

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Kvantifikace proteinových vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím
stabilních izotopových značek

Bc. Iva Vykydalová

Diplomová práce
2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Iva Vykydalová**
Osobní číslo: **C19556**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Kvantifikace proteinových vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím stabilních izotopových značek**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- 1) Stručný popis metod analýzy proteinů s využitím separačních technik a hmotnostní spektrometrie
- 2) Přehled metod chromatografické frakcionace peptidů před vlastní LC-MS analýzou
- 3) Srdeční choroby a jejich proteomická analýza
- 4) Přehled metod pro kvantifikace proteinů v klinicky relevantních vzorcích
- 5) Principy značení proteinových a peptidových vzorků pomocí stabilních izotopových značek
- 6) Přehled softwarových nástrojů používaných pro kvantitativní proteomickou analýzu

Experimentální část:

- Příprava vzorků pro analýzu – úprava proteinového vzorku a tryptické štěpení proteinů
- Příprava kapilárních kolonek s vhodnou chromatografickou fází (reverzní fáze, HILIC, SCX) pro frakcionaci a odsolení peptidických vzorků
- Značení peptidů stabilními izotopovými značkami
- Chromatografická purifikace nebo frakcionace peptidů mikrogradientovým zařízením
- Optimalizace chromatografické frakcionace peptidů mikrogradientovým zařízením na SCX fázi
- Analýza peptidických vzorků pomocí kombinace kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
- Vyhodnocení získaných experimentálních dat a jejich interpretace

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Využití všech dostupných databází Web of Science, NCBI, PubMed, Google Scholar, atd. pro vyhledávání literárních údajů podle pokynů školitele.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Rudolf Kupčík, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultanti diplomové práce: **RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.**
Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany

Mgr. Věra Vozandychová
Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích 4.5.2021

Bc. Iva Vykydalová

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Věře Vozandychové a RNDr. Pavlu Řehulkovi, Ph.D. z Katedry molekulární patologie a biologie fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové za velmi vstřícný přístup, věnovaný čas při pomoci v laboratoři a poskytnuté konzultace, které byly pro vypracování této diplomové práce velice přínosné. Dále bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Rudolfu Kupčíkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při psaní této práce. V neposlední řadě děkuji mé rodině za soustavnou podporu během celého studia.

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá relativní kvantifikací proteinů s využitím stabilních izotopových značek ve vzorcích lidské plazmy pacientů s dilatační kardiomyopatií. Experimentální část práce představuje komparativní proteomickou analýzu zahrnující přípravu proteomického vzorku k analýze – deplece abundantních proteinů, denaturace, redukce, alkylace a acetonová precipitace, tryptické štěpení a značení vzorků izobarickými TMT-sixplex značkami. Takto připravené vzorky byly podrobeny frakcionaci, která byla provedena třemi různými chromatografickými technikami, a to v manuálním uspořádání využívající plynotěsnou mikrostríkačku a příslušnou kapilární kolonku. Kromě již zavedených technik manuální frakcionace peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí a hydrofilní interakční chromatografie byla optimalizována třetí frakcionační technika – iontoměničová chromatografie na silném katexu. Získané frakce byly proměřeny nejprve pomocí LC-UV a následně LC-MS/MS analýzy. K bioinformatickému zpracování dat byl využit software Proteome Discoverer. Některé proteiny s identifikovanou změnou zastoupení mezi analyzovanými skupinami byly popsány.

Klíčová slova

Manuální frakcionace, TMT-sixplex, SCX, hmotnostní spektrometrie, bioinformatika

Annotation

This diploma thesis deals with the relative quantification of proteins using stable isotope labeling in human plasma samples in patients with dilated cardiomyopathy. The experimental part presents a comparative proteomics analysis including preparation of a proteomic sample for analysis (depletion of abundant proteins, denaturation, reduction, alkylation and acetone precipitation), tryptic digestion and labeling of samples with TMT-sixplex labels. Prepared samples were fractionated by three different chromatographic techniques, in an manual arrangement using a gastight microsyringe with a suitable capillary column. In addition to the already established techniques of manual fractionation of peptides on the reverse phase in a basic environment and hydrophilic interaction chromatography, the third fractionation technique – strong exchange chromatography was optimized. The obtained fractions were measured first by LC-UV and subsequently by LC-MS/MS analysis. Proteome Discoverer software was used for bioinformatics data postprocessing. Several proteins with identified abundance changes between the analyzed groups were reported.

Keywords

Manual fractionation, TMT-sixplex, SCX, mass spectrometry, bioinformatics

OBSAH

Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	13
Seznam zkratk	14
Úvod a cíle diplomové práce	16
1 Teoretická část.....	17
1.1 Proteomická analýza.....	17
1.2 Proteomické přístupy	17
1.2.1 Bottom-up proteomika.....	17
1.2.2 Shotgun proteomika.....	18
1.2.3 Top-down proteomika	18
1.3 Příprava vzorku.....	19
1.3.1 Dezintegrace buněk a solubilizace proteinů	19
1.3.2 Deplece	19
1.3.3 Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku.....	20
1.3.4 Redukce, alkylace	20
1.3.5 Štěpení proteinů.....	20
1.3.6 Purifikace peptidické směsi	21
1.4 Separační techniky v proteomice.....	21
1.4.1 Elektroforetické separace	21
1.4.2 Chromatografické metody	22
1.5 Hmotnostní spektrometrie	24
1.5.1 Iontové zdroje využívané v proteomické analýze	25
1.5.2 Analyzátoři využívané v proteomické analýze.....	26
1.5.3 Detekce iontů v hmotnostně-spektrometrické analýze	28
1.6 Bioinformatické zpracování dat v proteomice.....	29
1.7 Kvantitativní proteomická analýza	30
1.7.1 Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza	31
1.7.2 Metabolické značení	31
1.7.3 Enzymatické značení	32
1.7.4 Chemické značení.....	33
1.7.5 Label-free techniky kvantifikace	35
1.8 Proteomická analýza klinicky významných srdečních chorob.....	36
1.8.1 Proteiny asociované se srdečními chorobami.....	37
1.8.2 Kardiomyopatie	38
2 Experimentální část	40

2.1	Technické a laboratorní vybavení, použité chemikálie a software.....	40
2.1.1	Technické vybavení.....	40
2.1.2	Laboratorní vybavení.....	40
2.1.3	Použité chemikálie.....	41
2.1.4	Software.....	41
2.2	Modelový vzorek komplexní peptidické směsi	41
2.3	Odběr a zpracování vzorků lidské plazmy	42
2.4	Deplece plazmy	42
2.5	Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA	43
2.6	Příprava gelu pro SDS-PAGE elektroforézu	44
2.7	SDS-PAGE elektroforéza	45
2.8	Štěpení a příprava vzorku	46
2.8.1	Denaturace, redukce, alkylace a acetonová precipitace.....	46
2.8.2	Štěpení trypsinem	46
2.8.3	Extrakce deoxycholátu sodného	47
2.9	TMT značení.....	47
2.10	Odsolení vzorku.....	48
2.11	Příprava mikrokolonek	48
2.12	Frakcionace peptidických vzorků	49
2.12.1	Manuální frakcionace peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí.....	49
2.12.2	Manuální frakcionace peptidů pomocí hydrofilní interakční chromatografie	52
2.12.3	Manuální frakcionace peptidů pomocí iontově výměnné chromatografie na silném katexu	54
2.13	Kapalinová chromatografie peptidů na reverzní fázi s UV detekcí.....	56
2.14	Kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí	57
2.15	Bioinformatické zpracování dat.....	58
3	Výsledky a diskuse	61
3.1	Deplece abundantních proteinů plazmy a stanovení koncentrace proteinů.....	62
3.2	Příprava peptidické směsi a její značení izobarickými značkami	63
3.3	Frakcionace vzorků.....	65
3.3.1	Mikrogradientová eluce	66
3.4	Optimalizace SCX mikrogradientové eluce	68
3.4.1	Optimalizace podmínek nanášení vzorku.....	69
3.4.2	Optimalizace mikrogradientu pro SCX	70
3.4.3	Závěr, nastínění další optimalizace	76
3.5	Aplikace frakcionačních metod na vzorky lidské plazmy	77
3.5.1	Analýza nefrakcionovaného vzorku	77

3.5.2	Bazická mikrogradientová eluce	78
3.5.3	HILIC.....	79
3.5.4	SCX mikrogradientová eluce.....	79
3.6	Vyhodnocení MS.....	80
3.6.1	Ověření účinnosti.....	81
3.6.2	Identifikace proteinů.....	81
3.6.3	Komparativní proteomická analýza.....	85
4	Závěr.....	87
5	Literatura	89
6	Přílohy	95

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Princip funkce Orbitrapu.	27
Obrázek 2: Klasifikace současných kvantitativních proteomických technik.	30
Obrázek 3: Struktura značky TMT ⁰	35
Obrázek 4: Princip značení pomocí TMT 6-plex značek.	35
Obrázek 5: První krok zpracování LC-MS/MS dat v programu Proteome Discoverer („Processing Step“).	59
Obrázek 6: Druhý krok vyhodnocení identifikačních dat v programu Proteome Discoverer („Consensus Step“).	59
Obrázek 7: Schématické znázornění experimentální práce.	61
Obrázek 8: Ukázka gelu z SDS-PAGE elektroforézy vzorků lidské plazmy před a po její depleci.	63
Obrázek 9: Znázornění 2 typů protokolů k TMT ⁰ značení.	65
Obrázek 10: Aparatury pro mikrogradientovou eluci.	67
Obrázek 11: Schéma frakcionace.	68
Obrázek 12: Volba vhodné mobilní fáze pro záchyt peptidů na stacionární fázi.	69
Obrázek 13: SCX jednoduchá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 30-120 mM HCOONH ₄	71
Obrázek 14: SCX jednoduchá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 30-110 mM HCOONH ₄	72
Obrázek 15: SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-150 mM HCOONH ₄	75
Obrázek 16: SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-113 mM HCOONH ₄	76
Obrázek 17: Nefrakcionovaný vzorek.	77
Obrázek 18: Bazická mikrogradientová eluce na vzorcích TMT značené plazmy. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.	78
Obrázek 19: HILIC mikrogradientová eluce na vzorcích TMT značené plazmy. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.	79
Obrázek 20: SCX trojitá mikrogradientová eluce na vzorkách TMT značené plazmy. Koncentrační gradient 0-113 mM HCOONH ₄	80
Obrázek 21: Intenzita TMT reportérových značek.	81

Obrázek 22: Počet zidentifikovaných proteinů u nefrakcionovaného vzorku a vzorků frakcionovaných.....	83
Obrázek 23: Vennův diagram nalezených proteinů jednotlivými technikami frakcionace.....	84
Obrázek 24: Vennův diagram nalezených peptidových skupin jednotlivými technikami frakcionace.....	84
Obrázek 25: Zjištěná souvislost mezi signifikantně změněnými proteiny.	86

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklady studií v oblasti srdeční proteomiky.	36
Tabulka 2: Objemy jednotlivých roztoků pro nalití 2 gelů.	44
Tabulka 3: Schéma pro přípravu mobilních fází pro manuální frakcionaci peptidů na reverzní fází v bazickém prostředí.	50
Tabulka 4: Tvorba mikrogradientu ve stříkačce pro manuální frakcionaci peptidů na reverzní fází v bazickém prostředí.	51
Tabulka 5: Schéma pro přípravu mobilních fází pro manuální frakcionaci peptidů pomocí hydrofilní interakční chromatografie.	53
Tabulka 6: Tvorba mikrogradientu ve stříkačce pro manuální frakcionaci peptidů pomocí hydrofilní interakční chromatografie.	53
Tabulka 7: Schéma pro přípravu mobilních fází pro manuální frakcionaci peptidů pomocí iontoměničové chromatografie na silném katexu.	55
Tabulka 8: Třífázová tvorba gradientu ve stříkačce, sbírání jednotlivých frakcí.	56
Tabulka 9: Porovnání dvou typů protokolů z hlediska úspěšnosti modifikace peptidů TMT ⁰ značkou.	64
Tabulka 10: Přehled variant pro jednoduchou gradientovou eluci.	70
Tabulka 11: Přehled variant pro trojitou gradientovou eluci.	73
Tabulka 12: Počet zidentifikovaných proteinových a peptidových skupin.	82
Tabulka 13: Signifikantně změněné proteiny zjištěné v softwaru Proteome Discoverer.	85

SEZNAM ZKRATEK

2-DE	dvourozměrná gelová elektroforéza
2D-DIGE	dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza
ACM	arytmogenní kardiomyopatie
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BCA	kyselina bicinchoninová
DCM	dilatační kardiomyopatie
DESI	ionizace desorpčním elektrosprejem
ESI	ionizace elektrosprejem
FT	vazebná frakce („flow-through“)
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
FW	proplach kolonky („final-wash“)
HCM	hypertrofická kardiomyopatie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAC	jodoacetamid
ICAT	izotopově kódované afinitní značky
IEF	izoelektrická fokusace
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MudPIT	technologie multidimenzionální proteinové identifikace
pI	izoelektrický bod
Q-TOF	kombinace kvadrupólového analyzátoru a analyzátoru doby letu
RCM	restriktivní kardiomyopatie
RPLC	kapalinová chromatografie na reverzní fázi

SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu dodecylsulfátu sodného
SCX	iontově výměnná chromatografie na silném katexu
TCEP	tris(-2 karboxyethyl)fosfin
TFA	kyselina trifluoroctová
TMT	tandemové hmotnostní značky („tandem mass tag“)
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá komparativní proteomickou analýzou lidské plazmy pro studium a diagnostiku dilatační kardiomyopatie s využitím chemického značení izobarickými značkami. Experimenty zde provedené jsou součástí grantového projektu zaměřeného na onemocnění dilatační kardiomyopatii (projekt ministerstva zdravotnictví České republiky č. NV19-02-00297). Převážná část experimentální práce byla zaměřena na izobarické značení, optimalizaci SCX frakcionace, LC-MS analýzu plazmatických vzorků a vyhodnocení komparativní proteomické analýzy.

