliny mohou také obsahovat ve svých postranních řetězcích (R-) další karboxylové nebo aminové skupiny. Mohou být tedy rozděleny podle poměru celkového

počtu těchto skupin na kyselé, zásadité a neutrální. Protože se AK mohou chovat buď jako kyseliny nebo jako zásady, označují se také jako amfoterní sloučeniny [6,8].

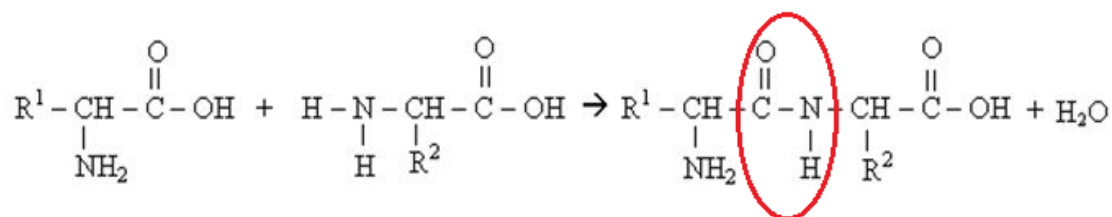


Obr. 1 Reakce vzniku amfiontu [6].

Z reakce na obrázku č. 1 vyplývá, že u AK dochází k vnitřní interakci mezi karboxylovou a aminovou skupinou za vzniku amfiontu, tzv. obojetného iontu. Reakce je specifická pro pH každé AK, které se označuje jako izoelektrický bod. AK se v tomto stavu chovají jako navenek elektricky neutrální [6,7].

2.2 Peptidová vazba

Nejdůležitější reakcí aminokyselin je vznik kovalentní peptidové vazby. Reakce probíhá mezi dvěma AK. Dochází k interakci mezi karboxylovou skupinou jedné AK a amino-skupinou druhé AK za vzniku vody (obrázek číslo 2) [6,8,9,10].



Obr. 2 Reakce popisující vznik kovalentní peptidové vazby (červeně vyznačená) [6].

2.3 Peptidy

2.3.1 Vznik peptidů – peptidová vazba

Peptidy vznikají kondenzací dvou a více aminokyselin za vzniku peptidové vazby. Podle aminokyselinových zbytků, z nichž jsou peptidy složeny, je dělíme na oligopeptidy

obsahující 10 AK a polypeptidy, které jsou tvořeny více jak 10 aminokyselinami. Polypeptidy, které mají vysokou molekulovou hmotnost, se nazývají bílkoviny [6,8,9].

2.3.2 Funkce peptidů

Pro regulaci fyziologických procesů v živých organismech jsou peptidy neustále syntetizovány. V organismu se peptidy vyskytují nejčastěji jako hormony a neuro-peptidy, které regulují většinu procesů v lidském těle jako například regenerace a růst buněk, regulace spánku, řízení imunitního systému, tvorba hormonů atd. Další funkcí je ovlivňování fyziologických faktorů, jako je nárůst svalové hmoty, výkonnost atd. Také mohou mít dobrý vliv na duševní faktory, jako jsou paměť, chování, koncentrace atd. [6,8,9].

2.4 Proteiny

Bílkoviny patří mezi základní stavební jednotky živé hmoty. Jsou to přírodní látky, které, jak již bylo řečeno, vznikají kondenzací aminokyselin za vzniku peptidické vazby [6,7].

2.4.1 Struktura proteinů

2.4.1.1 Primární struktura

Tato struktura je nejjednodušší a udává přesně strukturu bílkoviny a v ní pořadí jednotlivých AK. Pokud by bylo pořadí AK změněno, například zařazením nevhodné AK do polypeptidového řetězce, projeví se to fatálně pro daný organismus, protože primární struktura je přímým odrazem genetického kódu každého jedince [8,11,12].

2.4.1.2 Sekundární struktura

Sekundární struktura je obrazem geometrického uspořádání polypeptidového řetězce. Části bílkovin mají struktury buď skládaného listu (tzv. β -hřeben) nebo pravotočivé šroubovice (tzv. α -helix). Tyto vazby vznikají pomocí vodíkových vazeb, které působí mezi funkčními skupinami. Aminokyselinové zbytky se orientují nad a pod rovinu skládaného listu nebo vně šroubovice [8,11,12].

2.4.1.3 Terciární struktura

Tato struktura je dána sekundární strukturou, tedy uspořádáním skládaného listu nebo pravotočivé šroubovice do konečného uspořádání molekuly bílkoviny. Terciární struktura může být buď fibrilární (vlákno) nebo globulární (klubko). Na této struktuře se podílí iontové vazby, vodíkové vazby, disulfidické vazby nebo Van der Waalsovy síly [8,11,12].

2.4.1.4 Kvartérní struktura

Z této struktury vyplývá vzájemné prostorové uspořádání podjednotek bílkovin, které jsou tvořeny z více peptidických řetězců. Tyto podjednotky mohou snadno podléhat disociaci a zpětnému spojování. Reakce jsou vratné a rovnovážné. Síly, které zde působí, mají nekovalentní charakter. Pokud dojde k odumření organismu, jeho bílkoviny se začnou biologicky rozpadat, tzv. hnití bílkovin [8,11,12].

2.4.2 Funkce proteinů v organismu

Proteiny jsou důležitými látkami pro správnou funkci všech organismů. AK slouží jako zdroj dusíku, jenž je nepostradatelným biogenním prvkem. Bílkoviny mají tedy funkci stavební (jako skleroproteiny, např. kolagen), katalytickou (enzymy – biokatalyzátory), regulační (hormony, např. inzulin), obrannou (protilátky, např. imunoglobuliny), transportní (např. hemoglobin), zásobní (např. ovalbumin), pohybovou (např. myosin). Také se podílí na syntéze lipidové dvojvrstvy, nukleotidů a alkaloidů. Některé mohou patřit mezi toxiny (např. hadí jedy) [6,7,10].

Pro organismus jsou nepostradatelné, protože je využívá jako alternativní zdroj energie po sacharidech a lipidech, neboť jsou výchozími látkami pro jejich syntézu [6,7,10].

3 Proteomika

Proteomika představuje soubor metod, technik, přístupů a konceptů, které se zabývají kvalitativními a kvantitativními popisy a porovnáváním jednotlivých proteomů – kompletních sad bílkovin přítomných v daném okamžiku v buňce, nebo tkáni, zahrnující veškeré jejich modifikace, vzájemné interakce, lokalizace a metabolický obrat. Snaží se identifikovat všechny proteiny, jak jsou modifikovány, kdy a v jaké míře jsou exprimovány, kde se nacházejí a jak spolu interagují [1,2,3].

Hlavními pilíři proteomiky jsou elektroforéza, chromatografie a hmotnostní spektrometrie, které umožní separaci, identifikaci a kvantifikaci stovek nebo tisíců proteinů a peptidů v jediném experimentu [13].

3.1 Historie

3.1.1 Elektroforéza

V roce 1807 profesor Ferdinand Friedrich Reuss experimentoval se vzorky jílu a pomocí voltaova článku sestaveného z 92 provrtaných stříbrných rublů proložených zinkovými

plíšky popsal elektroendoosmotický tok (přesun molekul vody v elektrickém poli k negativnímu pólu) a také přesun částic jílu v elektrickém poli (elektroforéza). Položil tak základy elektroforetické separace [14].

Zásadní zvrát ale přišel o něco déle. Ve své práci popsal Arne Tiselio (ve třicátých letech dvacátého století) separaci sérových proteinů v roztoku mezi elektrodami a opticky sledoval pohyblivé rozhraní jednotlivých molekul. V roce 1948 dostal za svůj přínos Nobelovu cenu za chemii. Na jeho poznatky navázal Linus Pauling, který v roce 1949 popsal odlišnou elektroforetickou migraci hemoglobinu u pacientů se srpkovitou anémií a zdravých jedinců. Tiselioho elektroforéza měla ale svá omezení, hlavně negativní vliv gravitace na separaci nabitých částic ve volném roztoku. Problém byl vyřešen přidáním vodivého pufru do pevného média. Jako podpůrná média byl používán papír (papírová elektroforéza) a agarový gel (agarová elektroforéza) [14].

Šedesátá léta přinesla pokroky, především isoelektrickou fokusaci a polyakrylamidové gely. Isoelektrická fokusace dělí bílkoviny na základě jejich náboje, přesněji na základě jejich isoelektrického bodu (pI). Naopak polyakrylamidová gelová elektroforéza je dělí na základě jejich molekulové hmotnosti [14].

V roce 1975 se povedlo několika týmům tyto dvě metody zkombinovat do dvojrozměrné separace. Nejlépe se to podařilo vědci jménem Patrick O'Farrell, který se považuje za otce dvojrozměrné elektroforézy (2-DE) a která je založená na pI a molekulové hmotnosti. Rozdělil tehdy na jediném gelu 1 100 proteinových skvrn lyzátu *E. Coli* [1,14].

Na základě dvojrozměrné elektroforézy byly na počátku devadesátých let položeny základy proteomiky a byly provedeny první pokusy o zmapování proteomu [1,14].

3.1.2 Chromatografie

V roce 1907 položil základy chromatografie ruský botanik Michail Cvet, který prezentoval své poznatky o rozdělování roztoku rostlinných pigmentů na křídovém adsorbentu. Na základě toho, že pracoval s barevnými chlorofyly a karotenoidy, popsal experiment barvopisem – chromatografie [15].

Na jeho práci později navázali Richard Kuhna, Edgar Lederer. Průlomová byla přeměna Cvetova modelu ve čtyřicátých letech Archerem Martinem a Richardem Syngem, kteří použili silikagel jako stacionární fázi a metodu označili jako rozdělovací chromatografie. Jejich metoda již byla použitelná pro rozdělení aminokyselin a peptidů [15].

V šedesátých letech se objevily sférické částice stacionární fáze a chemická modifikace jejich povrchu vedla k odlišení kapalinových chromatografií, které byly nutné provádět za vysokých tlaků. V roce 1966 byl zaveden termín HPLC (High Performance Liquid Chromatography, tzv. vysokoúčinná kapalinová chromatografie) Csabou Horváthem. V současnosti patří vysokotlaká kapalinová chromatografie, která se provádí na kolonách s mikrolitrovými až nanolitrovými průtoky, k hlavním metodám separace peptidů v proteomice [15].

Tato metoda slouží spíše k separaci peptidů, ale lze ji využít i k dělení inaktivních proteinů podle velikosti metodou gelové filtrace nebo při nativních separacích proteinových komplexů [15,16].

3.1.3 Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS)

V posledních letech devatenáctého století v Cambridge položil základy hmotností spektrometrie fyzik J. J. Thomson, který se zabýval vychylováním katodového záření v elektrickém poli a objevil a popsal elektron. Společně s Francisem W. Astonem sestrojil první hmotností spektrometr, který byl schopen měřit hmotnost nabitých iontů, a pomocí něhož zaznamenal izotopy některých prvků [17].

Do druhé světové války se hmotností spektrometrie postupně vylepšovala, ale zásadní vliv na vývoj byl požadavek na separaci a charakterizaci izotopů uranu během války [17].

Ve čtyřicátých letech minulého století již byly hmotností spektrometry komerčně dostupné. V této době spíše sloužily ke kvantitativní analýze. V padesátých letech byl sestaven analyzátor typu TOF (Time-of-Flight, který měřil dobu letu) [17].