Cíle této diplomové práce byly stanoveny následovně:

- deplece abundančních proteinů z lidské plazmy
- příprava proteinového vzorku a jeho enzymatické štěpení
- optimalizace izobarického značení pomocí TMT značek
- manuální chromatografická frakcionace peptidů na reverzní fázi a na HILIC fázi
- vývoj a optimalizace protokolu manuální chromatografické frakcionace peptidů na silném katexu
- příprava, digesce a izobarické značení patientských vzorků depletované plazmy, frakcionace peptidických směsí a jejich LC-MS analýza
- zpracování experimentálních dat v proteomickém software a vyhodnocení získaných výsledků

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Proteomická analýza

Proteomika je vědní disciplína zabývající se systematickým studiem *proteomu* – souborem proteinů, a to na úrovni funkční i strukturní, což je klíčové při studiu biologických procesů v organismu.

Proteomiku lze rozdělit do několika hlavních oblastí. *Expresní proteomika* porovnává míru tvorby proteinů v různých vzorcích, což se uplatňuje např. při hledání nových biomarkerů pro různá onemocnění. *Strukturní proteomika* studuje stavbu proteinů s cílem objasnit strukturní chování bílkovin v příslušném celku nebo organele. *Funkční proteomika* je rozsáhlá oblast, jejímž hlavním cílem je objasnit principy buněčné signalizace, mechanismu patogeneze onemocnění a interakcí proteinů s léčivými. *Diferenční proteomika* vychází z analýzy složitých proteinových směsí, přičemž hlavním úkolem je sledovat a charakterizovat změny v proteinovém složení během různých stavů organismu. Typicky se porovnává fyziologický a patologický stav [1].

Stěžejními analytickými technikami v proteomice jsou separační metody (především chromatografické a elektroforetické) a hmotnostní spektrometrie, díky níž je v současnosti možné analyzovat řádově tisíce proteinů v jednom vzorku. Další nezastupitelnou úlohu pak zde má bioinformatická analýza.

Neustálý vědecký pokrok vede k analytickým metodám se stále rostoucí citlivostí, jejichž cílem je identifikovat a (relativně) kvantifikovat proteiny v co nejnižších koncentracích. Uplatnění tak proteomika nachází například v hledání diagnostických a prognostických markerů onemocnění, objasňování mechanismu účinku léčiv a jejich toxicity a sledování účinnosti farmakoterapie.

1.2 Proteomické přístupy

Dle způsobu separace, identifikace a následné kvantifikace proteinových vzorků můžeme rozlišovat několik proteomických přístupů.

1.2.1 Bottom-up proteomika

Proteomický přístup *bottom-up* představuje postupy identifikace a kvantifikace proteinů v komplexních směsích. Nejdříve musí být proteiny izolovány ze směsi, následně jsou enzymaticky štěpeny na peptidy a v této podobě identifikovány hmotnostní spektrometrií [2,3].

Po enzymatickém štěpení a čištění jsou peptidové směsi separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a před vstupem do hmotnostního spektrometru jsou peptidy ionizovány elektrosprejem (ESI).

Proteomika typu bottom-up zvyšuje komplexitu vzorku a komplikuje tak analýzu dat. Výsledkem identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) jsou identifikované peptidy, nikoli proteiny, a proto musí být opět správně přiřazeny k odpovídajícím proteinům, ze kterých pocházejí [4].

1.2.2 Shotgun proteomika

Shotgun proteomika je speciální typ bottom-up strategie. Neseparovaná směs proteinů je nejprve naštěpena na peptidy specifickou endoproteázou. Peptidy jsou posléze separovány vhodnou metodou. Poté jsou proteiny nepřímo identifikovány hmotnostní spektrometrií. Ke štěpení proteinů se nejčastěji využívá trypsin, který štěpí řetězec proteinu za každým lysinem a argininem. Výsledkem tryptického štěpení je peptidová směs s průměrnou délkou 10-20 aminokyselin. Takto vznikne složitější vzorek a je vhodná několikastupňová separace, pro kterou jsou ale peptidy vhodnější než intaktní proteiny [3,5].

Tato strategie se sestává ze čtyř základních kroků. První je samotná příprava peptidického vzorku. Dalším krokem je separace peptidů a následně jejich analýza hmotnostní spektrometrií. Nakonec přichází na řadu softwarové nástroje k analýze a vyhodnocení dat.

1.2.3 Top-down proteomika

Top-down proteomika představuje postupy, kdy jsou proteiny izolovány ze směsi a zkoumány celistvé, tj. bez předchozího enzymatického štěpení. Je to technika obecně méně účinná než analýza peptidů, je ale možné díky kompletnímu pokrytí proteinových sekvencí studovat post-translační modifikace a specifické mutace proteinů. Poskytuje nejvyšší molekulární přesnost pro analýzu primární struktury díky zkoumání proteinů v jejich neporušeném stavu. K analýze proteinů je nezbytná vysokorozlišovací MS detekce, jako jsou např. lineární iontové pasti spolu s orbitální pastí či iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Pro ionizaci je nejvhodnější technika ionizace elektrosprejem.

Problémem při analýze celých proteinů je zejména vysoká molekulová hmotnost proteinů a trojrozměrná struktura, čímž se v mnoha případech výrazně komplikuje dělení v separačním systému a následná identifikace proteinu. Obecně je to technika méně citlivá, poměrně pracná, vyžaduje velké množství vzorku, a proto se v klinické praxi běžně neuplatňuje [6,7].

Alternativním přístupem k top-down proteomice je strategie *middle-down*. Jedná se o poměrně nový přístup využívající omezeného štěpení proteinů, kdy vznikají peptidy delší než u přístupu bottom-up, zhruba o délce 3-50 kDa. Tyto polypeptidové úseky umožňují částečnou charakterizaci velkých proteinů a větší specifitu proteoforem [2,6]. Uplatnění nachází zejména při zjednodušování experimentů, např. k oddělování lehkých a těžkých řetězců před analýzou hmotnostní spektrometrií [8].

1.3 Příprava vzorku

Při přípravě vzorku pro proteomickou analýzu je důležité vzít v úvahu typ vzorku, resp. biologického materiálu, cíl analýzy i plánované proteomické techniky. V následných podkapitolách budou představeny jednotlivé stěžejní kroky při přípravě proteomického vzorku.

1.3.1 Dezintegrace buněk a solubilizace proteinů

Proteiny lze obecně získat z několika forem vstupního materiálu. K uvolnění proteinů z buněčných a tkáňových vzorků je potřeba rozbít jejich struktury – homogenizovat vzorek. Kromě mechanické homogenizace je často využíváno metod fyzikálních – ultrazvuku (např. sonikace v lázni) či tlaku (tzv. *frenchpress*) a chemických – enzymaticky či osmotickou lýzou. Proteiny, které byly některou z těchto technik uvolněny, se extrahují pomocí různých pufrů nebo roztoků obsahující vhodné detergenty. Používáním detergentů (např. dodecylsulfát sodný nebo deoxycholát sodný) se výrazně zvyšuje rozpustnost proteinů a někdy i usnadňuje proces následného enzymatického štěpení proteinů [9]. Zároveň je třeba zabývat se kompatibilitou některých detergentů s následnými kroky přípravy a analýzy vzorku. Především je nutné odstranit tyto nežádoucí látky před analýzou kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

1.3.2 Deplece

V případě analýzy vzorků krevní plazmy je situace komplikovaná především velkým rozsahem koncentrací proteinů přítomných v plazmě. Několik nejzastoupenějších proteinů zde tvoří převážnou část absolutního množství proteinů, což velmi znesnadňuje analýzu ostatních proteinů přítomných v nižších koncentracích. Potenciální biomarkery se v plazmě vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, jejichž analýzu komplikuje nadbytek albuminu a dalších vysoce koncentrovaných proteinů [10]. Proto se často používá krok odstranění nejzastoupenějších proteinů (deplece), např. pomocí afinitní chromatografie. K odstranění těchto abundantních

proteinů pomocí bioafinitní chromatografie se využívá deplečních kolon pro použití v kapalinovém chromatografu nebo jednorázových deplečních kolonek. Obě dvě uspořádání využívají principu specifické interakce vybraných abundantních proteinů s imobilizovanými protilátkami a umožňují výrazně snížit koncentraci těchto zastoupených proteinů ve vzorku [11].

1.3.3 Stanovení koncentrace proteinů ve vzorku

Aby bylo možné v následných krocích přípravy zvolit optimální podmínky (např. množství nanášeného vzorku), je nutné stanovit koncentraci proteinu v daném analytu. Ke zjištění této koncentrace v průběhu přípravy vzorku se používají zpravidla spektrofotometrické metody. Principem spektrofotometrických metod je měření absorbance jednotlivých komponent proteinů nebo specifického barevného produktu reakce vhodného činidla s proteiny. Příkladem je metoda stanovení kyselinou bicinchoninovou (BCA), jejímž principem je redukce měďnatých kationtů peptidovými vazbami proteinů v alkalickém prostředí. Měďné kationty jsou dále chelátovány BCA za vzniku komplexu červeného zbarvení. Intenzita zbarvení je pak přímo úměrná koncentraci proteinů ve vzorku [12].

1.3.4 Redukce, alkylace

Dalším neméně důležitým krokem je rozrušení disulfidických můstků mezi cysteiny vhodnými redukčními činidly. Tím dojde k rozvolnění trojrozměrné struktury proteinů, což je důležité pro efektivitu následného štěpení. Nejpoužívanějšími redukčními činidly jsou dithio-treitol, 2-merkaptoetanol či tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP). K zabránění opětovné oxidaci cysteinů a možnému znovuvytvoření náhodných disulfidických vazeb je nutné zablokovat volné reaktivní sulfhydrylové skupiny, např. vnesením alkylového zbytku – alkylací. Mezi zástupce alkylačních činidel patří jodoacetamid (IAC), kyselina jodoctová a akrylamid [13].

1.3.5 Štěpení proteinů

Štěpení proteinů na peptidy je jeden z nejdůležitějších kroků přípravy vzorku pro proteomickou analýzu strategiemi shotgun, příp. bottom-up. Tyto přístupy se používají mnohem častěji než top-down proteomika, neboť analýza peptidů je často technicky snáze proveditelná. Nejčastěji je štěpení proteinů prováděno enzymaticky (typicky s použitím trypsinu), který specificky štěpí proteinovou strukturu za argininem a lysinem (s výjimkou, kdy je předcházející aminokyselinou prolin). Vzniklé peptidy jsou většinou svou velikostí vhodné pro MS analýzu, bazické zbytky aminokyselin na C-koncích peptidů navíc usnadňují přijetí protonu při ionizaci

peptidů. Dalšími proteolytickými enzymy jsou například chymotrypsin, LysC a jiné endoproteinázy [14].

1.3.6 Purifikace peptidické směsi

Purifikace peptidů je proces, během kterého jsou ze vzorku odstraňovány nežádoucí složky (např. soli, zbytky alkylačních a redukčních reagentů atd.), díky tomu se získá analyt v čistší formě a často se v tomto kroku také provádí jeho zakoncentrování. Nejběžnějším způsobem je technika extrakce na pevné fázi s využitím SPE-kolonek. Principem této metody je zachycování molekul analytu na pevném sorbentu kolonky, přes níž analyt protéká rozpuštěn ve vhodné mobilní fázi. Po promytí zachyceného analytu se provádí jeho eluce pomocí mobilní fáze s vyšší eluční silou a dochází k uvolnění analytu z dané chromatografické stacionární fáze [15].

1.4 Separační techniky v proteomice

Proteiny se v biologických vzorcích vyskytují ve velmi vysokém počtu a široké koncentrační škále. Současné analytické metody, zejména pro proteomiku klíčová hmotnostní spektrometrie, nejsou schopny takový rozsah pokrýt najednou, a je proto nutná předchozí úprava, frakcionace a separace vzorků. Proteinové či peptidové komplexní směsi se tak nejčastěji separují za použití chromatografických a elektroforetických metod.

Elektroforetické metody se v proteomice používají nejčastěji na separaci intaktních proteinů, zatímco chromatografické metody jsou aplikovány jak na separaci proteinů, tak i na separaci naštěpených peptidů. Častou aplikací chromatografických metod je pak separace peptidických směsí na reverzní fázi ve spojení s LC-MS.

1.4.1 Elektroforetické separace

Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (IEF) je separační metoda, která umožňuje dělení proteinů dle svého izoelektrického bodu (pI) v gradientu pH. Separace je závislá na migraci proteinů v prostředí s proměnlivým pH okolí. Proteiny, případně peptidy se vlivem elektrického proudu pohybují v gelu s pH gradientem dokud se nedostanou do místa o takovém pH, které je rovno jeho hodnotě pI. V tomto místě se protein přestane pohybovat a je zde zaostřen [12].

Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodném

Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je technika sloužící k separaci a identifikaci proteinů. V SDS-PAGE se látky dělí především dle své molekulové hmotnosti, a to díky dodecylsulfátu sodnému (SDS), který způsobí jejich záporné nabití a zároveň, společně se zahřátím, denaturaci proteinů. Polyakrylamidovým gelem tak putují nejrychleji proteiny s nejmenší molekulovou hmotností, naopak proteiny s velkou molekulovou hmotností se pohybují gelem pomaleji. Orientační molekulovou hmotnost proteinu pak lze určit porovnáním se standardem o známé molekulové hmotnosti.

Obě metody (IEF a SDS-PAGE) se uplatňují ve dvourozměrné separaci proteinů v polyakrylamidové gelové matici.

Dvourozměrná gelová elektroforéza

Dvourozměrná gelová elektroforéza (2-DE) patří mezi první techniky používané v proteomice. Jde o separační metodu, při níž jsou proteiny separovány nejprve IEF a v druhém rozměru 2-DE jsou proteiny děleny pomocí SDS-PAGE. 2-DE má velmi vysokou rozlišovací schopnost pro proteiny (několik stovek až tisíců proteinových forem na jednom gelu). Separované proteiny jsou nejčastěji detekovány pomocí viditelného barvení (Coomassie Brilliant Blue, stříbrné barvení), fluorescenčním barvením, imunodetekcí či „blottingem“ [16]. Takto rozdělené proteiny mohou být v gelu naštěpeny na peptidy, tyto peptidy jsou pak z gelu extrahovány a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

1.4.2 Chromatografické metody

Kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Pro separaci peptidů ve směsi se v proteomice nejčastěji používá *kapalinová chromatografie na reverzní fázi* (RPLC). Principem této metody je distribuce látek mezi stacionární a mobilní fází na základě nepolárních interakcí. Stacionární fází je zpravidla povrchově modifikovaný silikagel, jehož hydroxylové skupiny jsou nejčastěji substituovány oktadecylovým řetězcem (C18) [17]. Mobilní fází protékající kolonou je nejběžněji směs vody a organického rozpouštědla (např. acetonitril, methanol). Taktéž se do mobilní fáze mohou přidat modifikátory pro zlepšení separační selektivity. Nejpoužívanějším modifikačním činidlem je kyselina trifluoroctová nebo fosforečná [18], nicméně pro kombinaci s hmotnostní spektrometrií se používá např. kyselina mravenčí. Mechanismus separace je založen na míře nepolárních interakcí při gradientové eluci peptidů, která je v průběhu separace ovlivňována zvyšující se koncentrací

organického rozpouštědla v mobilní fázi. Na začátku separace jsou eluovány více polární peptidy, zatímco méně polární peptidy více interagují s hydrofobními skupinami stacionární fáze, a jsou eluovány tudíž později.

RPLC je používána pro separaci peptidů pro své jednoduché použití s gradientovou elucí, kompatibilitu mobilních fází s pozdější MS detekcí a vysokou separační účinnost [19].

Iontově výměnná chromatografie na silném katexu

Iontově výměnná chromatografie na silném katexu (SCX) byla v této práci použita jako frakcionační technika, kterou bylo nutné v rámci experimentální práce optimalizovat. Jedná se o druh iontově výměnné chromatografie, která se využívá k dělení molekul dle jejich náboje. Konkrétně kation-měničová chromatografie používá záporně nabitou ionto-měničovou pryskyřici s afinitou k molekulám mající kladný náboj.

Náboj proteinu souvisí s pI a je tedy závislý na hodnotě pH okolního prostředí. V případě, že je pH rovno pI proteinu, protein má celkově nulový náboj. Při $\text{pH} < \text{pI}$, protein nese kladný náboj, naopak pokud se pH pufru zvýší nad hodnotu pI proteinu, náboj proteinu je záporný [20]. Proteiny s různou hodnotou pI mají při daném pH rozdílné hodnoty náboje, tím pádem mají odlišné afinity ke kladně nabitým povrchovým skupinám na částicích aniontového výměnného média. Mechanismus retence analytů je založen na principu elektrostatické přitažlivosti mezi analytem a funkčními skupinami stacionární fáze, které mají opačné náboje [21].

K eluci může dojít dvěma mechanismy – gradientem soli nebo gradientem pH. Při využití gradientu soli se postupným zvyšováním koncentrace soli jako první eluují slabě vázané proteiny, až jsou nakonec eluovány proteiny vázané nejsilnějšími nábojovými interakcemi. Eluce pH gradientem probíhá tak, že se v průběhu eluce mění hodnota pH mobilní fáze. Pokud k separaci dochází na silném katexu, zvýšení pH pufru mobilní fáze znamená, že má molekula menší kladný náboj a iontová interakce proteinu se záporně nabitými funkčními skupinami stacionární fáze je menší, dojde tak k poklesu retence [22,23].

Přestože je SCX vhodné pro vícerozměrné proteomické separace, limitací této techniky je především nižší rozlišovací schopnost [24]. Své uplatnění našla především v *technologii multidimenzionální proteinové identifikaci (MudPIT)* pro shotgun proteomickou analýzu peptidů [25].

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) s normální fází se nejčastěji používá pro oddělení polárních a hydrofilních analytů. Tato separace využívá hydrofilní stacionární fáze (např. kyano-, diol-, amino-vázané skupiny) [26] a hydrofobní organické roztoky jako mobilní

fázi. K eluci dochází zvýšením polaritý mobilní fáze, a to buď snížením koncentrace organického rozpouštědla, nebo zvýšením koncentrace soli (v závislosti na stacionární fázi). Nejprve jsou eluovány méně polární peptidy a nakonec nejpolarnější peptidy [27,28].

Existuje několik různých stacionárních fází využívaných v HILIC, např. derivatizovaný oxid křemičitý, polysulfoethyl A, PolyWAX či zwitteriont (ZIC-HILIC) [26]. Tyto nosiče stacionární fáze se liší mechanismem, jakým dochází k oddělení analytu, ale všechny nosiče tvoří hydrofilní vrstvu kolem funkčních skupin, která silně interaguje buď s polárními nebo hydrofilními sloučeninami.

V případě separace s použitím iontové náplně (např. kolonky s Polyhydroxyethylem A), se využívá se rostoucí gradient soli [28].

1.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, kterou lze převést molekuly analytu na ionty, separovat je dle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následně zaznamenat intenzitu těchto iontů. Hlavní částí hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, v němž probíhá ionizace vzorku, tj. převedení neutrálních molekul vzorku na nabitě částice – ionty.

Volba druhu ionizační techniky závisí na povaze analytu a způsobu separace. Mezi nejstarší techniky patří elektronová ionizace. Pro těkavé látky je vhodná ionizace polem a chemická ionizace. Mezi novější ionizační techniky patří např. chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) či ionizace desorpčním elektrosprejem (DESI) [29]. Rozlišujeme tzv. tvrdé a měkké ionizační techniky. Během tvrdé ionizace analyt získá nadbytek energie, a tak dojde kromě tvorby iontu i k fragmentaci molekul. Do této kategorie spadá např. elektronová ionizace (vznikají ionty s lichým počtem elektronů; pro termostabilní a těkavé látky). Šetrnějším způsobem je ionizace měkká, kdy dodaná energie je dostatečná k ionizaci, ale k fragmentaci při ní dochází již minimálně. V důsledku ion-molekulárních interakcí vznikají hlavně ionty se sudým počtem elektronů. Měkké ionizační techniky jako jsou ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) přispěly k prudkému rozvoji proteomiky [29,30].

Analyzované látky jsou v iontovém zdroji převedeny na ionty v plynném skupenství a v takové fázi následně směřují přímo do hmotnostního analyzátoru. Následně jsou ionty separovány v hmotnostním analyzátoru dle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Tento děj probíhá za vysokého vakua, pro které jsou nutností výkonné vakuové pumpy. Separace komplexních směsí na jednodušší frakce využívá různých fyzikálních principů. Mezi nejpoužíva-

nější patří odlišná stabilita oscilací iontů ve stejnosměrném a střídavém napětí (kvadrupól, iontová past), různě dlouhý čas letu iontů (TOF – analyzátor doby letu), různá frekvence harmonických oscilací (Orbitrap) nebo využití odlišné absorpce energie při pohybu iontů v kombinovaném elektrickém a magnetickém poli (iontová cyklotronová rezonance). Obecně je během proteomické analýzy komplexních směsí vzorek separován nejčastěji gelovou elektroforézou či HPLC. Následuje vlastní analýza separovaných směsí v hmotnostním spektrometru. Přímou lze analyzovat pouze jednodušší vzorky.

Po separaci v hmotnostním analyzátoru jsou ionty detekovány a dochází k tvorbě a zesílení signálu. Tak se získá výsledný záznam – hmotnostní spektrum, což je grafické znázornění závislosti intenzity iontů na jejich poměru m/z .

1.5.1 Iontové zdroje využívané v proteomické analýze

V proteomice se v současnosti pro analýzu biologických makromolekulárních látek používají zejména ESI, nanoESI a MALDI [31].

Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI) je v dnešní době nejpoužívanější technika pro spojení HPLC-MS. Patří mezi měkké ionizační techniky, během kterých mají vznikající ionty relativně malou vnitřní energii a jejich fragmentace je omezená. Klíčovou vlastností pro analýzu biomakromolekulárních látek je tvorba vícenásobně nabitých iontů. Jejich signál lze pozorovat při nižších hodnotách m/z , a tím je umožněno použít k analýze hmotnostní analyzátoři s omezeným rozsahem. Nevýhodou je, že jedna látka poskytuje několik signálů, což zhoršuje přehlednost výsledného hmotnostního spektra [30].

Proces ionizace probíhá tak, že analyzovaný roztok vzorku je veden kapilárou, kde se působením silného elektrického pole oddělí kationty a anionty. Ionty jsou vypuzeny z kapiláry v závislosti na polaritě pole. Kapičky vzniklé na výstupu z kapiláry jsou zmlženy plynem a nesou na svém povrchu náboj. Jakmile se začne odpařovat rozpouštědlo, zvýší se hustota povrchového náboje, a to vede k rozpadu na ještě menší kapičky a rozdělení původních nábojů (tzv. Coulombická exploze). Opakováním tohoto děje se uvolní vícenásobně nabité ionty, což je výhodné pro umožnění analýzy větších molekul. Ionty jsou poté transportovány do hmotnostního analyzátoru [32].

Miniaturizace této techniky vedla ke konstrukci nanoelektrosprejové ionizace, která pracuje s průtoky v řádech desítek nanolitřů za minutu [33].

Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice

Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI) umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých biologických látek připravených v pevném skupenství. MALDI je technikou měkké ionizace, která byla poprvé použita koncem 80. let za účelem analýzy biologických vzorků malých velikostí [34].

Před samotnou ionizací je vzorek aplikován na nanášecí destičku a poté je přes něj navrstvena matrice. Tou je obvykle organická kyselina schopna absorbovat energii laseru, jako je např. α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina. Takto připravený vzorek je pulzně ozařován laserem. Energií laserového paprsku absorbuje převážně matrice, čímž je analyt chráněn před energií laseru. Odpařováním částic matrice dochází k strhávání molekul analytu a převedení do plynného skupenství. Molekuly matrice jsou excitovány a ionizují molekuly analytu prostřednictvím přenosu protonu, kvůli čemuž je nutná kyselá povaha matrice. Vznikají převážně jednoduše nabití ionty, které jsou elektrickým polem urychlovány do hmotnostního analyzátoru [35]. MALDI je nejčastěji využíváno k ionizaci molekul o vysoké molekulové hmotnosti, jako jsou peptidy, proteiny a polysacharidy. Nakonec jsou vzniklé ionty měřeny nejčastěji pomocí TOF [36].

1.5.2 Analyzátoři využívané v proteomické analýze

V okamžiku, kdy jsou neutrální molekuly již převedeny v iontovém zdroji na ionty, vstupují do hmotnostního analyzátoru. Zde dojde k rozdělení iontů dle jejich poměru m/z . Kvalitu rozdělení iontů lze vyjádřit rozlišovací schopností, což je poměr m/z ku šířce celého píku v polovině jeho výšky [37].

Analyzátor doby letu

Analyzátor doby letu (TOF) je založen na principu dělení iontů s různým m/z v čase, přičemž ionty se při pohybu trubicí o známé délce pohybují různou rychlostí. V případě, že jsou ionty se stejným nábojem i počáteční rychlostí urychleny stejným napětím, dorazí na detektor lehčí iont dříve než těžší. Mezi přednosti analyzátoru doby letu patří vysoká rychlost a absence teoretického horního limitu hmotnostního spektra. Znamená to, že principiálně je možné použít TOF k analýze jakkoli velkých m/z . Prakticky je zde ale limitace jejich detekce, neboť velmi pomalé ionty dopadem na detektor způsobí nedostatečnou odezvu, což se projeví nízkou citlivostí. Tyto detektory je relativně snadné miniaturizovat a také využít pro získání tandemových hmotnostních spekter [38,39]. Nejčastěji se TOF používá ve spojení s MALDI iontovým zdrojem [40].

Kvadrupól

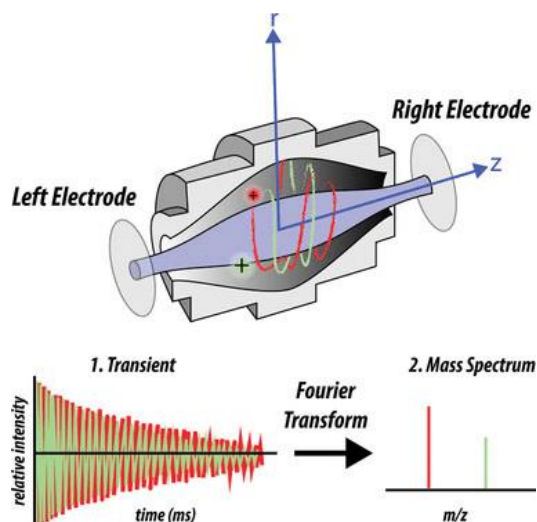
Kvadrupólový hmotnostní analyzátor se skládá ze čtyř vzájemně rovnoběžných tyčí, kde jsou jednotlivé ionty děleny na základě jejich poměru m/z . Principem je dělení dle stability svých drah v elektrickém poli, které je přiváděno na tyče [29]. Při určité velikosti a poměru napětí prochází pouze ionty s určitým m/z , kdy při změně napětí projdou dané ionty a ostatní zůstávají zachyceny na stěnách.

Lineární iontová past

Ionty jsou v lineární iontové pasti zadržovány v centrální části zařízení, na které je vloženo střídavé napětí. Následně jsou vypuzeny ve směru osy a nasměřovány k detektoru. Analyzátorů jsou relativně levné, rychlé a citlivé. Většího rozlišení lze dosáhnout zapojením do hybridních analyzátorů, které zastupuje např. FT-ICR [37].

Orbitrap

Orbitrap (někdy též nazývaný *orbitální past*) patří mezi novější hmotnostní analyzátorů. Díky využití Fourierovy transformace v sobě kombinuje separační, ale i detekční část [41]. Od ostatních hmotnostních analyzátorů se odlišuje tím, že k zachycení iontů nevyužívá vysokofrekvenční ani magnetické pole, ale zadržuje je výhradně v elektrickém poli. Konstrukčně se jedná o dvě elektrody – vnější a centrální, mezi nimiž je potenciál cca 3000 V (Obrázek 1 nahoře). Na centrální elektrodě dochází k radiálnímu pohybu iontů. Současně ionty oscilují kolem své osy, přičemž frekvence je charakteristická pro ionty s určitým m/z . Frekvence oscilací jsou snímány a pomocí Fourierovy transformace převedeny na hmotnostní spektrum (Obrázek 1 dole) [42]. Výhodou Orbitrapu je vysoká rozlišovací schopnost a správnost měření [43], naopak jeho limitace spočívají v omezené senzitivitě a rozsahu m/z [37].



Obrázek 1: Princip funkce Orbitrapu. Převzato z [44].

Hybridní analyzátory

Jako hybridní se označují takové hmotnostní spektrometry, které jsou složené ze dvou, případně více různých analyzátorů. Kombinací různých typů analyzátorů jsou potlačeny nedostatky a umocněny výhody, čímž dojde k celkovému zlepšení vlastností přístroje a výsledků analýz. Hybridní analyzátory nalézají uplatnění v tandemové hmotnostní spektrometrii, kdy například mezi zástupce hybridních analyzátorů patří kombinace kvadrupólového analyzátoru s analyzátozem doby letu (Q-TOF). Tento typ analyzátoru se používá v kombinaci s technikami ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC), jelikož vyniká vysokým rozlišením a rychlostí sběru dat [45]. V současnosti je patrně nejpoužívanější použití kombinace kvadrupólového analyzátoru, kolizní cely a Orbitrapu (Q-Exactive) [46,47].

1.5.3 Detekce iontů v hmotnostně-spektrometrické analýze

Detektor je poslední komponenta hmotnostního spektrometru, kde dochází k převedení proudu iontů letících z analyzátoru na měřitelnou veličinu, čím je elektrický proud. Ten je úměrný počtu iontů a specifickému poměru m/z . Signál je po zesílení převeden do digitální podoby, jehož výsledkem je hmotnostní spektrum. Detektory jsou nedílnou součástí hmotnostních spektrometrů, vyjma těch, kde je analyzátor Orbitrap či FT-ICR, v nichž dochází zároveň k separaci i detekci iontů [29].

Elektronový násobič

Nejčastěji používaným detektorem je elektronový násobič tvořený sérií dynod. Při nárazu iontu do první z nich dojde k emisi elektronů a ty dopadem na druhou dynodu vyrazí další elektrony. Takto vzniká elektrický proud, který je sérií dynod zesilován [48].

Fotonásobič

Fotonásobič je detektor elektromagnetického záření v UV, VIS a IR oblastech. Detekce iontů probíhá tak, že je před fotonásobič umístěna fosforová destička, na níž dopadají částice z konverzní dynody. Tím dojde k emisi fotonů, které dále dopadají na fotokatodu, kde jsou vlivem fotoelektrického jevu emitovány elektrony a stejně jako v elektronovém násobiči je signál dále zesilován. Fotonásobič je citlivý detektor vyznačující se dlouhou životností díky uložení v uzavřeném systému (v přítomnosti) vakua, čímž se zabrání případné nežádoucí kontaminaci [49].

Faradayův detektor

Faradayův detektor se skládá z ploché elektrody, která sbírá ionty. Ty jsou neutralizovány přenosem elektronů, které byly emitovány z povrchu dynody. Indukovaný proud je zesilován

a zaznamenáván. Jedná se o poměrně málo citlivý, ale robustní detektor, který je vhodný zejména pro analýzu poměru izotopů [50].

Detekce iontů v Orbitrapu

Orbitrap je zároveň hmotnostním analyzátozem i detektorem. Ionty vstupující do Orbitrapu začnou oscilovat a tyto oscilace jsou detekovány elektrodami. Pomocí Fourierovy transformace jsou jednotlivé frekvence izolovány a následně převedeny na hmotnostní spektrum [41].

1.6 Bioinformatické zpracování dat v proteomice

Nedílnou částí proteomické analýzy je zpracování naměřených dat získaných hmotnostní spektrometrií. Identifikace proteinů je umožněna díky databázovým vyhledávacím programům, které pracují na principu srovnávání dat získaných experimentálně s informacemi uloženými v databázi. Aby byl protein identifikován, musí dojít ke shodě mezi těmito informacemi, přičemž míra shody je popsána určitým skóre či pravděpodobností.

Klíčovou roli hrají dostupné databáze sekvencí proteinů. Jedním z důležitých zdrojů těchto sekvencí je *UniProt*. Sekvence proteinů odsud získané jsou pak důležitým vstupním údajem do bioinformatických programových nástrojů. Tyto nástroje v sobě často zahrnují nejen prosté databázové vyhledávání a identifikaci proteinů, ale i pokročilé metody relativní proteinové kvantifikace v proteomických studiích a statistické interpretace získaných výsledků.

Proteome Discoverer

Software *Proteome Discoverer* zahrnuje zpracování výsledků měření z mnoha možných proteomických postupů – od identifikace proteinů a peptidů přes analýzu posttranslačních modifikací peptidů až po label-free kvantifikaci a izobarické nebo metabolické značení. Podporuje více algoritmů pro vyhledávání v databázích (SEQUEST, Amanda, Mascot a Byonics) [51].

MaxQuant

MaxQuant je softwarový balíček určený k proteomické analýze velkých souborů hmotnostně-spektrometrických dat. Zaměřuje se především na MS data s vysokým rozlišením. Software *MaxQuant* podporuje analýzu více typů značení proteomických vzorků, jakož i analýzu proteomických vzorků bez izotopového značení. Software je volně dostupný ke stažení a používání. Zahrnuje vyhledávací program *Andromeda* a aplikaci pro kontrolu nezpracovaných dat a identifikaci a výsledky kvantifikace. Pro statistickou analýzu nabízí software *Perseus*, který napomáhá výzkumníkům při interpretaci dat z kvantifikace proteinových vzorků, interakce proteinů a posttranslačních modifikací. *Perseus* obsahuje komplexní portfolio statistických nástrojů

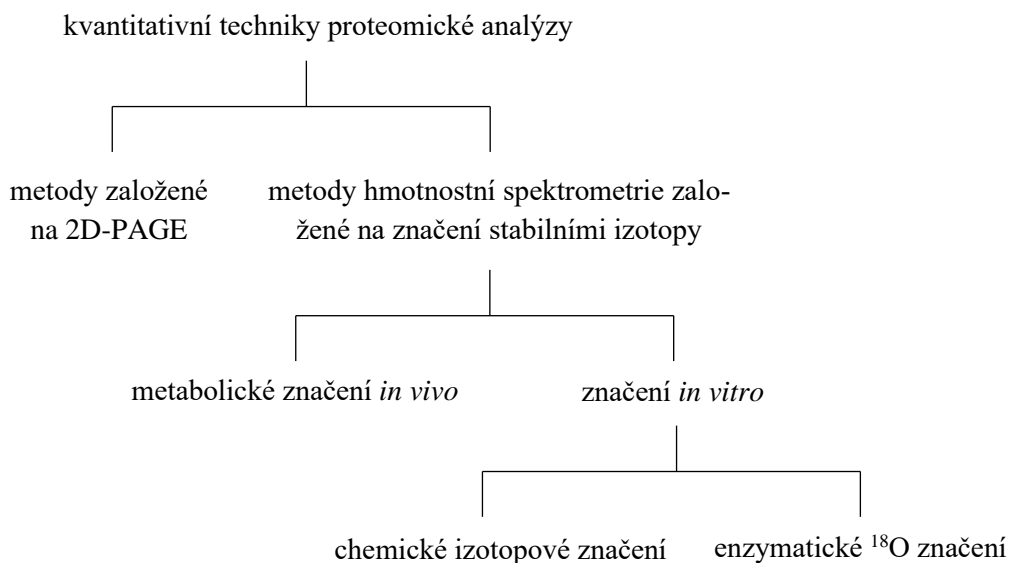
pro vícerozměrnou analýzu dat zahrnující normalizaci, analýzu časových řad, testování hypotéz apod. [52,53].

1.7 Kvantitativní proteomická analýza

Identifikace jednotlivých proteinů v daném vzorku je důležitá, nicméně hlavním principem komparativní proteomické analýzy je zjišťování koncentračních rozdílů mezi jednotlivými vzorky. Tyto diference v kvantitě proteinů totiž mohou odrážet významné biologické změny v organismu.

Zásadním aspektem proteomického výzkumu je souběžná identifikace a kvantifikace koncentrací proteinů exprimovaných buňkami nebo tkáněmi během fyziologických a patologických stavů. Informaci o kvantitě proteinů lze získat buď denzitometricky při dvourozměrné elektroforéze, nebo pomocí MS. Pro relativní i absolutní kvantifikaci proteinů se v hmotnostní spektrometrii často využívá značení stabilními izotopy. Stabilní izotopové značky detekované v MS/MS poskytují celou řadu výhod, jako je analýza více vzorků v jedné analýze či nízké počty nekvantifikovaných proteinů napříč vzorky tzv. *missing values*. Nevýhodou je možnost nechtěné koizolace více peptidů v jednom fragmentačním okně, což může vést k nepřesné kvantifikaci proteinů. Další možností je kvantifikace bez tohoto značení – tzv. *label-free* metody, kdy je informace o kvantitě získávána přímo z hmotnostních spekter [54].

Značení při kvantitativním proteomickém experimentu zahrnuje různé způsoby, při nichž jsou proteiny či peptidy značeny a následně analyzovány MS. Relativní kvantifikace je poté provedena tak, že se porovnávají intenzity signálů peptidových párů pozorované v odpovídajících hmotnostních spektrech.



Obrázek 2: Klasifikace současných kvantitativních proteomických technik.

Kvantitativní proteomika využívající MS analýzy se dělí dle toho, jakým způsobem dochází k inkorporaci stabilních izotopových značek do aminokyselinové sekvence proteinu. Izotopicky lze značit proteiny přímo v buněčných kulturách či vyšších organismech – *in vivo* (metabolické značení), nebo v proteinových či peptidových vzorcích – *in vitro* (enzymatické a chemické značení) [55]. Obrázek 2 uvádí přehled těchto technik.

Důležitým parametrem těchto technik je reprodukovatelnost, která může být snížena vnesením chyb (především při přípravě vzorku) během celého procesu značení. Naopak možnost paralelního zpracování vzorků, kdy po označení vzorků stabilními izotopy probíhá jejich analýza souběžně, reprodukovatelnost metody zvyšuje.

V ideálním případě by izotopové značky měly být vysoce reaktivní, aby bylo zajištěno kompletní a reprodukovatelné označení cílové struktury. Tyto značky by měly být stabilní a reagovat s obvykle se vyskytujícími funkčními skupinami v proteinech. Aby nevznikala interference jednotlivých píků v hmotnostním spektru, je důležitý dostatečný hmotnostní rozdíl „lehké“ a „těžké“ značky. V neposlední řadě musí být izotopové značky finančně dostupné [56].