Do 80. let se stala analýza malých organických molekul pomocí metody MS standardem každé laboratoře. Na konci osmdesátých byl vyřešen problém analýzy velkých molekul, tak aby nedocházelo k jejich neustálé fragmentaci, když John Fenn využil k ionizaci metodu značnou jako ESI (Electrospray Ionization). Ionizaci pomocí laseru v této době využil Koichi Tanaka a nezávisle na něm také Franz Hillenkamp s Michaelem Karasem, kteří jsou považováni za zakladatele metody MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). Objevy ESI a MALDI měly zásadní vliv na identifikaci proteinů a jejich kvantitativní analýzu [17].

Jak důležité byly objevy hmotnostní spektrometrie, ukazuje fakt, že v roce 1906 J. J. Thomson, 1922 F. W. Aston, 1989 Wolfgang Paul a Hans Dehmelt a nakonec v roce 2002 John Fenn a Koichi Tanaka získali Nobelovu cenu za své přínosy v MS [17].

3.1.4 Současnost

Vývoj proteomiky jako souboru nástrojů, přístupů a konceptů biologického studia souvisel s postupným rozvojem elektroforézy, chromatografie a hmotnostní spektrometrie. V osmdesátých letech ještě nebyla 2-DE z gelu dostatečně citlivou metodou pro stanovení proteinů v množství nanogramů [13,14,15,17].

Na konci devadesátých let se objevilo dekódování genomů, pomocí genových databází, a hmotnostní spektrometrie, pomocí níž se dala stanovit přesná hmotnost peptidů a jejich fragmentů. Právě pomocí hmotností spektrometrie byla nalezena dostatečná citlivost metody k rychlému stanovení proteinů [13,17].

V roce 1993 byl poležen základ metody PMF (Peptide Mass Fingerprinting), tzv. peptidové mapování nebo peptidový fingerprinting. PMF je založena na změření hmotnosti peptidů a ty jsou porovnávány s hmotností všech teoretických peptidů, vypočítaných na základě kódujících sekvencí DNA přítomných v databázi [3,13].

Také se v této době využívá k identifikaci proteinů tandemové hmotností spektrometrie (MS/MS) a fragmentace peptidů, které používají ionizace ESI ve spojení s iontovou pastí nebo trojitým kvadrupólem [13].

Termín proteom, který označuje proteinový komplex genomu, je v roce 1994 poprvé použit v Itálii a dochází tak k oficiální zrodu proteomiky jako oboru, který se zabývá kvalitativním a kvantitativním popisem proteomu [1].

Současná proteomika se rozděluje na strukturní, která se zabývá vytvářením buněčných nebo subcelulárních map a ukazuje kompletní informace o bílkovinách a jejich interakcích v dané organelle nebo víceproteinovém komplexu, dále na funkční, cílená sub-proteomická izolace a charakterizuje funkční celky nebo soubory bílkovin na základě společné funkce, a nakonec expresní proteomika, zabývající se kvantitativním studiem porovnávajícím expresi mezi různými proteomy [18,19].

3.2 Proteom

Tento pojem byl použit poprvé australským molekulárním biologem Markem Wilkinsem [1].

Proteom pochází ze zkráceného anglického názvu *proteins expressed by a genome*. Vystihuje tedy souhrn všech proteinů, které jsou kódované a exprimované v buňce nebo viru spolu s jejich interakcí a funkčními vztahy. Také se jedná o okamžitý soubor všech proteinů ve vzorku (buňka, tkáň) v určitém čase. Jelikož se koncentrace proteinů neustále mění podle potřeby organismu, na rozdíl od genové výbavy, jedná se o pojem dynamický [1].

V širším slova smyslu, lze proteom chápat buď jako buněčný nebo kompletní. Buněčný proteom je souborem proteinů, které se právě nachází v určité buňce, za daných podmínek. Kompletní proteom je potom proteomem celého organismu [1,2].

V porovnání s genomem (obsahuje celou genetickou informaci uloženou v DNA, všechny geny a nekódující sekvence) je proteom větší, zvláště u eukaryot, a to díky alternativnímu splicingu a posttranslačním modifikacím proteinů. Genom je oproti proteomu více stabilní, protože, jak již bylo řečeno, proteiny se buňce mění velmi rychle a různými způsoby. Proto je analýza proteomu složitější a všechny proteiny v buňce se stanoví najednou [1,3].

3.3 Genomika

Genomika je poměrně nový vědní obor, který se začal vyvíjet v 70. a 80. letech minulého století společně s rozvojem molekulárních metod jako např. sekvenování a genové mapování, vycházející z oboru genetiky. Tento pojem byl poprvé použit až v roce 1986 Thomasem Roderickem. Lidský genom byl poprvé přečten v roce 2001 v rámci projektu HUGO (Human Genome Organisation), mezi jehož cíle patří zkoumání povahy, struktury, funkce a interakce genů, genetické elementy a genomy člověka a příslušných patogenní organismů, studují vliv genetické variability a životního prostředí na vlastnosti, příčiny, léčbu a prevenci chorob, atd. Projekt přečtení lidského genomu byl ukončen až v roce 2007, kdy byl lidský genom prohlášen za přečtený [2].

Tento obor se zabývá komplexně genomem organismů. Principem je stanovení úplné dědičné informace, tedy získání sledu všech nukleotidů, a přiřazení funkcí jednotlivým genům jedince [2].

Genomika se může dále členit na různé podobory:

- strukturní genomika, která studuje struktury genů, především celých genomů,
- funkční genomika, jejímž cílem je genová exprese za různých podmínek,
- komparativní genomika, která porovnává genomy různých organismů,
- populační genomika porovnávající genomy v rámci konkrétní populace konkrétního organismu,
- výpočetní genomika, která pracuje s genomickými daty za pomoci bioinformatických výpočetních metod,
- osobní genomika, která se snaží do budoucnosti pomoci lékařům v poskytnutí přesné informace o genetických predispozicích pacientů [2].

Genomika s proteomikou jdou ruku v ruce. Jsou to interdisciplinární vědní obory, které se zabývají studiem a analýzou genomu a proteomu, jehož soubory proteinů jsou na základě genetické informace genomu vytvářeny. Společně zasahují do vědních oborů jako je biochemie, molekulární a systémová biologie, bioanalytická chemie, atd. [2,3].

3.4 Oblasti působení proteomiky

V současné době zasahuje tento dynamický obor do mnoha oblastí, ve kterých se neustále vyvíjí. Mezinárodní organizace HUPO (Human Proteom Organization) a EuPA (European Proteomics Association) své výzkumy obohatili o studia proteomů mnoha jiných živočišných druhů. V budoucnosti se očekávají přínosy proteomiky zvláště do oblasti biomedicíny, které by mohly mít zásadní vliv v časně diagnóze a léčbě daného onemocnění [4,5,18,19].

Některé studie se zabývají hledáním proteinů a určováním jejich forem v organismu. Jiné sledují změny proteinových profilů v závislosti na funkčním stavu buňky nebo tkáně. Další se věnují interakcemi mezi proteiny, tedy reakcí protein-protein, které jsou důležité z hlediska regulace jejich funkce a také vnitrobuněčné lokalizace. Tyto interakce nejsou určovány snadno, protože získat dostatečné množství proteinového komplexu s námi požadovanou čistotou není lehké. Separační techniky se pak volí pro každý sledovaný proteinový komplex tak, aby nedocházelo k narušení proteinové interakci [16,18].

Existují také studie, které se věnují reverzibilním posttranslačním modifikacím proteinů a které bývají spojené s úbytkem molekulové hmotnosti, určují se pomocí hmotností spektrometrie. Za zmínku také stojí studie, které měří rozdíl v expresi proteinů, změny

exprese proteinů v závislosti na čase, změny exprese proteinů v buňce, které jsou způsobeny reakcí na prostředí nebo na nějakou látku [18,19].

4 Metody proteomiky

Nejdůležitější je příprava vzorku před samotným stanovením. Pokud bychom se snažili homogenizovat celý organismus a až poté celý proteom, nejspíše bychom neuspěli, protože získané informace jsou na úrovni těch, které můžeme identifikovat již z genomu [13].

4.1 Separační metody

Tyto metody slouží k rozdělení směsí látek na základě rozdílných fází nebo rozdílných fyzikálních vlastností [16].

Mezi separační metody používané v proteomice patří chromatografie, kdy se složky směsi rozdělují na základě rozdílných vlastností, a elektroforéza využívající rozdílné pohyblivosti elektricky nabitých částic různých látek v elektrickém poli [16].

4.1.1 Chromatografie

Název chromatografie pochází z řeckého slova barva a slova psát [15].

4.1.1.1 Princip chromatografie

Dochází k rozdělování složek směsi vzorku mezi dvěma fázemi – stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Fáze se od sebe liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Společně s mobilní fází je soustavou unášen také vzorek. Analyty (dělené složky vzorku) reagují v různé míře s oběma fázemi. Ty analyty, které se váží na stacionární fázi, jsou zadržovány déle a pomaleji se pohybují [15,20].

4.1.1.2 Základní pojmy používané v chromatografii

- **Stacionární fáze** – porézní materiál (silikagel, oxid hlinitý, celulóza, apod.), který je vlastní účinnou složkou chromatografického zařízení.
- **Mobilní fáze** – kapalina nebo plyn unášející složky dělené směsi přes stacionární fázi.
- **Analyt** – izolovaná látka.
- **Eluent** – mobilní fáze.
- **Chromatograf** – zařízení, ve kterém se uskutečňuje vlastní chromatografie.
- **Chromatogram** – grafický výstup z detektoru, který vyjadřuje závislost signálu (na ose y) na elučním čase nebo objemu (osa x).
- **Nosič** – pevná (inertní) látka spojená se zakotvenou fází.

- **Retardační faktor** – poměr vzdálenosti čela od startu a vzdálenosti středu skvrny sledované látky od startu při plošných chromatografiích.
- **Retenční (eluční) čas (objem)** – čas od začátku eluce, který je potřebný k tomu, aby se daná frakce vzorku dostala k detektoru za kolonou, nebo objem elučního činidla, který proteče za eluční čas kolonou.
- **Teoretické patro** – výšková část kolony, ve které dochází k jednomu rovnovážnému dělicímu kroku fyzikálně chemického jevu.
- **Účinnost kolony** – úměrná počtu teoretických pater dané kolony [15,20].

Přehledné rozdělení chromatografických metod je uvedeno v tabulce č. 1.

Tabulka 1 Rozdělení chromatografických metod

Dle uspořádání	Plošná	Papírová	
		TLC	Sypaná vrstva
	Sloupcová	HPLC	
		GC	
Dle fyzikálně chemických vlastností	Adsorpční		
	Rozdělovací		
	Gelová		
	Iontově výměnná		
	Afinitní		
Dle skupenství mobilní fáze	Plynová		
	Kapalinová		
Dle účelu použití	Analytická		
	Preparativní		

4.1.1.3 Dělení podle uspořádání

a) Plošné uspořádání

Plošné uspořádání chromatografie je realizováno pomocí papíru, sypané a tenké vrstvy. Pohyb mobilní fáze je zde uskutečněn pomocí vztlínání této fáze. Mezi plošné uspořádání chromatografie se řadí papírová, TLC chromatografie a sypaná vrstva [21].

U **papírové chromatografie** se jako stacionární fáze používá chromatografický papír, který je složen z vrstev celulózních vláken obsahující několik % vody [21].