Všechny tyto techniky kvantifikace pomocí stabilních izotopových značek mají své silné a slabé stránky, a proto je důležité zvolit správnou metodu s ohledem na typ vzorku a účel celého experimentu. Zmíněným technikám bude věnován prostor níže.

1.7.1 Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza

Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza (2D-DIGE) představuje modifikaci klasické 2-DE a byla vyvinuta v 90. letech 20. století. Proteinové vzorky se značí pomocí fluorescenčních barviv CyDyes™. Na jeden gel je možné před dělením nanést až tři barviva, tzn. lze oproti klasické 2-DE separovat až tři různé vzorky najednou [57]. Jednotlivé fluorescenční barvy se mezi sebou liší vlnovou délkou emitovaného a excitovaného světla. Po označení se vzorky smíchají a následuje 2-DE včetně identifikace konkrétních proteinů hmotnostní spektrometrií [58].

1.7.2 Metabolické značení

Metody metabolického značení využívají biologické inkorporace stabilních izotopových značek přímo do proteinů živých buněk, jedná se tedy o techniku *in vivo*. Kultivační médium obsahuje izotopicky značené aminokyseliny, díky čemuž probíhá růst a dělení buněk již souběžně se značením. Tento způsob značení je omezen na použití u vzorků, ve kterém jsou buňky metabolicky aktivní. Nelze použít na vzorky tkání a tělních tekutin [55].

SILAC

Technika SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino in Cell Culture*) využívá izotopově značené aminokyseliny, které se v průběhu kultivace buněk inkorporují do sekvence proteinu. Principem je tedy přímé přidání aminokyselin značených stabilními izotopy do buněčného média. Buňky jsou pěstovány ve dvou odlišných kultivačních médiích. První – „lehké“ médium obsahuje aminokyseliny s přírodním izotopem (H, ^{12}C , ^{14}N), ve druhém – „těžkém“ médiu jsou aminokyseliny značeny stabilním izotopem (^2H , ^{13}C , ^{15}N). Nejvíce využívaným způsobem je ^{13}C a ^{15}N značení argininu a lysinu, protože rutinně používaný proteolytický enzym trypsin je schopen specificky štěpit karboxylové konce těchto aminokyselin. Označeny jsou tudíž jen konkrétní aminokyselinové zbytky. Tato kombinace umožňuje kvantifikaci tryptických peptidů, což celkově zlepšuje míru pokrytí proteomu [59].

Následuje dostatečný počet buněčných cyklů – dělení (minimálně 5) [55], štěpení proteinů a analýza pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Kvantifikace je založena na měření poměru značených a neznačených peptidů. Intenzity signálu z lehkých a těžkých vzorků umožňují kvantitativní srovnání jejich zastoupení ve směsi [60,61].

SILAC je v současnosti velmi dobře dostupná metoda kvantitativní proteomiky s dostatečnou spolehlivostí a robustností, vhodná zejména pro rozsáhlé soubory vzorků savčích buněčných linií kvůli neschopnosti syntetizovat všechny aminokyseliny. Nevýhodou této techniky je možnost identifikování menšího množství proteinů a delší doba trvání celé analýzy [55,62].

1.7.3 Enzymatické značení

Enzymatické značení s využitím ^{18}O je jednoduchá technika vhodná ke značení peptidů v přítomnosti H_2^{18}O . Obvykle používanou proteázou je trypsin katalyzující výměnu dvou atomů $^{16}\text{O}_2$ za dva atomy $^{18}\text{O}_2$ na C-terminální karboxylové skupině peptidu. Při enzymatickém značení dochází k současné inkorporaci stabilních izotopů a proteinovému štěpení. Aby nedošlo ke kontaminaci vzorků, musí být před štěpením naprosto suché [63,64].

Mezi nevýhody této techniky patří horší začleňování izotopů, delší doba inkubace po proteolytickém štěpení pro dosažení vyššího stupně inkorporace, nedostatečný hmotnostní posuv izotopových obálek a omezené možnosti srovnávání vzorků, jelikož enzymatické značení je duplexová technika [65].

1.7.4 Chemické značení

Na rozdíl od metabolického značení, techniky chemického značení nezavádí izotopickou značku přímo do biologického metabolismu, ale využívá se různých chemických reakcí. Výhodou chemického značení je fakt, že lze tyto metody použít pro analýzu široké škály vzorků včetně buněk, tkání a tělních tekutin.

Izotopově kódované afinitní značky

Nejstarší metodou chemického značení je využití *izotopově kódovaných afinitních značek* (ICAT). Principem je značení proteinů činidlem specifickým pro volné thiolové skupiny cysteinu. Následně je protein proteolyticky štěpen a vzniklé peptidy jsou afinitně přečištěny. Takto připravená směs k analýze MS obsahuje pouze peptidy obsahující ICAT značku. Výhodou této metody je redukce komplexnosti vzorku díky použití specifického značení cysteinu. Zároveň je však snížena spolehlivost měření, jelikož cystein není hojně zastoupená aminokyselina a lze použít pouze tehdy, pokud sledovaný protein obsahuje cystein [66].

Izotopové značení proteinů

Jelikož ICAT metoda modifikuje pouze proteiny, které obsahují cysteinové zbytky, byla navržena alternativní technika chemického značení – ICPL (Isotope Coded Protein Label). Jejím principem je použití takových činidel, které označí N-konce peptidů a aminoskupinu lysinových zbytků. Díky vysokému obsahu lyzinových zbytků v proteinech je k dispozici více „míst“ pro značení, což je výhodné z důvodu zvýšení citlivosti analýzy a lepšího sekvenčního pokrytí. Prvním krokem je tedy reakce ICPL činidla s N-konci proteinu a aminoskupinou lysinu, až poté je protein proteolyticky štěpen a připraven k analýze hmotnostní spektrometrií.

Stabilní značení peptidů dimethylací

Principem dimethylace (reduktivní alkylace) je reakce formaldehydu s primárními aminy a kyanoborohydridem sodným, při níž jsou aminy na N-konci a ϵ -postranním řetězci lysinu převedeny na dimethyl. První krok dimethylace je tedy vytvoření tzv. Schiffovy báze (reakcí aminu s formaldehydem), která je následně ve druhém kroku redukována kyanoborohydridem sodným [67].

Izotopové značení peptidů iTRAQ

Kvantifikační metoda iTRAQ (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) využívá stabilní izotopy a je založena na značení peptidů pomocí syntetických izobarických značek. Tyto značky jsou složeny ze tří částí. První složkou je reaktivní skupina, která se váže na aminy peptidů vzniklých při trypsinovém štěpení proteinů, konkrétně na N-konec případně

na ϵ -aminoskupinu lyzinu. Druhou částí je reportérová skupina, která je během fragmentace peptidu odštěpena a objeví se v spektru z tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Reportérové skupiny mají v každé iTRAQ značce jinou hmotnost. Poslední část představuje neutrální balanční skupina mající taktéž v každé z iTRAQ značek jinou hmotnost, čímž je zajištěno, že jsou všechny značky izobarické, tj. mají shodnou výslednou hmotnost. Jednotlivé iTRAQ značky se liší pouze izotopovým složením [68].

Tento způsob značení je vhodný zejména pro kvantifikaci proteinů z odebraných tkání, tělních tekutin. Výhodou je schopnost současné identifikace až osmi vzorků během jednoho experimentu [69,70].

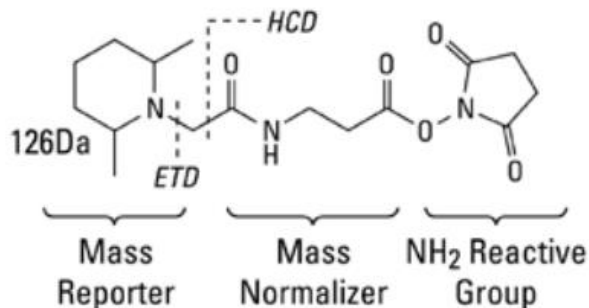
Tandemové hmotnostní značky pro značení peptidů

Chemické značení *tandemovými hmotnostními značkami* (TMT) patří do skupiny izobarických hmotnostních značek, jedná se o obdobu iTRAQ značek. V těchto metodách značení je běžný prekurzorový ion m/z , ale produktový ion je mezi porovnávanými vzorky odlišný a relativní kvantifikace se tedy provádí pomocí MS/MS. Výhodou této techniky je multiplexování vzorků, což snižuje počet měření (a dobu analýzy) jelikož se několik porovnávaných vzorků před samotným měřením smíchá (měření např. v duplexu, 6-plexu, 10-plexu) [71].

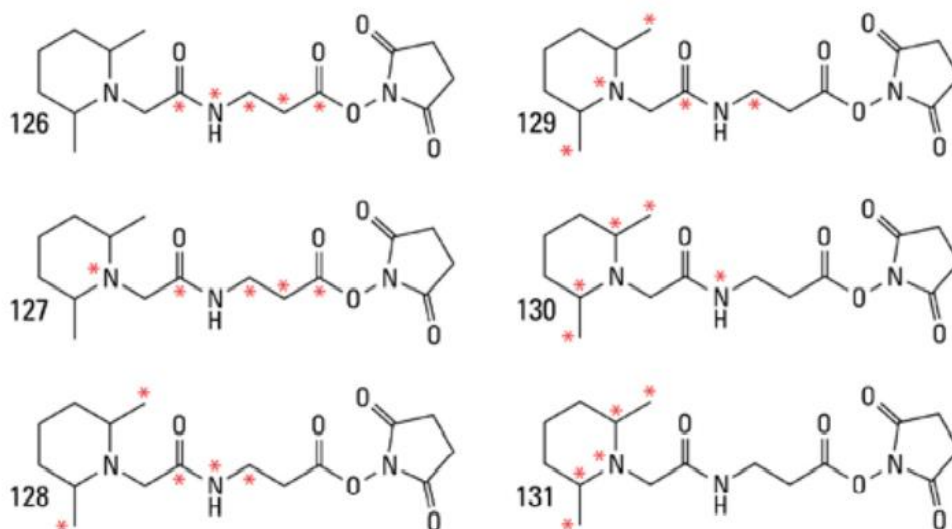
Činidla např. TMT 6-plex produkují řadu různých reportérových iontů s hmotností od 126 do 131 Da v intervalech 1 Da. Komerčně je dostupných několik TMT činidel (TMT zero, TMT duplex, TMT 6-plex, TMT 10-plex) mající stejnou chemickou strukturu, liší se v obsahu a kombinaci izotopů ^{13}C a ^{15}N v reportérové skupině [72].

Pro TMT značení je nutné zohlednit korekční faktory. Reportérové iontové signály TMT je třeba upravit tak, aby zohledňovaly izotopové nečistoty v každé variantě TMT. Značení v 10-plexu se liší šaržemi reagensů (mírné odlišnosti v izotopových nečistotách), které je třeba zahrnout do vyhledávání v databázi, aby se upravit poměr reportérových iontů. Veškeré informace o nečistotách izotopů jsou uvedeny v soupřavách reagensů [73].

Obrázek 3 znázorňuje strukturu značky TMT⁰. Obrázek 4 Obrázek 6 ilustruje princip značení vzorků izobarickými TMT 6-plex značkami.



Obrázek 3: Struktura značky TMT⁰. Mass Reporter – hmotnostní reportérová skupina, Mass Normalizer – balanční skupina, Reactive Group – reaktivní skupina. HCD – vysokoenergetická kolizní disociace, ETD – elektronová disociace. Převzato z [73].



Obrázek 4: Princip značení pomocí TMT 6-plex značek. Červenými hvězdičkami jsou vyznačeny pozice těžkých izotopů ¹³C a ¹⁵N. Převzato z [73].

1.7.5 Label-free techniky kvantifikace

Ačkoli jsou techniky založené na izotopově značených sloučeninách velice přesné a citlivé, z důvodu nezbytnosti nákladných značek a chemikálií, specifických softwarů pro vyhodnocení dat i odborných znalostí personálu, představují alternativu metody, u kterých není zapotřebí výše popsané izotopové značky používat.

Tzv. *label-free* proteomika využívá dva způsoby kvantifikace. Prvním z nich je metoda založená na principu měření plochy pod křivkou, kdy koncentrace konkrétního proteinu koreluje s plochou peptidových píků získaných LC-MS analýzou. Druhým způsobem je spektrální počítání (*spectral counting*) založené na principu zjišťování počtu peptidů přiřazených k proteinu v MS experimentu. Čím vyšší je obsah daného proteinu ve vzorku, tím je z tohoto proteinu získán větší počet peptidových spekter [74].

Počet vzorků pro kvantifikaci není v případě této techniky omezen a v zásadě je použitelný pro jakýkoli druh vzorku. Label-free techniky jsou v klinické praxi vhodné zejména pro screeningové analýzy velkého množství vzorků [75].

Nevýhodou label-free technik je nižší přesnost kvantifikace a poměrně vysoká náročnost na zpracování získaných dat [76]. Rovněž jsou tyto metody náchylnější k chybám způsobeným lišícími se podmínkami měření u jednotlivých vzorků. V případě metod se značkami k těmto rozdílům nedochází, neboť vzorky, které jsou mezi sebou srovnávány, jsou měřeny ve stejném MS běhu, čímž dochází k významnému zkrácení doby analýzy [77].

1.8 Proteomická analýza klinicky významných srdečních chorob

Srdeční onemocnění patří celosvětově mezi nejčastější příčiny úmrtí. Tato onemocnění se mohou objevit náhle – jako např. akutní infarkt myokardu nebo se postupně vyvíjet několik měsíců až let (např. chronické srdeční selhání). V dnešní době existuje celá řada diagnostických nástrojů, jak tato onemocnění odhalit či pochopit mechanismus jejich vzniku. Jedním z nich je i hmotnostní spektrometrie, kde její rozvoj v posledních letech společně s rozvojem bioinformatiky umožnily rozšíření proteomických výzkumů i do oblasti kardiovaskulární medicíny. To umožňuje podrobnou analýzu srdečního proteomu, což je důležité pro detailnější porozumění mechanismu vzniku srdečních chorob, objevení diagnostických markerů a s tím spojenou predikci rozvoje určitého onemocnění.

Tabulka 1: Příklady studií v oblasti srdeční proteomiky. (AIM – akutní infarkt myokardu, PDA – patent ductus arteriosus)

Onemocnění	Model – druh organismu	Typ vzorku	Zpracování vzorku	Vyhodnocovací software	Ref.
kardiomyopatie	myš	tkáň (myokard)	MudPIT	SEQUEST	[78]
AIM	člověk	plazma	2D-DIGE	Melanie	[79]
PDA	člověk	plazma	iTRAQ	ProteinPilot	[80]
Srdeční selhání	člověk	tkáň (myokard)	2-DE elektroforéza	Mascot	[81]

Používanými druhy biologického materiálu pro srdeční proteomickou analýzu jsou nejčastěji krevní vzorky, případně tkáň myokardu odebrána při chirurgickém výkonu. Využití vzorku krve je výhodné z hlediska toho, že odběr pro pacienta nepředstavuje náročný invazivní výkon. Najít změnu v krvi je však obtížnější než v samotné tkáni.

Jednotlivé kroky proteomického experimentu zahrnují stěžejní přípravu vzorku, solubilizaci, zvýšení proteinového pokrytí dvourozměrnou elektroforézou či některou frakcionační technikou a následnou detekci a identifikaci proteinů. Nedílnou součástí je zpracování dat pomocí bioinformatických nástrojů, zpravidla databázových vyhledávacích softwarů [82–84].

Tabulka 1 uvádí příklady studií zabývajících se srdeční proteomikou. Hlavní rozdíly spočívají zpravidla ve způsobu zpracování a vyhodnocení vzorku, což je částečně závislé na typu vzorku.

1.8.1 Proteiny asociované se srdečními chorobami

Proteomická analýza je vhodným nástrojem pro hledání nových biomarkerů souvisejících se srdečními chorobami. Nalezení biomarkeru a jeho zavedení do klinické praxe je však velmi složitý proces. Ideální biomarker by měl diagnostikovat onemocnění v raném stádiu a pocházet z biologického materiálu jako je např. moč, plazma nebo sérum, tak aby pro jeho stanovení nebyl potřebný invazivní zákrok u pacienta. Rovněž by biomarker měl být specifický pro daný patologický stav s dobrou odezvou na léčbu či progresi onemocnění [85].

Proteiny související s kardiovaskulárními onemocněními můžeme rozdělit do několika skupin. Příkladem jsou markery zánětu a/nebo kardiovaskulárního onemocnění, cév a koagulace, signální proteiny, růstové a diferenciační proteiny, cytoskeletální proteiny, transkripční faktory, kanály a receptory a proteiny srdečního selhání a remodelace.

V klinické praxi se z hlediska srdečních onemocnění rutinně používá jen několik biomarkerů. Jedná se především o indikátory základního metabolického onemocnění, jako jsou glukóza v krvi, koncentrace hemoglobinu a LDL cholesterolu. Dále využívanými prognostickými biomarkery indikujícími dysfunkci myokardu jsou N-terminální prohormon mozkového natriuretického peptidu, u srdeční nekrózy je to kardiospecifický troponin T, či pro určení zá-
nětlivé aktivity C-reaktivní protein [86].

1.8.2 Kardiomyopatie

V experimentální části této diplomové práce jsou analyzovány vzorky plazmy pacientů s dilatační kardiomyopatií. Někteří pacienti však trpí několika typy (nejen) srdečních onemocnění současně, a proto je obtížné určit, zda případnou změnu v proteinovém profilu lze připisovat pouze jednomu onemocnění, či kombinaci více faktorů.

Kardiomyopatie je skupina onemocnění, jejichž hlavním znakem je postižení srdečního svalu. Patogenezi srdečních kardiomyopatií může být genetický podklad, avšak setkáváme se i s idiopatickými příčinami. Základní neinvazivní metody v diagnostice kardiomyopatií jsou EKG, magnetická rezonance a echokardiografie. Z invazivních vyšetření je to např. endomyokardiální biopsie. Rovněž se provádí vyšetření rodinné anamnézy a genetické testování. Terapie kardiomyopatií spočívá v léčbě arytmií a srdečního selhávání. Kromě medikace může být pacientovi implantován kardioverter-defibrilátor případně transplantováno srdce [87].

Dilatační kardiomyopatie

Nejčastějším typem kardiomyopatie je dilatační kardiomyopatie (DCM), při níž dochází k dilataci (roztažení) nejčastěji levé komory (případně obou) a dochází tak k poruše přečerpávání krve. DCM se manifestuje levostranným srdečním selháním, tromboembolickými příhodami a arytmiemi. Toto onemocnění může mít několik různých původců, jako např. následek myokarditidy, dědičné vlivy, zvýšený příjem alkoholu, případně autoimunitní onemocnění [88]. Proto by bylo vhodné lépe porozumět mechanismu vzniku tohoto onemocnění, k čemuž lze použít nástroje moderní proteomické analýzy.

Hypertrofická kardiomyopatie

Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je méně častý typ kardiomyopatie, jejíž hlavním projevem je zbytnění (hypertrofie) levé komory, případně dalších srdečních oddílů. Oproti DCM není porušeno vypuzování krve z komor, ale dochází k pomalejšímu plnění srdce krví, kdy tlak uvnitř komory je zvýšen, což vyvolává obtíže. Onemocnění je obvykle dědičné, způsobené poruchou v genech zodpovědných za tvorbu bílkovin zajišťující kontrakci myokardu. HCM může mít mnoho odlišných příznaků, či probíhat naprosto bezpříznakově. Mezi klinické potíže patří dušnost, bolest na hrudníku, poruchy a ztráty vědomí zejména při fyzické zátěži (synkopy) [89].

Restriktivní kardiomyopatie

Restriktivní kardiomyopatie (RCM) je poměrně vzácné onemocnění, které se zpravidla rozvine bez známé příčiny. Stěny srdečních komor jsou při RCM tlustší a méně pružné, při progresi onemocnění mohou být komory blokovány krevními sraženinami, které zde vznikají v důsledku stagnace krve. Prvotními příznaky jsou často až embolické příhody či nespecifické příznaky srdečního selhávání (únava, dušnost, snížená fyzická kondice) [90].

Arytmogenní kardiomyopatie

Arytmogenní kardiomyopatie (ACM) je geneticky podmíněný druh kardiomyopatie, při kterém dochází k ukládání tuku a vaziva v srdečních komorách. Tím je omezeno stahování myokardu a do oběhu se tak dostává méně krve. Dominantním klinickým obrazem ACM je výskyt arytmií, přičemž toto onemocnění je nejčastější příčinou náhlé smrti zejména u mladých sportovců [91].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Technické a laboratorní vybavení, použité chemikálie a software

2.1.1 Technické vybavení

- Analytické váhy Excellence Plus XP, Mettler Toledo
- Cella pro elektroforézu Mini-PROTEAN®3, BIO-RAD
- Centrifuga s vortexem Combi-Spin FVL-2400, Biosan
- Inkubátor BD53, Binder
- Jednotka pro přípravu ultračisté vody PureLab Classic UV, ELGA
- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000, Dionex
- Odstředivka MiniSpin Plus, Eppendorf AG
- Termomixér Thermomixer C 5355, Eppendorf
- Třepačka Vortex V-1, Biosan Ltd.
- Ultrazvuková čistička ECOSON U-5STH
- Vakuová odstředivka Eppendorf
- Vakuový manifold Vac Elut™ 20, Agilent Technologies
- Vodní oběhový termostat Assistent 3180, Unimed
- Kompresor KNF LAB N86KT.18
- Zdroj pro elektroforézu PowerPac 300, BIO-RAD

2.1.2 Laboratorní vybavení

- Mikropipety 2,5; 10; 20; 100; 200 a 1000 µl, Reaserch plus, Eppendorf
- Pipetovací špičky, 0,1-10 µl, 0,2-20 µl, 2-200 µl, 200-1000 µl, Eppendorf
- Mikroštríkačka – 100 µl, 005862, SGE Analytical Science
- Zkumavky 0,5; 1,5 a 5 ml, Eppendorf
- Laboratorní stojan
- Plastový stojan pro mikrogradientovou eluci s držáky připevněný na laboratorní stojan (pro frakcionaci na reverzní fázi)
- Plastový stojan pro mikrogradientovou eluci v obráceném uspořádání (pro HILIC a SCX frakcionaci)

2.1.3 Použité chemikálie

- Aceton – 650501, Sigma-Aldrich, LOT: MKBG1044V
- Acetonitril – 1.00030.2500, Merck, LOT: I0956630820
- Akrylamid – A7802-100ML, Sigma-Aldrich, LOT: 119K6013
- Amoniumacetát – 73594, Fluka, LOT: 441948/1
- 2-butanol – B85919-1L, Sigma-Aldrich, LOT: STBF3890V
- Deoxycholát sodný – D5670-5G, Sigma-Aldrich, LOT: MKBR7284V
- Ethylacetát – 34858-2.5L, Honeywell Specialty Chemicals, LOT: STBG1458V
- Fosfátový pufr (PBS) – P4417-100TAB, Sigma-Aldrich, LOT: SLBS4223
- Hydroxid amonný – 22, 122-8, Sigma-Aldrich, LOT: S83182-179
- Kyselina mravenčí – 56302-50ML, Fluka analytical (Honeywell), LOT: BCBK8480V
- Kyselina trifluoroctová (TFA) – 14264-50ML, Honeywell Specialty Chemicals, LOT: BCBR8906V
- Kyselina octová – 33209-2.5L-M, Merck, LOT: STBH5677
- Methanol – 1.06018.2500, SUPELCO®, LOT: 1785118527
- Methanol pro LC-MS – 1.06007.2500, SUPELCO®, LOT: I0958307821
- Mravenčan amonný – 09735-50g, Sigma-Aldrich, LOT: 0001430136
- Trizma base – T6066-1KG, Sigma-Aldrich, LOT: SLBB6886V
- Ultračistá voda (aparatura PureLab)

2.1.4 Software

- Chromeleon v.6.80
- Xcalibur v.3.0
- Proteome Discoverer v.2.4
- PMi Preview v.6.1
- Microsoft Excel (Office 365)

2.2 Modelový vzorek komplexní peptidické směsi

Pro optimalizaci SCX frakcionace byly použity již připravené zmrazené alikvoty modelového vzorku peptidické směsi T buněčné linie Jurkat. Postup přípravy je popsán v dřívější publikaci [92]. Zkráceně, Jurkat buňky byly inkubovány v RPMI médiu s 10% fetálním bovinním sérem při 37 °C/5% CO₂ a pasážovány každé dva nebo tři dny. Koncentrace proteinů v buněčném lyzátu byla stanovena metodou BCA.

Následně byly proteiny resuspendovány v 50 mM NH_4HCO_3 a bylo přidáno množství dithiotreitolu potřebné k dosažení koncentrace 20 mM. Roztok byl inkubován 30 min při 56 °C. Poté byl přidán IAC a inkubováno 30 min při laboratorní teplotě v temnu. Následovalo štěpení trypsinem při 37 °C přes noc [92]. Peptidy byly odsoleny na C18-SPE kolonce a vysušeny vakuolovou odparkou.

2.3 Odběr a zpracování vzorků lidské plazmy

Experimentální část této práce využívá k analýze lidskou plazmu, kdy se zaměřujeme na proteiny s potenciálním využitím pro prognostické a diagnostické účely v medicínské praxi. Tyto proteiny mohou podléhat proteolytické degradaci a modifikaci již během samotného odběru krve a je proto nezbytné dodržovat definované postupy i v této počáteční fázi.

Chemikálie a materiál:

- Odběrové zkumavky BD™ P100 – 8013142, BD Biosciences, LOT: 6353150

Postup:

Odběr vzorků plazmy probíhá tak, že pokud lékař dle klinických příznaků a anamnézy zjistí, že se jedná o pacienta s dilatační kardiomyopatií splňující požadovaná kritéria pro možné zahrnutí do studie, kontaktuje lékař pracoviště katedry molekulární patologie a biologie FVZ UO a po následné dohodě (a písemně potvrzeném souhlasu pacienta) je proveden odběr na pracovišti ve fakultní nemocnici v Hradci Králové. Odběr je proveden do speciální odběrové zkumavky BD™ P100 minimalizující preanalytickou variabilitu v analýze plazmatických proteinů. Tyto 8,5 ml zkumavky jsou naplněny antikoagulantem K_2EDTA a směsí inhibitorů proteáz [93]. Po odběru je zkumavka zpracována a získaná plazma je následně rozaliquotována po vhodných objemech a uchovávána při -80 °C.