TLC (Thin Layer Chromatography), neboli **tenkovrstvá chromatografie**, patří dnes k nejběžněji používaným plošným uspořádáním. Provádí se na tenké vrstvě sorbentu přichyceného k podložce složené buď z hliníku, nebo skla či polymeru [21].

Podobné uspořádání jako TLC má **sypaná vrstva**. Liší se pouze vrstvou sorbentu, která je silnější, až několik mm. Tuto metodu využívá hlavně preparativní chemie k separaci obtížně separovaných látek [21].

b) Sloupcové uspořádání

Toto uspořádání umožňuje urychlení separačního procesu, kdy dělení probíhá v trubici, která je naplněna sorbentem. Suspenze sorbentu je nalita do trubice, kde vytvoří sloupec, z něhož odkapává mobilní fáze zachytávána do zkumavek nebo vialek. V průběhu procesu je neustále mobilní fáze doplňována, aby sloupec nevyschnul [22,23].

Mezi chromatografie ve sloupcovém uspořádání patří HPLC a GC chromatografie [22,23,24,25]:

HPLC, neboli vysokoúčinná (vysokotlaká) kapalinová chromatografie, pracuje na základě zvýšení tlaku pomocí čerpadla s vysokým tlakem mobilní fáze, čímž se urychlí dělení na sloupci. Výsledný chromatogram vyhodnocuje závislost odezvy detektoru na čase analýzy, kdy jednotlivé složky jsou zobrazeny jako píky a jejich koncentrace je plocha pod píky [22,23].

GC (Gass Chromatography), plynová chromatografie, je metoda, kde mobilní fáze je plyn (helium, dusík nebo vodík). Vzorek, který chceme rozdělit, se musí nejdříve nechat vypařit a zůstat v tomto stavu stabilní. Chromatogram vyhodnotí závislost vodivosti (odezvy detektoru) na čase. Dělené látky vstupují do plamene v různém čase a jako píky jsou zobrazeny na chromatogramu. Jejich koncentrace je vyobrazena opět jako plocha pod píky [24,25].

4.1.1.4 Rozdělení podle fyzikálně chemických vlastností

a) Adsorpční chromatografie

Při adsorpci reaguje látka s absorbentem. Stacionární fází u toho procesu je sorbent, tedy látka, která ke své hmotnosti má velký povrch a na něm skupiny, které vytváří slabé vazby s rozpuštěnými látkami. Jako sorbenty jsou využívány silikagel, oxid hlinitý a křemelina [26].

b) Rozdělovací chromatografie

Principem rozdělovací chromatografie je dělení látek na základě jejich rozdílné rozpustnosti ve dvou různých kapalinách. Jako mobilní fáze je použita jedna z kapalin, druhá je zakotvena na nosiči a tvoří tak fází stacionární. V případě plynových chromatografií je místo kapaliny jako mobilní fáze použit plyn. Kapalina, která je zakotvena, musí v tomto případě mít minimální těkavost za teplot, které jsou použity při separaci [27].

c) Gelová chromatografie

Tento typ chromatografie se v angličtině nazývá size-exclusion chromatography. Princip je založen na rozdílné průchodnosti otvorů a dutých výklenků na částicích stacionární fáze pro různě velké částice dělené směsi. Jako stacionární fáze jsou použity hrudky gelu, nejčastěji polysacharidy a dextryny sloužící jako molekulové síto [28,29].

d) Iontově výměnná chromatografie

Principem toho typu chromatografie je coulombické přitahování opačně nabitých částic za použití iontoměniče. Ionex je látka, která má na svém povrchu skupiny, které jsou schopny disociace v roztoku [30,31].

Katex je iontoměnič, který reaguje s kationty. Obsahuje kyselé skupiny ($-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$) [30,31].

Anex je iontoměnič reagující s anionty a obsahuje zásadotvorné skupiny (kvartérní amonné ionty) [30,31].

Pokud klesne koncentrace iontů, lze iontoměnič regenerovat za použití roztoků, které obsahují původní ionty (kyseliny, zásady, NaCl) [30,31].

e) Afinitní chromatografie

Tato metoda se používá u separace bioaktivních látek jako selektivní separace. Principem je specifická sorpce, která je charakteristická pro biologické procesy (enzym-inhibitor, protilátka-antigen, receptor-hormon). Touto metodou lze zakonzentrovat látky obsažené ve velmi malých koncentracích [32].

4.1.1.5 Rozdělení chromatografických metod dle skupenství mobilní fáze

Na základě tohoto dělení se chromatografické metody dělí na plynové a kapalinové [27].

4.1.1.6 Rozdělení chromatografických metod podle účelu použití

Dle účelu použití se dělí na analytickou chromatografii a preparativní chromatografii [27].

4.1.2 Elektroforéza

Od roku 1892 je známé, že anorganické částice v koloidním roztoku působením elektrického pole nenáhodně putují (tento jev byl později popsán i u proteinů). Švédský vědec Arne. W. Tiselius dostal v roce 1948 Nobelovu cenu za chemii za sestavení první elektroforetické aparatury [33].

4.1.2.1 Princip elektroforézy

Principem elektroforézy je, že využívá schopnosti nabitých částí se pohybovat v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic závisí na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku. Elektroforézu můžeme použít tedy k separaci látek pro analytické účely, ale i pro účely preparativní [33].

Pokud bychom chtěli vyjádřit rychlost elektroforetické separace, můžeme na základě tohoto vztahu [33]:

$$\frac{v}{E} = C \cdot \frac{\epsilon_R \cdot \epsilon_0}{\eta} \cdot \zeta$$

v lineární rychlost (m/s)

ϵ_0 permitivita vakua

E intenzita elektrického pole (V/m)

η viskozita prostředí (Pa·s)

C konstanta závislá na tvaru částic a na tloušťce elektrické dvojvrstvy

ζ elektrokinetický potenciál

ϵ_R relativní permitivita kapaliny

Tabulka 2 Rozdělení elektroforézy

Volná	
Na nosičích	PAGE
	SDS
	Izoelektrická fokusace
	Dvojrozměrná
Kapilární	Volná
	Gelová
	Izotachoforéza
Afinitní	

a) Volná elektroforéza

Principem tohoto druhu elektroforézy je, že se provádí ve vodných roztocích tlumivých roztoků (elektrolytu). Částice potom putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou [33].

b) Elektroforéza na nosičích

Této metodě se také říká zonální elektroforéza a začala být používána kvůli nedostatkům, které měla volná elektroforéza (vznik konvenčních proudů a difúze). Nosiče musí splňovat tyto podmínky: být hydrofilní, nerozpustné ve vodě a měly by mít co nejmenší adsorpční schopnosti. Metody poté můžeme rozdělit na PAGE, SDS elektroforézu, izoelektrickou fokusaci a dvojrozměrnou elektroforézu [33,34,35].

c) Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)

PAGE se velice často používá v analytice proteinů ke zjištění homogenity preparátu a různých stupňů isolačních postupů a částečně také k fyzikálně-chemické charakterizaci bílkovin. Aby elektroforetická separace proběhla úspěšně, musí být zajištěny vhodné podmínky pro provedení procesu, zejména vhodně zvolené pH [34].

Mezi nejdůležitější faktory pro elektroforézy na nosičích (i pro PAGE) je koncentrace gelu, tedy stupeň zesítnění gelu. Gel s většími nebo menšími póry se stává mechanickou překážkou pro molekuly určité velikosti [34].

Elektroforézu v polyakrylamidovém gelu můžeme provést dvěma způsoby. V obou případech se provádí ve speciálních aparaturách, do nichž se nosič se vzorkem vloží mezi dvě elektrody, ve kterých proudí stejnosměrný proud. Rozdíl je poté mezi umístěním vzorku [34].

d) SDS elektroforéza

U této metody je také použit polyakrylamidový gel, ale s přidavkem dodecylsulfátu sodného (SDS). Použití SDS elektroforézy je pouze speciálně pro proteiny. SDS je tedy anionaktivní detergent, který má poměrně vysoký náboj, díky kterému se vyrovnají nábojové rozdíly bílkovin, které se pohybují v gelu pouze na základě velikosti [35].

e) Izoelektrická fokusace (IEF)

Při IEF dochází k separaci v gradientu pH, který se ustanoví mezi dvěma elektrodami. Separovaná látka se poté pohybuje vlivem elektrického proudu v gradientu pH dokud se nedostane do oblasti pH shodné s jejím izoelektrickým bodem. Zde ztratí náboj, zastaví se a začne se koncentrovat [36].

f) Dvojrozměrná elektroforéza

Dvojrozměrná elektroforéza slouží k separaci komplikovaných vzorků, pro které není vhodná ani jedna z předešlých elektroforéz. Umožní nám rozlišení až 10 000 proteinů [33,34,35].

Nejčastější provedení:

- PAGE v trubičce s kombinací PAGE na desce
- Kombinace PAGE s SDS-PAGE
- Poslední kombinace je IEF a SDS-PAGE [34,35].

g) Kapilární elektroforéza

Používá principy elektrokinetické elektroforézy a elektroosmózy k rozdělení látek uvnitř křemenné kapiláry. Provést ji můžeme jako volnou, gelovou elektroforézu a izoelektrickou fokusaci [37].

h) Volná kapilární elektroforéza

Způsob volné kapilární elektroforézy (Free-zone capillary electrophoresis) se provádí v otevřené kapiláře, která je naplněna elektrolytem. K rozdělení dojde kombinací vlivu elektroforetické migrace a elektroosmotického toku [37].

i) Kapilární gelová elektroforéza

U této metody se pracuje s kapilárami, jejichž vnitřní povrch je modifikován (potažen), čímž se minimalizuje elektroosmotický tok a separace proběhne pouze na základě elektroforetické migrace [37,38,39].

j) Izotachoforéza

Od normální elektroforézy se liší tím, že vzorek se umísťuje mezi dva elektrolyty (vedoucí a koncový), které se liší v mobilitě iontů jednotlivých elektrolytů – vedoucí obsahuje nejpohyblivější ionty a koncový nejpomalejší. Samotná separace pak probíhá za konstantního proudu v gradientu napětí [40].

k) Afinitní elektroforéza

Princip je podobný jako u afinitní chromatografie. Separované látky se pohybují díky vlivu elektroforetické pohyblivosti v gelu, ve kterém je přítomný imobilizovaný afinitní ligand. Tato složka se v důsledku tvorby specifického komplexu opoždí v průchodu gelem, zatímco neaktivní migrují normální rychlostí [41].

4.2 Hmotnostní spektrometrie

4.2.1 Princip

Principem této fyzikálně-chemické metody je stanovení hmotnosti molekul a atomů po jejich převedení na ionty pomocí přístroje, kterému se říká hmotnostní spektrometr, jenž rozlišuje jednotlivé ionty podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z), po němž následuje záznam relativních intenzit jednotlivých iontů [17,42,43,44].

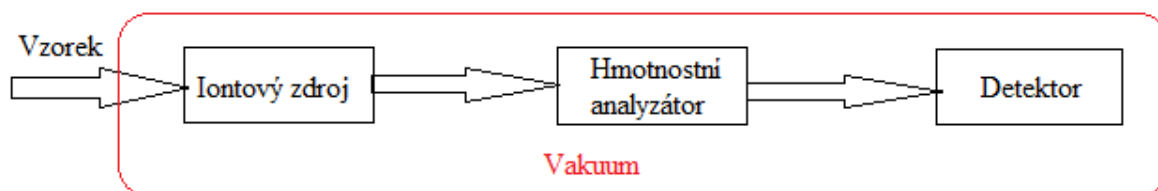
Na základě MS můžeme detekovat:

- primární strukturu proteinů,
- posttranslační a chemické modifikace bílkovin (fosforylace, glykosilace, oxidace, atd.),

- izotopový poměr prvků ve vzorku – kvantifikace,
- analýza komplexních směsí,
- molekulovou hmotnost,
- identifikace proteinů,
- také mutace DNA a sekvenční chyby,
- analýza nekovalentních směsí [42].

Jednou z nejdůležitějších vlastností hmotnostní spektrometrie je její vysoká citlivost. Dále je tato metoda velice rychlá, specifická, má minimální spotřebu analyzovaného vzorku a získaná data se dají jednoduše interpretovat. Nevýhodou je, že MS patří mezi metody destruktivní a její pořizovací a provozní náklady jsou vysoké [17,42,43,44].

4.2.2 Hmotnostní spektrometr



Obr. 3 Schéma hmotnostního spektrometru [43].

Vzorek putuje do iontového zdroje, kde se jeho neutrální molekuly převedou na nabitě částice. Tento proces se nazývá ionizace. Techniky ionizace probíhají za atmosférického nebo sníženého tlaku a dělí se:

- a) měkké techniky (energetický přebytek dodaný molekule je malý a fragmentace primárně vzniklého iontu je malá),
- b) tvrdé techniky (dodaná energie dostačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu) [45,46].

Ionizaci můžeme provést několika způsoby:

- ionizace elektronovým paprskem (EI) – tzv. tvrdá ionizace, ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek energie, který se projeví fragmentací molekulového iontu na menší části (tzv. fragmentované ionty) [46],

- chemická ionizace (CI) – tzv. měkká ionizace, molekuly v plynném stavu reagují s reakčními ionty, nejdříve jsou ionizujícími e^- ionizovány molekuly reakčního plynu, které následně ion-molekulárními interakcemi ionizují molekuly analytu (tlak, který se použije, zaručuje, že dojde k dostatečnému počtu interakcí molekul analytu s ionty reakčního plynu) [45],
- ionizace rychlými atomy a ionty (FAB) – typ měkké ionizace, analýza tepelně nestálých netěkavých látek, dochází k ionizaci interakcí urychlených iontů se vzorkem ve vhodné viskózní matrici [46],
- působením elektrostatického pole (FI, FD) – vzorek je převeden do plynné fáze a ionizován elektrickým polem o vysoké intenzitě v blízkosti wolframové elektrody pokryté mikrojuhličkami nebo je vzorek nanesen na emitore, k ionizaci dojde po vložení napětí mezi emitorem a protielektrodou přímo z pevné fáze [46],
- desorpce plazmou (PD) – využívá se indukčně vázaného plazmatu, určuje elementární složení, atomy v molekule analytu jsou převáděny na ionty, které jsou poté analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru [46],
- desorpce laserem za přítomnosti matrice (MALDI, SELDI – Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization) – principem metody MALDI, která využívá ionizaci laserem, je: analyzovaný vzorek, který je smíchán s matricí, vykrytalizuje na MALDI destičce, poté je ozářen pulsním laserem (ionizace molekul matrice, molekuly vzorku ionizují přenosem protonu z matrice). Úkolem matrice je chránit vzorek před rozpadem. Samotné měření pak probíhá buď v lineárním módu (přímá dráha letu, měření proteinů), nebo v reflektrovaném módu (prodloužená dráha letu, měření peptidů) [47].
- ionizace elektrosprejem (ESI) nebo termosprejem (TSI) – typ měkké ionizace, použití pro disperze kapalin nebo aerosolů, vznikají vícenásobně nabitě ionty, pro jeden analyt se ve spektru objeví série píků odpovídající iontů téže látky (stejná molekulová hmotnost, rozdílný počet nábojů), před analýzou je nutné vzorek přečistit (není tolerantní k detergentům a solím) [46].

V podstatě neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, jež se mohou lišit v různých chemických hlediskách. Z tohoto důvodu se musí volit vždy optimální způsob ionizace pro konkrétní látku [46].

Další částí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor, jehož úkolem je rozdělení iontů v plynné fázi ve vakuu dle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Existuje několik druhů [17,42,43,44]:

- kvadrupolový analyzátor – tvořen čtyřmi paralelními kovovými tyčemi, které jsou uspořádány symetricky vzhledem k trajektorii procházejících iontů, jež jsou vzájemně elektricky propojené, a ionty produkované v iontovém zdroji jsou postupně propouštěny přes kvadrupól změnou velikosti napětí [43,44],
- ion-cyklotronová rezonance – ICR (Ion-Cyclotron Resonance), ionty se pochybují po uzavřených kruhových drahách, ve kterých jsou vystaveny homogennímu magnetickému poli [43,44],
- iontová past – funkční obdoba kvadrupolových analyzátorů s uzavřeným elektrostatickým polem [43,44],
- průletové analyzátoři – TOF, ionty jsou z iontového zdroje akcelerovány napětím a stanovuje se doba průletu iontu letovou trubicí k detektoru [43,44].

Úkolem detektoru je poskytování signálu, který je úměrný počtu dopadajících iontů. To se děje dvěma způsoby, buď přímým měření signálu, který detekuje elektrický proud, který vzniká přímým dopadem analyzovaných iontů, nebo pomocí násobičových detektorů, které využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů [42].

Poslední součástí hmotnostního spektrometru je řídicí počítač, který výsledek metody zaznamená jako tzv. hmotnostní spektrum, kde je zobrazena závislost hodnot m/z [42].

4.2.3 Tandemový hmotnostní spektrometr

Za zmínku také stojí tento druh hmotností spektrometrie, tedy tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Tento druh slouží k bližší charakterizaci identifikované látky, čímž je myšleno například určení aminokyselinové sekvence nebo lokalizace posttranslačních modifikací [48].

Samotný tandemový hmotnostní spektrometr se skládá ze dvou hmotnostních analyzátorů, které jsou sériově spojené kolizní celou. V prvním analyzátoru dochází k rozlišení prekurzorových (mateřských) iontů a poté k výběru jednoho z nich. Vybraný prekurzor je podroben fragmentaci v kolizní cele a vzniklé produktové (dceřiné) ionty jsou rozlišeny v druhém analyzátoru [48].

4.3 Peptidové mapování

Mezi další techniky proteomiky patří peptidové mapování, které se v současné době stalo velice oblíbené a účinné. Metoda je velice citlivá, což dokazuje, že můžeme určit i ty nejmenší změny substituce i u jediné aminokyseliny v molekule proteinu [49,50].

Nutnou podmínkou pro srovnávané bílkoviny je jejich tzv. homologie. To znamená, aby bílkoviny obsahovaly určité identické sekvence. Pokud je těchto sekvencí méně než 80%, není možné studovat rozdíly v bílkovinné struktuře, protože peptidové mapy si jsou velmi málo podobné [49,50].

Peptidové mapování můžeme také využít k identifikaci izoenzymů (enzymy se stejnou biologickou funkcí, ale různou aktivitou a složením), které se liší stupněm postranslační modifikace (glykosylace, fosforylace, sulfatace, atd.). Dále k diagnostice různých onemocnění, např. nádorových, které vykazují větší množství fosforylovaných proteinů. Nakonec můžeme zmínit syntézu bílkovin, kdy peptidové mapy slouží k monitorování čistoty a kvality syntetizovaných proteinů [51].

Samotná technika se skládá z několika kroků, a to z:

- štěpení,
- separace peptidů,
- detekce peptidů [51].

4.3.1 Štěpení proteinů

Abychom mohli peptidové mapy nějaké bílkoviny stanovit, musí dojít k jejímu rozštěpení na menší fragmenty buď enzymaticky (trypsin, α -chymotrypsin, Staphylococcal proteinasa, atd.) nebo chemicky (chemická činidla jako kyanobromid). Čím delší jsou peptidové fragmenty, tím těžší je jejich identifikace, protože roste riziko jejich vzájemného překrytí. Nejvhodnější je tedy štěpení velkých molekul v malém množství bodů, izolování velkých fragmentů a jejich další štěpení a vlastní identifikace [49,51].

K dokonalému rozštěpení bílkovin je ještě nutné provést jejich denaturaci, která nejčastěji probíhá rozpuštěním daného proteinu v denaturujícím roztoku (např. močovina) nebo jejím zahřátím, případně precipitací [49,51].

4.3.2 Separace peptidů po hydrolýze

Fragmenty naštěpené bílkoviny je v druhém kroku nutné separovat. Důležitou podmínkou k separaci fragmentů je, že se od sebe musí lišit v nejméně v jedné fyzikální nebo chemické vlastnosti. Separací metody používané ke stanovení peptidových map jsou [51]:

- Metody elektromigrační:
 - zónová elektroforéza,
 - zónová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu (SDS-PAGE),
 - kapilární zónová elektroforéza (CZE) [51].
- Metody chromatografické:
 - chromatografie na měničích iontů,
 - vysoce účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) [51,52].

4.3.3 Detekce peptidů

Posledním krokem při stanovení peptidových map je vlastní detekce separovaných peptidů, která je provedena buď přímou anebo nepřímou metodou. Pomocí přímého stanovení měříme určité fyzikální vlastnosti daného peptidu, zatímco při nepřímé metodě jsou analyzovány komplexy peptidů s přidanými činidly, která se přidávají ke zvýšení citlivosti a měří se poté spektrofotometricky [49,51,52].

Mezi přímé metody detekce patří:

- absorpční spektrometrie v ultrafialové oblasti,
- hmotnostní spektrometrie,
- fluorescenční emisní spektrometrie,
- autoradiografie a kapalinová scintilační spektrometrie [51].

4.4 Rentgenová krystalografie

Jako první objevili RTG (rentgenové záření) difrakci Max von Laue, Walter Friedrich a Paul Knipping, když na začátku 20. století ozářili krystaly modré skalice RTG svazkem a zjistili, že energie, která se rozptýlí od krystalu, se šíří jen v určitých směrech a v některých dokonce mizí. Na ně poté navázal William L. Bragg, který si jako první uvědomil, že v RTG difrakčním obraze krystalu musí být zakódovaná jeho vnitřní struktura. Také jako první začal používat monochromatického RTG svazku [53,54,55,56].

Metoda rentgenové (X-ray) krystalografie nám umožňuje získat informace o prostorové struktuře proteinů díky difrakci rentgenového záření na monokrystalech. Metoda se často používá současně s neutronovou krystalografií, která má za úkol popsat úlohu vodíků přítomných ve vodě, vodíkové interakce aminokyselin a dále také protonaci aminokyselinových zbytků v aktivním místě enzymu [54,55,56,57].

Tato metoda nám pomůže pochopit princip činnosti proteinů v lidském těle na základě jejich prostorovému uspořádání. Jiné metody (např. elektronová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil) jsou buď málo přesné, anebo se stále ještě vyvíjejí [54,55].

4.4.1 Postup a princip

Jednou z nejdůležitějších věcí při rentgenové krystalografii je nutnost extrémně čistého bílkovinného vzorku. Ten také musí mít relativně veliké a dost kvalitní krystaly, čímž nastává největší problém, protože některé proteiny není možné vůbec zkrystalizovat (např. membránové proteiny). Množství vzorku se poté řádově pohybuje v miligramech [53].