Vzorky plazmy byly odebrány pacientům, kteří stvrdili svou účast ve studii prováděné v rámci grantového projektu ministerstva zdravotnictví č. NV19-02-00297 podpisem informovaného souhlasu.

2.4 Deplece plazmy

Vzorek pro analýzu:

- Lidská plazma, 100 μl alikvot

Chemikálie a materiál:

- Jednorázová depleční kolonka – A36370, Thermo Fisher, LOT: VH308970
- Zkumavky 2 ml

Postup:

Depleční minikolonka byla vytemperována na laboratorní teplotu. Byl odstraněn uzávěr minikolonky a přidáno 10 µl plazmy. Poté byla minikolonka uzavřena a promíchána tak, aby došlo k homogenizaci. Směs byla inkubována za mírného míchání při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Po inkubaci bylo sejmuto víčko a byl odstraněn spodní uzávěr. Minikolonka byla umístěna do 2 ml zkumavky a centrifugována při 3000 rpm. Minikolonka byla odstraněna a dále byl zpracováván filtrát, který obsahuje depletovanou plazmu zbavenou albuminu, IgG a dalších (celkem 14) abundantních proteinů.

2.5 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Vzorky pro analýzu:

- Lidská plazma (100x ředěná)
- Depletovaná lidská plazma

Chemikálie a materiál:

- BCA kit – BCA1-1KT, Sigma-Aldrich, LOT: SLBQ4635V
- Proteinové standardy – 23208, Thermo Scientific, LOT: SJ257607
- 10 mM PBS
- Ultračistá voda

Postup:

Do 96 jamkové destičky bylo přidáno 10 µl standardu či vzorku do každé jamky v triplikátu. Bylo přidáno 10 µl slepého vzorku, deionizované vody a 10 mM PBS, do jamek v triplikátu. Dále byl připraven pracovní BCA roztok smícháním složek A (roztok bicinchoninové kyseliny) a B (roztok síranu měďnatého) v poměru 50:1 a objemu potřebném pro všechny vzorky. Do každé jamky bylo pipetováno 190 µl pracovního BCA roztoku. Destička byla zakryta víčkem a inkubována 30 min při 37 °C. Po inkubaci bylo odstraněno víčko a destička byla vložena do spektrofotometru. Byl vybrán přednastavený program pro měření absorpance při vlnové délce 562 nm. Získaná data byla zpracována v programu Microsoft Excel a byla spočítána koncentrace proteinů pro jednotlivé vzorky.

2.6 Příprava gelu pro SDS-PAGE elektroforézu

Pufry a roztoky:

- NuPAGE LDS vzorkový pufr (4X) – NP0007, Invitrogen, LOT: S1887691
- 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu – A7802-100ML, Sigma-Aldrich, LOT: 119K6013
- TEMED (N,N,N,N-tetramethyldiamin) – T9281-50ML, Sigma-Aldrich, LOT: BCBR4495V
- 10% persíran amonný (APS) – A44418-1KG, Sigma-Aldrich, LOT: SLBC1210V
- Převrstvovací roztok – voda saturovaná 2-butanolem
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
- Destilovaná voda

Tabulka 2: Objemy jednotlivých roztoků pro nalití 2 gelů.

	Separáční gel (15 %)	Zaostřovací gel
40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu	8,75 ml	1,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	4,35 ml	–
0,5 M Tris (pH 6,8)	–	2,5 ml
H ₂ O	4,15 ml	6,1 ml
10% SDS	175 µl	100 µl
10% APS	44 µl	50 µl
TEMED	4,4 µl	10 µl

Postup:

Byla připravena aparatura pro nalití gelů. Nalévací sklíčka a hřeben byly opláchnuty ethanolem a sklíčka byla vložena do stojánku. Sklíčka byla zajištěna ve správné poloze a řádně upevněna do aparatury. Byl připraven roztok separáčního gelu (Tabulka 2), následně byl nalit mezi sklíčka tak, aby zůstal prostor pro zaostřovací gel. Převrstvovací roztok byl napipetován nad roztok separáčního gelu až po povrch. Separáční gel se nechal 1 hod polymerizovat. Po zpolymerizování separáčního gelu byl připraven roztok pro přípravu zaostřovacího gelu. Následně byl několikrát vypláchnut zaostřovací roztok čistou vodou a prostor nad gelem byl vysušen pomocí filtračního papíru. Poté byl zaostřovací roztok napipetován mezi sklíčka až

po povrch. Do zaostřovacího roztoku byl zasunut daný hřebínek pro vytvoření jamek. Zaostřovací gel se nechal tuhnout 45 min. Po zatuhnutí je možné gel hned použít, nebo maximálně týden uchovávat při 4 °C v zavíracím sáčku s trochou vody.

2.7 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky pro elektroforézu:

- Proteinový standard Kaleidoskop – 161-0375, BIO-RAD, LOT: LOO1649A
- Lidská plazma (100x ředěná)
- Depletovaná lidská plazma

Chemikálie a materiál:

- Elektrodový pufr – složení 250 mM Tris; 1,92 M glycin; 1% SDS
- Destilovaná voda
- Barvicí roztok: Coomassie Brilliant Blue R-250
- 7% kyselina octová

Přístroje:

- Zdroj pro elektroforézu
- Elektroforetická cela

Postup:

Pro elektroforetickou separaci bylo odebráno 25 µg proteinové směsi jednotlivých vzorků. Vzorky byly doplněny do objemu 20 µl a smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 1:3. Vzorky byly povařeny 3 min a poté byly nadávkovány na gel. Marker byl nadávkován na gel v objemu 9 µl. Pro zatažení vzorků do zaostřovacího gelu byl gel vystaven na 10 min napětí 100 V. Samotná separace probíhala 45 min při napětí 200 V. Po ukončení elektroforézy byl gel opláchnut ve vodě a obarven.

Gel byl ponořen do barvicího roztoku v misce s víčkem a přes noc byl nechán na třepačce. Druhý den byl gel 5krát po 10 min odbarvován v 7% kyselině octové. Gel je možno uchovávat po delší dobu ve vakuované folii v 7% kyselině octové při 4 °C.

2.8 Štěpení a příprava vzorku

Vzorky:

- Depletovaná lidská plazma

Chemikálie a materiál:

- TMTsixplex™ Isobaric Mass Tagging Kit – #90064, Thermo Scientific, LOT: UD281550
 - 0,5 M TCEP
 - 9 mg Iodoacetamid
 - 1 M Triethylamonium bicarbonát (TEAB)
 - 10% SDS
- SOLu-Trypsin dimethylovaný – EMS0005-100UG, Sigma-Aldrich, LOT: SLBV2042
- 10% a 1% TFA
- Ethylacetát saturovaný vodou
- 10 mM PBS

2.8.1 Denaturace, redukce, alkylace a acetonová precipitace

Množství 50 µg buněčného lyzátu (vzorek dle stanovené koncentrace) bylo přeneseno do 5 ml zkumavky a doplněno na objem 250 µl 10 mM PBS. Bylo přidáno 30 µl 10% SDS. Takto připravený vzorek se nechal 3 min ve vroucí vodní lázni. Zkumavky byly stočeny. Poté bylo přidáno 30 µl 1 M TEAB a 15 µl 200 mM TCEP. Mikrozukavky byly stočeny a inkubovány 60 min při 60 °C. Po zchladnutí na laboratorní teplotu bylo přidáno 15 µl 375 mM IAC a inkubováno 30 min při 25 °C v temnu. Mikrozukavky byly opět stočeny. Následně bylo přidáno 6 objemů vymraženého acetonu (6 x 340 µl) na -20 °C a inkubováno 4 hod v mrazničce při -20 °C. Po inkubaci v mrazničce následovala centrifugace vzorku při 4 °C na 8000 rpm po dobu 10 min. Špičkou byl opatrně odstraněn supernatant. Peleta se nechala vyschnout.

2.8.2 Štěpení trypsinem

Peleta byla rozpuštěna v 10 µl 10% DOC, bylo přidáno 10 µl 1 M TEAB a 70 µl vody. Bylo zkontrolováno, zda se peleta zcela rozpustila a nezůstala přilepená na stěně. Bylo přidáno 10 µl roztoku trypsinu (1 µg). Mikrozukavky byly stočeny na minicentrifuze. Bylo zkontrolováno pH (pokud je $\text{pH} \leq 7$, přidat malé množství 1 M TEAB). Následovala inkubace při 37 °C přes noc, poté byly zkumavky stočeny.

2.8.3 Extrakce deoxycholátu sodného

Vzorek byl zchlazen na ledu. Bylo přidáno 50 μ l studené 10% TFA, což způsobilo precipitaci DOC. Následovala kontrola pH ($\text{pH} \leq 3$) a řádné zvortexování. Precipitovaný DOC byl stočen na dno zkumavky 10 min při 4000 rpm. Supernatant byl odebrán do nové 1,5 ml zkumavky. Sražený DOC byl opláchnut 100 μ l 1% TFA. Obsah zkumavky byl znovu stočen a získaný supernatant byl odebrán k původnímu supernatantu. K posbíranému supernatantu bylo přidáno 750-1000 μ l ethylacetátu saturovaného vodou, intenzivně vortexováno minimálně 30 s. Následovala centrifugace 1 min při 10000 rpm a odstranění horní vrstvy kapaliny (ethylacetát) tak, aby nedošlo k nasátí vzorku ze spodní vrstvy. Extrakce ethylacetátem byla opakována ještě čtyřikrát. Získaný vzorek byl odpařen pomocí vakuové odparky.

2.9 TMT značení

Chemikálie a materiál:

- TMTsixplex™ Isobaric Mass Tagging Kit – #90064, Thermo Scientific, LOT: UD281550
 - TMT⁶-126 značka
 - TMT⁶-127 značka
 - TMT⁶-128 značka
 - TMT⁶-129 značka
 - TMT⁶-130 značka
 - TMT⁶-131 značka
 - 1 M TEAB
 - 50% hydroxylamin
- Acetonitril (ACN)

Postup:

Vzorek byl rozpuštěn v 71 μ l 100 mM TEAB a řádně zvortexován. Byl použit TMTsixplex label kit s 0,8 mg značícího činidla. Těsně před použitím byly TMT značky ekvilibrovány na laboratorní teplotu, aby nedošlo ke kondenzaci vody. Obsah každé 0,8 mg vialky byl rozpuštěn v 29 μ l acetonitrilu a rozpouštěn 5 min za občasného vortexování. Následovalo krátké stočení na centrifuze, aby byla veškerá kapalina na dně vialky. Bylo opatrně přidáno 29 μ l TMT značky k příslušnému vzorku (100 μ l vzorku \rightarrow 50 μ g proteinu). Hmotnostní poměr značky ku vzorku byl 8:1. Výsledný objem byl 100 μ l. Následovala inkubace 1 hodinu v termomixéru při 25 °C a kontinuálním třepání (500 rpm). K zastavení reakce bylo ke vzorku přidáno 8 μ l 5%

hydroxylaminu (10x naředěný 50% hydroxylamin poskytnutý v TMT kitu, tzv. quenching reagent). Vzorky se nechaly inkubovat 15 min při 25 °C a 500 rpm. Všechny značené vzorky byly spojeny do 2 ml zkumavky. Celkový objem byl 600 µl a takto získaný vzorek byl odpařen pomocí vakuové odstředivky.

2.10 Odsolení vzorku

Chemikálie a materiál:

- Methanol
- ACN
- Ultračistá voda
- 10% TFA
- 50% ACN/0.1% TFA
- 2% ACN/ 0,1%
- Empore® C18-SD SPE kolonka, objem 1 ml – 66871-U, SUPELCO®, LOT: 90341
- Vakuový manifold
- Plastová stříkačka 2,5 ml (Combitip)

Postup:

Vysušený vzorek byl rozpuštěn v 500 µl 2% ACN/0,1% TFA. Kolonka byla promyta pomocí 300 µl ACN na vakuovém manifoldu (rychlost přibližně 1 kapka/s), vždy bylo ponecháno malé množství kapaliny nad fází. Kolonka byla ekvilibrována 300 µl 2% ACN/0,1% TFA. Poté bylo nanášeno 500 µl vzorku dvakrát po sobě. Kolonka byla promyta 2x 1 ml 2% ACN/0,1% TFA. Zbylá kapalina byla odstraněna poklepáním na papírový ubrousek, aby se zajistil daný eluční objem. Zachycené peptidy byly eluovány s využitím plastové stříkačkou do čisté 0,5 ml zkumavky pomocí 2x 150 µl 50% ACN/0,1% TFA. Vzorek byl rozaliquotován dle potřeby a vysušen vakuovou odstředivkou. Takto připravený vzorek se uchovával při -20 °C.