Pokud není k dispozici vzorek ve formě monokrystalu, můžeme provést práškovou analýzu tak, že se vzorek jemně umele a místo směru se analyzuje pouze závislost intenzity difraktovaného záření na úhlu mezi primárním a difraktovaným paprskem. Vzorek ve formě prášku je velice nevýhodný, protože z něj nemůžeme přesně určit danou strukturu proteinu, ale můžeme aspoň ověřit, jestli záznam odpovídá modelu nebo jiné dříve analyzované struktuře [53,57].

Ideální krystal (na atomové úrovni) je uspořádán periodicky trojrozměrně, což znamená, že se v něm opakuje určitý atomový motiv (jeden atom u krystalů elementárních kovů, u biologických vzorků obrovský počet nevodíkových atomů). Uspořádání se nazývá krystalová struktura nebo také méně přesně krystalová mřížka. Stanovení ideální krystalové struktury je určení a upřesnění souřadnic a parametrů teplotního pohybu všech atomů v buňce. Abychom byli přesnější, stanovení se provádí v jejích asymetrických částech, jelikož každá krystalová struktura je symetrická. Dalšími parametry potřebnými k vyřešení krystalové struktury jsou rozměry elementární buňky (mřížkové parametry) a prostorová grupa symetrie [57,58,59].

Abychom mohli určit strukturu krystalu, musíme ho ozářit monochromatickým rentgenovým zářením (RTG), čímž dostaneme jeho difrakční obraz, který již můžeme pozorovat. Primární RTG se pružně rozptýlí na elektronech krystalu – vznikne sekundární,

neboli difraktované záření. Difrakce je tedy ohyb vlnění za krystalovou mřížkou a nastane tehdy, když jsou mezivzrostlé vzdálenosti srovnatelné s vlnovou délkou vlnění [57,58,59].

Difrakční obraz krystalu ale není mikroskopickým obrazem jeho vnitřní struktury. Použitelné veličiny v difrakčním obraze jsou intenzity a polohy (úhly) jednotlivých difrakcí. Některé difrakce mohou mít nulovou intenzitu, říká se, že vyhasínají. Ze samotné intenzity difrakcí se pak mohou stanovit přesné pozice atomů a jejich teplotně-vibrační parametry (polohy difrakcí, rozměry elementární buňky a systematické vyhasínání prostorových grup) [57,58,59].

K přesnému určení pozic atomů se musí vypočítat mapa distribuce elektronové hustoty v asymetrické části elementární buňky. Maxima této mapy, která představují těžiště elektronových obalů atomů, dobře vycházejí s pozicemi jader izolovaných atomů (výjimkou jsou ale atomy vodíku). Nakonec se musí upřesnit pozice atomů a jejich teplotně-vibrační parametry, protože je k dispozici více pozorování než samotných parametrů [57,58,59].

Tento jev, difrakce, můžeme také popsat pomocí Braggova zákona, který říká, že při difrakci elektronů s vlnovou délkou λ na krystalové mřížce vzniká dráhový rozdíl, jenž způsobuje fázový posun těchto vlnění. Poté dojde k interferenci a na stínítku můžeme pozorovat interferenční maxima. To, kde se nacházejí, popisuje právě Braggův zákon [57,58,59]:

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$$

kdy d_{hkl} představuje vzdálenost meziatomových rovin (hkl , tzv. Millerovy indexy), θ je difrakční úhel a n znázorňuje řád interference [57].

Rentgenová krystalografie se provádí:

a) Krystalizace proteinu:

Jednou z používaných metod, je metoda tzv. visící kapky, kdy se kapička roztoku proteinu a matečného roztoku zavěsí na víčko nádoby, ve které je koncentrovaný matečný roztok. Poté dojde k difúzi a osmóze par vody z méně koncentrované kapičky do koncentrovanějšího matečného roztoku, čímž dojde k začátku samotné krystalizaci [53,54].

b) Určení parametrů krystalizace:

Aby krystalizace proběhla správně, je nutné ověřit její správnost ve fázi nukleace, kdy se krystal nachází v metastabilním stavu, kde dochází k růstu krystalů [53,54].

c) Ověření krystalu:

Je důležité oddělit od sebe krystaly vzniklé ze solí, které mohou vznikat současně s těmi z proteinů a které bývají mnohem křehčí. Test můžeme provést například drcením jehlou, nejdůležitější je ale test pomocí rentgenová difrakce [53,54].

d) Zmrazení krystalu:

Jakmile je úspěšně vzorek proteinu vykrytalizován, je nutné ho pomocí smyčky izolovat a hned zamrazit ponořením do tekutého dusíku [53,54].

e) Rekonstrukce struktury:

Pomocí již zmíněného Braggova zákona [59].

Experimentální zařízení, ve kterém rentgenová krystalografie probíhá, se nazývá čtyřkruhový difraktometr [57,58,59].

4.4.2 Proteinová krystalografie

V současnosti se proteinová krystalografie řadí mezi multidisciplinární obory, ve kterých se prolínají zájmy z oborů fyziky, biologie, biochemie atd. [56].

Pokrok v dnešní době přichází s tím, že materiál se již nerealizuje z přírodních materiálů, ale izolací ze systémů rekombinantní exprese, např.:

- cizí protein je produkován v bakteriích *E. coli* nebo v kvasinkách (příslušná nukleová kyselina, se získá předem pomocí molekulárního klonování),
- exprese v *E. coli* a purifikaci lze získat retrovirovou proteasu HIV (Human Immunodeficiency Virus – virus lidské imunitní nedostatečnosti), která nese konkrétní bodovou mutaci spojenou s rezistencí k léčivu [56].

4.5 NMR spektroskopie

Rentgenová krystalografie se velice často používá v kombinaci s NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroskopií. Díky této metodě můžeme také určit složení a struktury molekul zkoumaných látek, tedy i prostorové struktury menších proteinů [60,61].

Principem této fyzikálně-chemické metody je interakce atomových jader s magnetickým polem, kde se zkoumají energie jaderných spinů v tomto poli společně s přechody mezi spinovými stavy, které vznikají na základě radiofrekvenčního záření [61,62,63].

Tedy NMR spektroskopie se zabývá chováním atomového jádra v magnetickém poli. Jádro atomu je složeno z kladně nabitého protonu a elektricky neutrálního neutronu. Obě tyto částice mají důležitou vlastnost, tzv. spin. Jednoduše řečeno se jedná o rotační pohyb dané částice. Hodnota spinu protonu nebo neutronu je buď $+1/2$ nebo $-1/2$. Součet spinů všech částic v jádře se nazývá jaderný spin. Pomocí této vlastnosti víme, zdali je nebo není atomové jádro vhodné pro NMR spektroskopii [61,64].

4.5.1 Interakce jaderného spinu s magnetickým polem

V základním stavu, tedy bez působení magnetického pole, jsou spiny uspořádány náhodně a mají stejnou energii. Jakmile na ně začne magnetické pole působit, rozdělí se na dvě hladiny. Jedna hladina bude mít nižší energii oproti základnímu stavu a druhá naopak vyšší. Nadbytek spinů bude na hladině o nižší energii. Čím bude vnější magnetické pole silnější, tím bude i větší rozštěpení hladin a také větší rozdíl v populaci jednotlivých hladin [64].

Pokud bychom chtěli ozářit takto rozštěpený spinový systém radiofrekvenčním zářením, dojde k absorpci a excitaci jednotlivých spinů na vyšší hladinu. Po ukončení ozáření dojde k deexcitaci, která se následně měří [64].

4.5.2 Konstrukce NMR spektrometru

K tomu, aby byla intenzita NMR signálu co největší, je nutné použití velmi silného magnetického pole. Takto silné magnetické pole je získáno pomocí solenoidu ze supravodivého materiálu. Cívka je ponořena do kapalného hélia, protože tyto supravodiče ke svému provozu vyžadují velmi nízké teploty (-269°C a méně). Cívku tvoří několik tisíc závitů a teče jí proud o velikosti 100 A. Pole generované touto cívkou je 4-18 T. Jelikož se jedná o cívku bez odporu, stačí ji nabít pouze jednou a to při instalaci přístroje [61,62,63].

Z důvodů vysokých nákladů na kapalné hélium, je dewarova nádoba s cívkou uložena do vnější dewarovy nádoby s kapalným dusíkem. Izolace mezi nádobami a pláštěm magnetu je vytvořena vakuem [63].

4.5.3 Měření

Spektra NMR se měří dvěma způsoby:

- a) u starších přístrojů byla postupně měřena spektra bod po bodu, tzv. CW-NMR (Continuous-Wave NMR – po sobě jdoucí vlny/spektra). Postup byl ale velice zdoluhavý a neumožňoval akumulaci spekter a dal se použít pouze pro jádra s vysokou citlivostí a pro koncentrované roztoky [62],
- b) dnešní přístroje výhradně měří metodou FT-NMR (NMR s Fourierovou transformací). Jedním radiofrekvenčním pulsem (nebo sekvencí pulsů) jsou excitovány všechny jaderné spiny a měří se následná deexcitace. Získá se tak tzv. FID (Free Induction Decay), z něhož se pomocí Fourierovy transformace (FT – Fourier Transform) získá NMR spektrum [62].

Spektra NMR spektrometru mají signály, tzv. píky, které jsou charakterizovány chemickým posunem a intenzitou. Tato intenzita odpovídá kvantitě daného spinu v systému a chemický posun dává informace o chemickém okolí měřeného jádra [61,62].

4.5.4 Magnetické interakce jader

Jestliže se objeví v molekule několik NMR aktivních jader, může dojít k interakci jaderných spinů. Ty se ve spektru projeví jako rozštěpení píky na složitější soustavu. Interakce mohou být buď přímé (dipól-dipól, šíří se přes prostor) nebo nepřímé (spin-spin, pomocí vazebných elektronů). Interakce se projevují pouze mezi neekvivalentními jádry [61,64].

4.5.5 Protein data bank (PDB)

Tato PDB (proteinová datová banka) databáze, která obsahuje 3-D struktury makromolekul jako jsou proteiny a nukleové kyseliny, patří mezi nejdůležitější zdroje informací o daných strukturách pro molekulární biologii, farmacii a také medicínu. Struktury jsou volně přístupné a vkládat je může kdokoliv na základě svých měření pomocí X-ray krystalografie a NMR. Tím ale nastává problém, kdy vložená data mohou být chybná, a proto vznikla v roce 2003 organizace PDB (Worldwide PDB), která záznamy kontroluje, zdali jsou správné [65].

Samotná databáze vznikla v roce 1971 a založil jí doktor Walter Hamilton. Postupem času do ní byly přidávány struktury rychlostí cca 7 struktur za týden, ale díky vývoji

technologií je to v dnešní době kolem 50 struktur týdně. Každá struktura je poté dohledatelná pomocí určitého kódu, který je čtyřmístný [65].

4.6 2-D elektroforéza proteinů

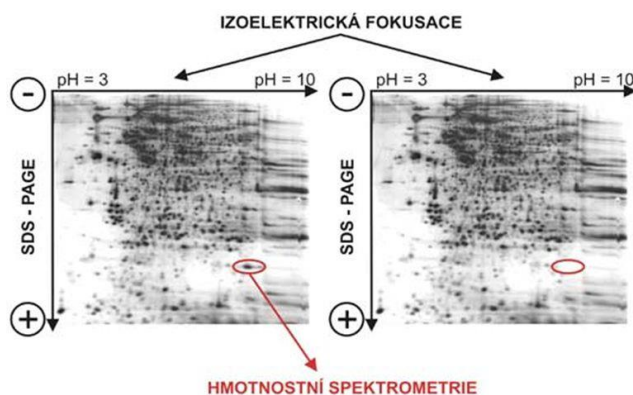
Principem elektroforézy je dělení látek na základě jejich rozdílné hmotnosti nebo rozdílném elektrickém náboji. Zkoumané látky se poté jinak pohybují v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic v tomto poli je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti, tvaru a koncentraci dané látky v roztoku. Samotná rychlost se poté nechá vyjádřit pomocí vzorce [19,34]:

$$\frac{v}{E} = C \cdot \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0}{\eta} \cdot \zeta$$

Jednou z používaných druhů elektroforéz je dvojrozměrná elektroforéza proteinů, která je schopna rozlišit až deset tisíc proteinů. Nejdříve dochází k rozdělení bílkovin podle jejich izoelektrického bodu (pI) v pH gradientu a poté následuje rozdělení na základě jejich velikosti v polyakrylamidovém gelu. 2-D elektroforéza k tomuto ději využívá dvou po sobě následujících elektroforetických metod – izoelektrickou fokusaci a SDS-PAGE elektroforézu [19,34,35,36].

Metoda je tak citlivá, že může dojít k rozdělení i takových proteinů, které se od sebe liší i o jediný náboj. Výsledkem je vznik dvojrozměrné mapy, kterou můžeme po skenování katalogizovat a využít jako identifikační nástroj (obrázek č. 4) [19,34].

Dvojrozměrná elektroforéza (2-DE)



Obr. 4 Ukázka vzniklé dvojrozměrné mapy [34].

4.6.1 Izoelektrická fokusace

Pomocí této metody jsou látky separované dle svých izoelektrických bodů (pI). Rozdělení probíhá na základě migrace bílkovin a to v prostředí proměnlivého pH. Pokud je prostředí alkalické, tak samotné proteiny mají záporný náboj a migrují směrem k anodě. Naopak v kyselém prostředí jsou náboje proteinů kladné a směr jejich migrace je ke katodě. Ve chvíli, kdy je pH rovné izoelektrickému bodu, tedy je neutrální, se proteiny přestávají pohybovat a jejich náboj je nulový [34,36].

Metoda se nejčastěji provádí na polyakrylamidovém gelu buď s imobilizovaným pH gradientem nebo v kapiláře, kde je gradient tvořen směsí nízkomolekulárních amfolytů. Gel je připojen ke zdroji napětí, což způsobí migraci proteinů přímo k místu izoelektrického bodu, kde se fokusují (soustřeďují) [34,36].

4.6.2 SDS-PAGE elektroforéza

Druhým krokem dvojrozměrné elektroforézy je tato metoda, která následuje po izoelektrické fokusaci ve směru kolmém. Proteiny se zde rozdělují dle svých molekulových hmotností [35,38].

Abychom mohli provést tento druhý krok, musí být vzorek denaturován pomocí SDS (dodecylsírán sodný) a současně dochází k zahřívání směsi. Denaturace se provádí buď zachováním disulfidických můstků (neredukující podmínky) anebo pomocí beta-merkapt ethanolu (případně dithiotreitolu). SDS také napomáhá proteinu k zajištění jeho záporného náboje tím, že se kolem něho obalí [35,38].

Další nezbytnou součástí SDS-PAGE elektroforézy je gel, který se skládá z polyakrylamidu ($-\text{CH}_2\text{CHCONH}_2-$). Koncentrace používaných gelů bývá v rozmezí 5 – 50%. K rozdělení menších proteinů se používají gely o vyšší hustotě. Dále bývá využíván také tzv. zaostřovací gel, jenž má nižší hustotu polyakrylamidu a nižší pH. V něm pak dochází k zaostření zkoumaného vzorku [35,38].

Systému pufrů, který je využit, se říká tzv. diskontinuální, což znamená, že pufr pro přípravu samotného gelu a ten, který se použije jako elektrolyt, jsou rozdílné. Mezi nejpoužívanější systém pufrů se řadí Laemmliho [35,38].

Samotný průběh elektroforézy je proveden tak, že denaturované proteiny jsou vneseny pipetou do jamek gelu, do kterého je po vnesení přiveden elektrický proud. Záporně nabitě proteiny ihned putují k anodě pomocí SDS. Rychlost migrace závisí na velikosti daného

proteinu. Konec elektroforézy bývá po několika hodinách. Nakonec, když došlo k rozdělení dle velikosti, je možné výsledek analyzovat několika způsoby:

- obarvení bílkovin pomocí Coomassie nebo stříbra (výsledek je porovnáván se standardem),
- pomocí hmotností spektrometrie analýza vyříznuté oblasti gelu,
- a nakonec proteiny mohou být přeneseny na membránu a pomocí Western blot analyzována [35,38].

4.7 Proteomika v současnosti

4.7.1 Shotgun

Tato metoda se řadí do kategorie metod sekvenování DNA, které pomáhají zjišťovat pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA. Díky rozvoji techniky v dnešní době, lze pomocí jedné analýzy identifikovat až několik tisíc proteinů [66,67,68].

Shotgun využívá ke svým experimentům tandemové hmotností spektrometrie společně s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS). Nejprve dojde k separaci molekul analyzované látky ve vhodné stacionární fázi. Následně jsou molekuly podrobeny fragmentační analýze v hmotnostním spektrometru. Získáme fragmentační spektra, která můžeme pomocí knihovny spekter nebo pomocí pravidel fragmentace látek identifikovat. Tato spektra obsahují sekvence aminokyselin, které jsou následně přiřazovány ke svým proteinům. Analýza takovýchto neznámých proteinů stále vyžaduje, aby před samotnou identifikací byly naštěpeny na co nejkratší úseky, které jsou nejvhodnější pro tandemovou hmotnostní spektrometrii. Jednou z nejčastějších metod, které se využívají v shotgun analýzách, je štěpení pomocí proteázy trypsinu [66,67,68].

Než začneme proteiny analyzovat pomocí kapalinové chromatografie, je nutné štěpení na peptidy. Samotná separace těchto peptidů probíhá nejčastěji v kapalinovém chromatografu na reverzních fázích. Nakonec proběhne výsledná identifikace proteinu pomocí vhodného počítačového softwaru [66,67,68].

4.7.2 LC peptidů

Když se vrátíme trochu do minulosti, zhruba v 50. letech minulého století začaly stoupat nároky na stanovování látek v komplexních matricích. Týkalo se to především analýzy biologicky aktivních látek (bílkovin). Z tohoto důvodu se začaly rozvíjet multidimenzionální separace. V těchto separacích je použito více metod a každá metoda

využívá jiné vlastnosti purifikované či analyzované látky. Výsledkem by měla být lepší rozlišitelnost separovaných látek [69].

Aby mohly být multidimenzionální separace úspěšně provedeny, musí splňovat dvě základní podmínky:

- orthogonální separační mechanismy (musí být úplně nezávislé v každé dimenzi),
- rozlišení separace nesmí být provedeno v první dimenzi tak, aby kterákoliv složka tohoto rozlišení byla ztracena v některých z následných dimenzí [69].

Vzorek se vždy používá celý, ne jen část z něho, a může dojít k jeho úplné separaci až na malé segmenty píků v chromatografických technikách. Samozřejmě hlavní znalost samotného složení vzorku bývá vždy výhodou [69].

4.7.2.1 *Princip*

Kapalinová chromatografie (LC – Liquid Chromatography) patří mezi chromatografické metody, jejíž mobilní fázi tvoří kapalina. Od plynové chromatografie se liší v separaci vzorku, o které rozhoduje nejen jejich interakce se stacionární fází, ale také je ovlivněna použitou mobilní fází. Při samotné separaci se pak analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi [29].

To, jak dlouhou dobu stráví analyt v jedné či druhé fázi, závisí na jeho afinitě ke každé fázi. U LC metody jsou použity všechny druhy separací (adsorpce, rozdělení na základě odlišných rozpustností, iontová výměna, molekulově síťový efekt a specifická interakce v afinitní chromatografii) [29].

Výhodou kapalinové chromatografie je, že při práci při laboratorní teplotě nemusíme převádět vzorek na jiný skupenský stav, tudíž můžeme pracovat i s tepelně nestabilními a netěkavými sloučeninami [29].

4.7.3 **Kvantitativní metody**

a) iCAT

Moderní metoda iCAT (Isotope-Coded Affinity Tags – izotopově kódované reagenty) je složena z chemických reagentů iCAT a tandemové hmotnostní spektrometrie. Reagenty se skládají z těchto částí:

- biotin (afinitní značka), která se používá k izolování označených peptidů,
- tzv. linker, který začleňuje stabilní isotopy,
- reaktivní skupina, která je specifická k thiolovým skupinám [70].

Používané reagenty mohou být buď tzv. těžké, ty obsahují osm atomů deuteria v struktuře, anebo v tzv. lehké formě, která obsahuje pouze vodíky [70].

Nejdříve dojde k reakci analyzovaného vzorku proteinu s lehkou formou reagentu a poté až s těžkou formou. Každá forma zvlášť reaguje s jiným stavem buňky. Samotný reagent se poté naváže pomocí kovalentní vazby na každý cysteinový zbytek všech proteinů ve vzorku. Následuje smíchání vzorků a jejich enzymatické štěpení na peptidové fragmenty. Ty fragmenty, které jsou s reagentem na cysteinu, se poté izolují pomocí avidinové afinitní chromatografie. Nakonec se izolované peptidy separují reverzně fázovou chromatografií, po které přichází na řadu analýza tandemovou spektroskopií [70].

Na výsledném spektru můžeme odečíst dvojici peptidů, které mají stejnou frekvenci, ale liší se od sebe poměrem m/z. Jinak řečeno, mají různou isotopickou formu reagentu (buď těžkou anebo lehkou) [70].

b) iTRAQ

Principem metody iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation), neboli metody izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci, je značení peptidů, jenž obsahují volnou α amino skupinu (odpovídá N-terminálním peptidům a lysinu), chemicky. Tyto peptidy vznikly proteinovým štěpením bílkovin, které byly izolovány z buněk. Toto značení se provádí pomocí sady čtyř izobarických iTRAQ reagentů specifických k amino skupině a jenž jsou složeny z:

- tzv. reportérové skupiny, která je složena z N-methylpiperazinu,
- balanční skupiny, jež obsahuje skupinu karbonylovou,
- a skupinu reagující se samotnými peptidy, která se skládá z N-hydroxysukcinimid esteru [71].

Balanční složka společně s reportérovou skupinou molekuly jsou udržovány o konstantní hmotnosti pomocí izotopů (s atomy obohacenými ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O). Při tom se zabrání problémům, které by nastaly při chromatografické separaci u obohacení zahrnujících

deuterium. Potíže jsou v tom, že vzorek značený deuteriem má jinou hmotnost než vzorek bez deuteria a tudíž i jinou mobilitu v koloně [71].

Postup metody spočívá v redukci izolovaných bílkovin, jejich alkylaci a štěpení trypsinem odděleně a zároveň i souběžně. Vzorků nebývá víc jak ze čtyř buněk. Izolované peptidy jsou následně značeny reagenty iTRAQ, které tvoří vazbu s kteroukoliv aminovou skupinou daného peptidu. Vzorky, které jsou již označeny, se smíchají a rozdělí na frakce nejprve ionexovou chromatografií a dále reverzně-fázovou chromatografií. Poté přijde na řadu hmotnostní spektrometrie, kde se zobrazí každý jeden pík daného peptidu ze všech 4 vzorků, což způsobí konstantní hmotnost všech reagentů [71].

Při tandemové spektroskopii se značka izotopu rozštěpí tak, aby reportérová skupina nesla náboj a balanční skupina nenesla. Tím nedojde k jejímu zaznamenání. To se projeví odlišnou hmotností daných reagentů. Výsledné spektrum ukazuje čtveřici peptidů o stejné sekvenci, ale odlišné v hmotnosti dle typu použité značky. Pomocí poměru ploch píků se určí množství dané bílkoviny obsažené ve čtyřech různých stavech buňky. Identifikace peptidů se provádí na základě jejich sekvence, identifikované fragmentace peptidu a nakonec odečtem hmotností fragmentů [71].

c) SILAC

Zkratka této metody SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) se do češtiny překládá jako stabilními izotopy označené aminokyseliny v buněčné kultuře [72].

Některé aminokyseliny (tzv. esenciální) si nemohou živé organismy sami syntetizovat. Tento problém je vyřešen přidáním těchto esenciálních aminokyselin do média. Analoga těchto aminokyselin jsou komerčně dostupná a dají se syntetizovat. Takto připravená analoga, která jsou izotopově značená, jsou zařazena do každého nově syntetizovaného proteinového řetězce. Po čase, kdy dojde k určitému počtu buněčného dělení, je každá aminokyselina nahrazena svými izotopově značenými analogy. A právě tento princip je využit u metody SILAC [72].

K pěstování buněčné kultury jsou využita dvě média. Jedno z médií obsahuje izotopicky značenou aminokyselinu, která je schopna se začlenit do bílkovinných řetězců. Média se pak od sebe odlišují stavem buňky. Až dojde k dostatečnému počtu buněčnému dělení, dojde ke sklizení proteinových populací z obou médií. Obě složky mohou být smíchány (izotopová značka je zakódována v sekvenci každého proteinu) a následně analyzovány pomocí gelové

elektroforézy nebo štěpením proteinu trypsinem s následnou analýzou pomocí LS-MS/MS [72].

Pomocí hmotnostní spektrometrie je stanoveno množství peptidů a to tak, že se porovnávají signály peptidů v různých stavech buňky. Množství samotného proteinu je analyzováno pomocí poměru ploch píků dvou peptidů o stejné sekvenci, jenže se od sebe odlišují pouze izotopovou značkou aminokyselin v řetězci [72].

d) Dimethylace

Dimethylace je relativní metoda kvantifikace a lze ji označit jako redukivní akylaci (methylaci). Patří mezi jednoduché chemické reakce primárních aminů s formaldehydem a kyanoborohydridem sodným (NaCNBH_3). Při reakci jsou všechny aminy převedeny na N-konec a ϵ -postranní řetězce lysinu na dimethyl. Dojde ke vzniku tzv. Schiffovy báze (reakce aminu s formaldehydem), která se ihned redukuje přidáním NaCNBH_3 . Důvodem použití přímo toho konkrétního redukčního činidla je větší stabilita v kyselém prostředí, z čehož vyplývá výhodnější využití u reakcí, jejichž pH kolísá od 5 do 9. Další výhodou použití NaCNBH_3 je, že není schopen redukovat aldehydy a ketony, ale pouze Schiffovy báze. Z reakce tedy odpadají nechtěné postranní reakce a zvýší se začlenění samotného formaldehydu do proteinů. Dále stojí za zmínku, že reakce neumožňuje redukci disulfidických vazeb nebo tzv. „cross-linkování“ formaldehydem (vznik methylenové vazby mezi bílkovinami a nukleovými kyselinami) [73].

Nejdříve tedy dojde k navázání methylenové značky na N-konec a postranní řetězec lysinu. Vysvětlením je, že při použití trypsinu ke štěpení proteinových vzorků, peptidy, které vznikají při štěpení za argininem, mají jednu značku (na jejich N-konci), a ty které vznikají za lysinem, obsahují značky dvě (na N-konci a postranním řetězci lysinu) [73].

e) AQUA

AQUA (Absolute Quantification of Abundance) metoda se používá pro kvantifikaci proteinů a zároveň pro jejich postranslační modifikace. Můžeme také touto metodou analyzovat minoritní proteiny v komplexních směsích. AQUA totiž patří mezi vysoce citlivé metody [74].

Princip metody spočívá v organické syntéze izotopově značených peptidů (^{13}C , ^{15}N), interních standardů odpovídajících peptidům, které vznikly proteolytickým štěpením

analyzovaného proteinu. Výběr vhodného peptidu se provádí pomocí experimentálního stanovení, při kterém jsou optimalizované podmínky. Poté se srovnávají intenzity vybraných iontů u vybraného peptidu a jeho inertního standardu. Abychom dosáhli absolutní kvantifikace daného proteinu, musí být sestavena kalibrační křivka připraveného standardu [74].

U této metody musíme znát přesnou sekvenci stanovovaných proteinů. Čím vyvstává nevýhoda, že nemůžeme sledovat globální změny u neznámých proteinů a peptidů ve vzorku. Další nevýhoda je, že dané peptidy by neměly ve své struktuře obsahovat methionin nebo tryptofan, protože se oxidují během ionizace elektrosprejem [74].

4.7.4 Label Free

Label Free („označovací“) metody se zabývají srovnávací analýzou proteinového množství bez využití izotopových značek. Její použití bývá v případech, kdy metody, které jsou založeny na izotopovém značení, nejsou proveditelné nebo v daném případě praktické. Reagenty většinou bývají i drahé. Výhodou těchto metod je, že na rozdíl od eliminací, které mají mnohakrokový postup označování, nevedou ke špatné reprodukovatelnosti a ztrátě cílového peptidu. Na druhou stranu jsou Label Free metody málo přesné a náročné na zpracování dat [75].

Příprava vzorků probíhá odděleně a poté jsou vzorky analyzovány LC-MS/MS. Samotná relativní kvantifikace je poté založena na dvou principech [75]:

- měření intenzity, které se zakládá na změnách ploch nebo výšek peptidových píků v chromatografickém záznamu,
- „spectral count“ princip, kdy se porovnává počet identifikovaných MS/MS spekter ze stejného proteinu v každém z mnoha LC-MS/MS [75].

Mezi Label Free metody patří:

a) PAI

Jednou z metod Label Free je PAI (Protein Abundance Index). Index absolutního množství bílkoviny se zjišťuje počtem pozorovaných a teoreticky pozorovatelných tryptických peptidů. Index PAI je tedy poměr udávající předběžný odhad absolutního zastoupení proteinu v komplexní směsi. Přesnější je ale index, který je pozměněn na exponenciálně modifikovaný PAI – emPAI (exponenciální PAI mínus jedna) [76].

b) APEX

Další metodou je absolutní proteinová exprese (Absolute Protein Expression), která měří koncentraci proteinů v samotné buňce. APEX je založena na znalosti tryptických peptidů odhadnutých z experimentálních dat. Toho se pak využívá k hodnocení množství tryptických peptidů, které bylo očekáváno při analýze a porovnává se s experimentálními daty odhadovaného absolutního množství proteinů [75,76].

c) TOP3

Jiná metoda Label Free (Three Tryptic Peptides) využívá ke sledování MS signálu tři nejintenzivnější tryptické peptidy. Metoda předpokládá, že malé množství peptidů existuje pro každou bílkovinu proteomu a intenzita jejich MS signálu je zhruba stejná. Tedy, že intenzita tří nejcitlivějších peptidů v každé bílkovině může být využita jako míra proteinové abundance [75,76].

d) PISs

Poslední metoda analyzuje pseudo-interní standardy (PISs). To jsou proteiny, které při rozdílných podmínkách nemění svou úroveň exprese. Metoda je velice jednoduchá [75,76].

4.8 Klinická proteomika

Dalším odvětvím, ve kterém se proteomika objevuje a v dnešní době velice rozvíjí, je výzkum klinicky závažných oblastí. Patří sem identifikace klinických markerů. Marker je objektivně měřitelný a hodnotitelný proteinový indikátor důležitý pro diagnostiku, prognózu a sledování účinnosti farmakoterapie [77,78,79].

Aby byl klinický biomarker ideální, musí splňovat určité podmínky:

- vysoce citlivý (z toho vyplývá brzká diagnóza, terapie a vyšší možnost efektivní léčby),
- velká specifita (aby od sebe byly rozlišeny podobné nemoci),
- dostupný (závisí na odběru – krev nebo biopsie, snadné zpracování vzorku, celkové finanční náklady),
- validovaný a verifikovaný [79].

Samotný vývoj biomarkerů probíhá v pěti fázích podle Early Detection Research Network. Striktně musí být oddělena fáze identifikace kandidátního proteinu od jeho důkladného testování [77,78,79].

1. fáze – výzkumná (identifikace kandidátního proteinu),
2. fáze – ověření schopnosti kandidátů rozlišit mezi zdravým jedincem a postiženým jedincem,
3. fáze – ověření schopnosti detekce onemocnění bez jiných klinických příznaků (vzorky jsou dlouhodobě odebírány),
4. fáze – mapovací studie,
5. fáze definitivní plošná populační studie (ověření významu mapování na morbiditu a mortalitu cílové populace) [78,79].

Nejdůležitějším úkolem proteomiky je identifikace kandidátního proteinu (viz fáze 1, částečně fáze 2) a to tak, že z proteinů získaných z tkání (nebo tělních tekutin) nalézt marker (jeden protein). Zdroje těchto markerů bývají tělní tekutiny (krev – plasma/sérum, mozkomíšní mok, sinoviální tekutina, aspirát z prsu, plodová voda, sliny, slzy a moč) nebo tkáně (biopsie) [78,79].

5 Proteomika v medicíně

V současné době se proteomika snaží třemi způsoby vniknout do oboru medicíny:

- proteiny a vznik nemoci (exprese proteinů u nemocí),
- biomarkery nemocí (detekce proteinů vznikajících během nemoci je využita k diagnóze),
- vývoj nových léčiv (informace o proteinech způsobujících onemocnění je využita pro vývoj nových léků) [4,5,79].

Jako nejdůležitější se považuje identifikace samotných biomarkerů nemocí. Příkladem může být Alzheimerova choroba (amyloid β , tau protein), různá srdeční onemocnění (interleukin-6 a 8, sérový amyloid A, fibrinogen, troponin) nebo renální buněčný karcinom (karbonanhydrasa IX) [80,81,82].

5.1 Beta amyloid, tau protein

Likvorologická diagnostika, která se uplatňuje v diagnostice neurodegenerativních onemocnění mozku, využívá množství stanovení biomarkerů beta amyloidu, celkového tau

proteinu a fosforylovaného tau proteinu. Díky těmto stanovení můžeme odlišit Alzheimerovu chorobu od ostatních demencí [82].

Tau protein se fyziologicky podílí na stabilizaci sítě cytoskeletu neuronu a vazbou na mikrotubuly udržuje funkční transportní systém axonu. Tau protein se ve zvýšeném množství uvolňuje do likvoru. Toto uvolňování probíhá při akutním masivním (např. u ischemické cévní mozkové příhody) nebo subakutním či chronickým rozpadu neuronů. Dojde k tzv. atrofickodegenerativnímu procesu [80].

Beta amyloid vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu, jenž je fyziologickou součástí buněčné membrány. Rozlišujeme dvě hlavní izoformy:

- kratší forma končící valinem 40 (Ab-40),
- delší forma končící na alaninu 42 (Ab-42) [81].

Forma Ab-40 za fyziologických podmínek převažuje a je tělem vylučována. Naopak forma Ab-42 agreguje rychleji a je počáteční a dominující formou beta amyloidu uloženého v placích. Hladina Ab-42 bývá u Alzheimerovy choroby snižena [81].

Abychom definitivně určili diagnózu této choroby, provádí se stanovení pomocí dvojkombinace Ab-42 a celkového tau proteinu. Stanovení těchto biomarkerů nám pomůže nejen k diagnostice, ale také v monitoringu onemocnění a hodnocení účinnosti léčby [80,81,82].

6 Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřila a zkonkretizovala pojmy proteomika, genomika a stručně popsala strukturu proteinů.

Byly popsány jednotlivé metody studia struktury proteinů. Uvedeny byly metody jako metody separační, hmotnostní spektrometrie, peptidové mapování, rentgenová krystalografie. Také bylo poukázáno na nové trendy v této oblasti, SHOT-GUN, Label Free a metody kvantitativní (iCAT, iTRAQ, atd.).

Nakonec zde bylo zmíněno využití proteomiky v klinické a medicínské oblasti, především ve vývoji stanovení biomarkerů nemocí.

7 Zdroje

- 1) LIEBLER, D. *Introduction to proteomics: tools for the new biology*. Springer Science & Business Media, 2001.
- 2) TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. *Nature*, 2003, 422.6928: 193-197.
- 3) PANDEY, A; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, 405.6788: 837-846.
- 4) PLEBANI, M. Proteomics: the next revolution in laboratory medicine?. *Clinica chimica acta*, 2005, 357.2: 113-122.
- 5) BANKS, R. E., a ďalší. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *The Lancet*, 2000, 356.9243: 1749-1756.
- 6) ELMORE, D. T. *Peptides and proteins*. London: Cambridge U.P., 1968, xi, 154 s. ISBN 0521071070.
- 7) STRYER, L. *Biochemistry*. San Francisco: W. H. Freeman, 1975, xii, 877 s. ISBN 071670174x.
- 8) AUDIGIÉ, C., ZONZAIN, F. *Biochimie structurale*. Nouv. éd. Paris: Doin, 1991. ISBN 2704006555.
- 9) WEISSBACH, H., PESTKA, S. *Molecular mechanisms of protein biosynthesis*. New York: Academic Press, 1977, xiii, 720 s. ISBN 0127442502.
- 10) NEUBERGER, A.; DEENEN, L. L. *Protein metabolism*. New York: Elsevier Scientific Pub. Co., 1982, xxii, 593 s. Comprehensive biochemistry, v. 19B, pt. 2. ISBN 0444803467.
- 11) BLAŽEJ, A. *Štruktúra a vlastnosti vláknitých bielkovín*. Bratislava: Veda, 1978, 453 s. ISBN 7115678.
- 12) LEHNINGER, A. L.; PETERS, G.; NEUBERT, D. *Prinzipien der Biochemie*. Berlin: De Gruyter, 1987, 1117 s. ISBN 3110089882.
- 13) MAY, C., a ďalší. Instruments and methods in proteomics. *Data Mining in Proteomics: From Standards to Applications*, 2011, 3-26.
- 14) ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*, 1996, 17.3: 443-453.
- 15) SMITH, I. a ďalší. *Chromatography*. Elsevier, 2013.
- 16) SMEJKAL, G. B. a ďalší. *Separation methods in proteomics*. CRC Press, 2005.

- 17) AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422.6928: 198-207.
- 18) BRADSHAW, R. A. Proteomics today, proteomics tomorrow. In: *Proteomics: Biomedical and Pharmaceutical Applications*. Springer Netherlands, 2004. p. 1-17.
- 19) HAMDAN, M. H.; RIGHETTI, P. G. *Proteomics today: protein assessment and biomarkers using mass spectrometry, 2D electrophoresis, and microarray technology*. John Wiley & Sons, 2005.
- 20) ITO, Y. Centrifugal precipitation chromatography: principle, apparatus, and optimization of key parameters for protein fractionation by ammonium sulfate precipitation. *Analytical biochemistry*, 2000, 277.1: 143-153.
- 21) SHERMA, J. a další. *Handbook of thin-layer chromatography*. CRC press, 2003.
- 22) ZLATKIS, A.; KAISER, R. E. *HPTLC-high performance thin-layer chromatography*. Elsevier, 2011.
- 23) MEYER, V. R. *Practical high-performance liquid chromatography*. John Wiley & Sons, 2013.
- 24) KARASEK, F. W.; CLEMENT, R. E. *Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques*. Elsevier, 2012.
- 25) GROB, R. L. a další. *Modern practice of gas chromatography*. John Wiley & Sons, 2004.
- 26) CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends in Biotechnology*, 1994, 12.8: 296-303.
- 27) JANSON, J. *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. John Wiley & Sons, 2012.
- 28) DETERMANN, H. *Gel Chromatography Gel Filtration· Gel Permeation· Molecular Sieves: A Laboratory Handbook*. Springer Science & Business Media, 2012.
- 29) STRIEGEL, A. *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. John Wiley & Sons, 2009.
- 30) NACHOD, F. C. *Ion exchange: theory and application*. Elsevier, 2012.
- 31) HADDAD, P. R. Ion chromatography. *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, 1994, 135.
- 32) CUATRECASAS, P.; ANFINSEN, C. B. Affinity chromatography. *Annual review of biochemistry*, 1971, 40.1: 259-278.
- 33) WESTERMEIER, R. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. John Wiley & Sons, 2016.

- 34) ISSAQ, H. J.; VEENSTRA, T. D. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*, 2008, 44.5: 697.
- 35) WALKER, J. M. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *The protein protocols handbook*, 2009, 177-185.
- 36) RIGHETTI, P. G. *Isoelectric focusing: theory, methodology and application*. Elsevier, 2000.
- 37) STREGE, M. A.; LAGU, A. L. *Capillary electrophoresis of proteins and peptides*. Springer Science & Business Media, 2004.
- 38) HAMES, B. D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. OUP Oxford, 1998.
- 39) GERSTEN, D. *Gel electrophoresis--proteins: essential techniques*. New York: John Wiley, 1996, xi, 177 s. ISBN 0471962651.
- 40) EVERAERTS, F. M.; BECKERS, J. L.; VERHEGGEN, T. P. a další. *Isotachopheresis: theory, instrumentation and applications*. Elsevier, 2011.
- 41) HEEGAARD, N. H. Affinity in electrophoresis. *Electrophoresis*, 2009, 30.S1: S229-S239.
- 42) GROSS, J. H. Mass spectrometry, A. A Textbook. *SpringerVerlag Berlin Heidelberg*, 2004.
- 43) DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 2006, 312.5771: 212-217.
- 44) MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry*, 2001, 70.1: 437-473.
- 45) HARRISON, A. G. *Chemical ionization mass spectrometry*. CRC press, 1992.
- 46) TANAKA, K. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1988, 2.8: 151-153.
- 47) BONK, T.; HUMENY, A. MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *The Neuroscientist*, 2001, 7.1: 6-12.
- 48) KINTER, M.; SHERMAN, N. E. *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*. John Wiley & Sons, 2005.
- 49) YATES, J. R. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Analytical biochemistry*, 1993, 214.2: 397-408.

- 50) HENZEL, W. J.; WATANABE, C.; STULTS, J. T. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2003, 14.9: 931-942.
- 51) CHYMOTRYPSIN, B.; PEPSIN, C. Peptide Mapping of Proteins. *Methods of Biochemical Analysis*, 2009, 26: 165.
- 52) CLEVELAND, D. W. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252.3: 1102-1106.
- 53) SMYTH, M. S.; MARTIN, J. H. J. X-Ray crystallography. *Journal of Clinical Pathology*, 2000, 53.1: 8.
- 54) SCHOTTE, F. Watching a protein as it functions with 150-ps time-resolved x-ray crystallography. *Science*, 2003, 300.5627: 1944-1947.
- 55) WILSON, A. J. C. *Elements of X-ray Crystallography*. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley, 1970.
- 56) DRENTH, J. *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer Science & Business Media, 2007.
- 57) KLUG, H. P. *X-ray diffraction procedures*. New York: Wiley, 1954.
- 58) CULLITY, B. D. Chemical analysis by X-ray diffraction. *Elements of X-ray diffraction*, Addison-Wesley, Massachusetts, 2001, 397-420.
- 59) KONINGSBERGER, D. C.; PRINS, R. *X-ray absorption: principles, applications, techniques of EXAFS, SEXAFS, and XANES*. John Wiley & Sons, 1988.
- 60) BRÜNGER, A. T. X-ray crystallography and NMR reveal complementary views of structure and dynamics. *Nature structural biology*, 1997, 4: 862.
- 61) HORE, P. J. *Nuclear magnetic resonance*. Oxford University Press, USA, 2015.
- 62) EMSLEY, J. W.; FEENEY, J.; SUTCLIFFE, L. H. *High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Elsevier, 2013.
- 63) ANDREW, E. R. *Nuclear Magnetic Resonance*, by ER Andrew, Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2009, 2009, 1.
- 64) LEVITT, M. H. *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*. John Wiley & Sons, 2001.
- 65) BERMAN, H. M. The protein data bank. *Nucleic acids research*, 2000, 28.1: 235-242.
- 66) MESSING, J.; CREA, R.; SEEBURG, P. H. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic acids research*, 1981, 9.2: 309-321.

- 67) MACCOSS, M. J. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99.12: 7900-7905.
- 68) VENTER, J. C. Shotgun sequencing of the human genome. *Science*, 1998, 280.5369: 1540-1542.
- 69) ZHANG, X. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics—A review. *Analytica chimica acta*, 2010, 664.2: 101-113.
- 70) HAN, D. K. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nature biotechnology*, 2001, 19.10: 946-951.
- 71) CHONG, P. K. Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) reproducibility: Implication of multiple injections. *Journal of proteome research*, 2006, 5.5: 1232-1240.
- 72) EVERLEY, P. A. Quantitative cancer proteomics: stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3.7: 729-735.
- 73) TOLONEN, A. C.; HAAS, W. Quantitative proteomics using reductive dimethylation for stable isotope labeling. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2014, 89: e51416-e51416.
- 74) LUNDGREN, D. H. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert review of proteomics*, 2010, 7.1: 39-53.
- 75) TATE, S. Label-free quantitative proteomics trends for protein–protein interactions. *Journal of proteomics*, 2013, 81: 91-101.
- 76) ISHIHAMA, Y. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, 4.9: 1265-1272.
- 77) LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C.; PETRICOIN, E. F. Clinical proteomics: personalized molecular medicine. *Jama*, 2001, 286.18: 2211-2214.
- 78) CALVO, K. R.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Clinical proteomics: from biomarker discovery and cell signaling profiles to individualized personal therapy. *Bioscience reports*, 2005, 25.1-2: 107-125.
- 79) JOHANN, D. J. Clinical proteomics and biomarker discovery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, 1022.1: 295-305.

- 80) BUÉE, L. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*, 2000, 33.1: 95-130.
- 81) HARTMANN, T. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A β 40/42 amyloid peptides. *Nature medicine*, 1997, 3.9: 1016-1020.
- 82) BOYD-KIMBALL, D. Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid β -peptide (1–42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2005, 132.2: 313-324.