2.11 Příprava mikrokolonek

Materiál:

- FEP (fluorovaný ethylenpropylen) kapilára – FEP (1/16" x 0.25 mm ID, Valco Instruments Co. Inc. A VICI AG+, kat.č. JR-T-6812-M10)
- Skalpel
- Kleště

- Špendlíky o průměru 0,5 mm a 1,2 mm
- Filtr ze skleněných vláken (např. Grade GF/A: 1,6 µm, Whatman)
- Injekční jehla se zbrošeným hrotem (vnitřní průměr 0,26 mm)
- Ocelový drátek o průměru 0,24 mm (např. kytarová struna E příslušné tloušťky)
- Částice stacionární fáze získané z LC kolony
 - Kinetex 2,6 µm EVO C18 100 Å, Phenomenex, kat.č. 00G-4725-E0, resuspendované v acetonitrilu
 - Kinetex 2,6 µm HILIC 100 Å, Phenomenex, kat.č.00G-4725-00F-4461-E0, resuspendované v acetonitrilu
 - Polysulfoethyl A 5 µm, PolyLC inc., kat.č. BMSE05-10, resuspendované v methanolu
- Pipetovací špička (0,1 – 10 µl)
- Plastová stříkačka 2,5 ml (Combitip)

Postup:

Skalpelem byl odříznut přibližně 50 mm dlouhý kus FEP trubičky (pro výslednou výšku sloupce 20-30 mm stacionární fáze). Jeden konec trubičky byl upraven prudkým pohybem kleštěmi tak, aby vznikla 15-20 mm dlouhá zúžená kapilární část. Ta poté byla zkrácena na délku 5-10 mm. Druhý konec trubičky byl nejprve rozšířen do hloubky cca 8-10 mm špendlíkem o průměru 0,5 mm, následně o dalších 4-5 mm špendlíkem o průměru 1,2 mm. Pomocí upraveného hrotu jehly byl vykrojen kotouček z filtru. Jehla s filtračním kotoučkem byla vložena do rozšířeného konce trubičky a kovovým drátkem byl vykrojený filtr posunut tak, aby se dostal k zúžené části kapiláry. Do rozšířeného konce FEP trubičky byla zasunuta špička pipety 0,1-10 µl. Poté bylo pipetováno 2-3 µl stacionární fáze (resuspendované v acetonitrilu nebo methanolu) zatlačeno pomocí plastové stříkačky – Combitipu. Dle potřeby je možné přidat stacionární fázi, aby byla získána požadovaná délka kolony (obvykle 25 mm).

2.12 Frakcionace peptidických vzorků

2.12.1 Manuální frakcionace peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí

Vzorek:

- Depletovaná, naštěpená a TMT značená lidská plazma
 - 50 µg vzorku rozpuštěno ve 20 µl 2% ACN/0,1% TFA

Chemikálie a použitý materiál:

- ACN
- 200 mM mravenčan amonný (pH 10,0)
- 1% TFA
- Deionizovaná voda
- Laboratorní stojan
- Plastový stojan pro mikrogradientovou eluci s držáky připevněný na laboratorní stojan
- Kovové závaží 75 g, 150 g
- Plynotěsná mikrostříkačka 100 μ l
- 500 μ l vialky pro sbírání frakcí
- Mikrokolonka v FEP kapiláře (vnitřní průměr 250 μ m), 50 mm stacionární fáze – Kinetex EVO C18 2,6 μ m částice

Postup:

A) Příprava roztoků MF

Byly připraveny mobilní fáze (Tabulka 3). Objem roztoků byl vždy 1 ml.

Tabulka 3: Schéma pro přípravu mobilních fází pro manuální frakcionaci peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí.

mobilní fáze	složení		
	deionizovaná voda [μ l]	1% TFA [μ l]	ACN [μ l]
2% ACN/0,1% TFA	880	100	20
80% ACN/0,1% TFA	100	100	800
mobilní fáze	deionizovaná voda [μ l]	200 mM HCOONH ₄ [μ l]	ACN [μ l]
2% ACN/20 mM HCOONH ₄	880	100	20
8% ACN/20 mM HCOONH ₄	820	100	80
16% ACN/20 mM HCOONH ₄	740	100	160
24% ACN/20 mM HCOONH ₄	660	100	240
32% ACN/20 mM HCOONH ₄	580	100	320
40% ACN/20 mM HCOONH ₄	500	100	400

B) Čištění a promývání

K promytí stříkačky bylo nasáto 25 μl methanolu. Jehla stříkačky byla nasazena do širšího konce mikrokolonky (5-10 mm hluboko). Takto byla stříkačka umístěna do držáku, poté bylo nasazeno závaží. Po promytí mikrokolonky bylo do mikrostríkačky nasáto 25 μl 80% ACN/0,1% TFA. Aparatura byla připojena ke kolonce, následovalo nasazení závaží.

C) Aplikace vzorku

Pro aplikaci vzorku na kolonku bylo do stříkačky nasáto 20 μl 2% ACN/0,1% TFA, poté 20 μl vzorku a nakonec 20 μl 2% ACN/0,1% TFA. Stříkačka byla připojena k mikrokolonce. Obsah stříkačky protlačený skrz mikrokolonku se stacionární fází byl sbírán jako první (vazebná) frakce, tzv. flow-through (FT).

D) Ekvilibrace kolonky a eluce kyselých peptidů

Ekvilibrace kolonky byla provedena promytím 25 μl 2% ACN/200 mM HCOONH₄. Tento roztok byl z mikrostríkačky protlačen přes mikrokolonku a eluent obsahující peptidy nezadržující se za bazických podmínek na dané stacionární fází byl sbírán jako první frakce.

E) Tvorba mikrogradientu

Pro vytvoření mikrogradientu byly do stříkačky nasáty roztoky příslušných mobilních fází o definovaných objemech (Tabulka 4).

Tabulka 4: Tvorba mikrogradientu ve stříkačce pro manuální frakcionaci peptidů na reverzní fází v bazickém prostředí.

pořadí nasávání	mobilní fáze	nasatý objem [μl]
1	40% ACN/200 mM HCOONH ₄	16
2	32% ACN/200 mM HCOONH ₄	16
3	24% ACN/200 mM HCOONH ₄	16
4	16% ACN/200 mM HCOONH ₄	16
5	8% ACN/200 mM HCOONH ₄	16
6	2% ACN/200 mM HCOONH ₄	16

Aby nedošlo ke vzniku bublinek, je důležité stříkačkou neobracet, netřepat a zamezit pohybu pístu. Ke stříkačce byla připojena kolonka a byla zahájena separace peptidů včetně sbírání frakcí. Flow-through bylo sbíráno v celkovém objemu 60 μl , první frakce z ekvilibrace kolonky pro bazické podmínky měla objem 25 μl , frakce 2-17 po 6 μl a poslední sbíraná frakce (z rekonkondicionace kolonky) FW byla o objemu 15 μl .

F) Rekondicionace kapilární kolony, uchovávání vzorků

K rekondicionaci kapilární kolony bylo do stříkačky nasáto 15 μ l 80% ACN/0,1% TFA. Protlačení přes kolonku byla získána poslední frakce tzv. final wash (FW). Všechny frakce byly vysušeny na vakuové odparce. Takto mohly být vzorky dlouhodobě uchovávány při -20 °C, pro následnou analýzu LC-UV (či LC-MS) byly následně rozpuštěny ve 20 μ l 2% ACN/0,1% TFA a nástřikovaný objem se pohyboval v rozmezí 1–8 μ l.

2.12.2 Manuální frakcionace peptidů pomocí hydrofilní interakční chromatografie

Vzorek:

- Depletovaná, naštěpená a TMT značená lidská plazma
 - 50 μ g vzorku rozpuštěno ve 20 μ l 90% ACN/0,1% TFA

Chemikálie a použitý materiál:

- ACN
- 1 M amoniumacetát (NH₄Ac)
- Deionizovaná voda
- Methanol
- Laboratorní stojan
- Plastový stojan pro mikrogradientovou eluci s držákem připevněným na laboratorní stojan
- Plastový stojan pro mikrogradientovou eluci se stříkačkou jehlou vzhůru
- Kovové závaží 75 g, 150 g
- Plynotěsná mikrostríkačka 100 μ l
- 500 μ l vialky pro sbírání frakcí
- Mikrokolonka v FEP trubičce (vnitřní průměr 250 μ m), 50 mm stacionární fáze – Kinetex HILIC 2,6 μ m částice

Postup:

A) Čištění a promývání

Byly připraveny mobilní fáze (Tabulka 5). Objem roztoků byl vždy 1 ml.

B) Čištění

K pročištění stříkačky bylo natáhnuo 25 μ l methanolu, jehla stříkačky byla nasazena do širšího konce mikrokolonky (5-10 mm hluboko) a umístěna do držáku se závažím.

C) Aplikace vzorku

Pro aplikaci vzorku na kolonku bylo do stříkačky nasáto 20 μ l 90% ACN/20mM NH₄Ac, poté 20 μ l vzorku a nakonec 20 μ l 90% ACN/20 mM NH₄Ac. Stříkačka byla nasazena do mikrokolonky a její obsah protlačený mikrokolonkou se stacionární fází byl sbírán jako první frakce, tzv. flow-through (FT).

Tabulka 5: Schéma pro přípravu mobilních fází pro manuální frakcionaci peptidů pomocí hydrofilní interakční chromatografie.

mobilní fáze	složení		
	deionizovaná voda [μ l]	1 M NH ₄ Ac [μ l]	ACN [μ l]
20% ACN/20mM NH ₄ Ac	780	20	200
70% ACN/20mM NH ₄ Ac	280	20	700
73% ACN/20mM NH ₄ Ac	250	20	730
76% ACN/20mM NH ₄ Ac	220	20	760
79% ACN/20mM NH ₄ Ac	190	20	790
82% ACN/20mM NH ₄ Ac	160	20	820
85% ACN/20mM NH ₄ Ac	130	20	850
90% ACN/20mM NH ₄ Ac	80	20	900

D) Tvorba mikrogradientu

Pro vytvoření mikrogradientu byly do stříkačky jehlou vzhůru nasány eluční roztoky z nástřikových vialek se septem (Tabulka 6).

Tabulka 6: Tvorba mikrogradientu ve stříkačce pro manuální frakcionaci peptidů pomocí hydrofilní interakční chromatografie.

pořadí nasávání	mobilní fáze	nasatý objem [μ l]
1	70% ACN/20mM NH ₄ Ac	16
2	73% ACN/20mM NH ₄ Ac	16
3	76% ACN/20mM NH ₄ Ac	16
4	79% ACN/20mM NH ₄ Ac	16
5	82% ACN/20mM NH ₄ Ac	16
6	85% ACN/20mM NH ₄ Ac	16

Aby nedošlo ke vzniku bublinek je důležité stříkačkou neobracet, netřepat a zamezit pohybu pístu. Dále byla připojena kolonka a zahájena separace včetně sbírání frakcí. FT frakce byla sbírána v celkovém objemu 60 μl , frakce 1-16 po 6 μl a poslední sbíraná frakce (z rekondicionace kolonky) FW měla objem 30 μl .

E) Rekondicionace kapilární kolony, uchovávání

K rekondicionaci kapilární kolony bylo do stříkačky nasáto 15 μl 20% ACN/20mM NH_4Ac a 15 μl 70% ACN/20 mM NH_4Ac . Protlačením přes kolonku byla získána poslední frakce tzv. final wash (FW). Všechny frakce byly vysušeny na vakuové odparce. Takto mohly být vzorky dlouhodobě uchovávány při $-20\text{ }^\circ\text{C}$, pro následnou analýzu LC-UV (či LC-MS) byly následně rozpuštěny ve 20 μl 2% ACN/0,1% TFA. Po ukončení frakcionace byla kolonka promyta methanolem (60 μl).

2.12.3 Manuální frakcionace peptidů pomocí iontové výměnné chromatografie na silném katexu

Tento postup byl vytvořen a optimalizován v rámci této diplomové práce. Zde je uveden výsledný protokol, který byl pak aplikován na frakcionaci reálných vzorků v komparativní proteomické analýze (viz kapitola 3.5.4).

Vzorek:

- Depletovaná, naštěpená a TMT značená lidská plazma
 - 50 μg vzorku rozpuštěno ve 20 μl 50% ACN/0,1% TFA

Chemikálie a použitý materiál:

- Acetonitril (ACN)
- 1M mravenčan amonný
- 10% TFA
- Deionizovaná voda
- Laboratorní stojan
- Plastový stojan pro mikrogradientovou eluci s držáky připevněný na laboratorní stojan
- Plastový stojan pro mikrogradientovou eluci se stříkačkou jehlou vzhůru
- Kovové závaží 75 g, 150 g
- Plynotěsná mikrostríkačka 100 μl (pro 16 frakcí)
- 500 μl mikrozskumavky pro sbírání frakcí
- Mikrokolonka připravená v FEP kapiláře (vnitřní průměr 500 μm), délka kolony 50 mm, stacionární fáze – Polysulfoethyl A, 5 μm částice (POLY LC inc)

Postup:

A) Příprava roztoků MF

Byl připraven promývací roztok 500 mM HCOONH₄/30% ACN (200 µl deionizované vody, 300 µl ACN, 500 µl 1M HCOONH₄) a ekvilibrační roztok 0,1% TFA/50% ACN (490 µl deionizované vody, 500 µl ACN, 10 µl 10% TFA). Dále byly připraveny mobilní fáze pro SCX frakcionaci (Tabulka 7). Objem roztoků byl vždy 1 ml.

Tabulka 7: Schéma pro přípravu mobilních fází pro manuální frakcionaci peptidů pomocí iontoměničové chromatografie na silném katexu.

mobilní fáze	0,1% TFA/50% ACN	500mM HCOONH₄/30% ACN
1	1 000	0
2	934	66
3	914	86
4	894	106
5	834	166
6	774	226

B) Čištění a promývání

K promytí stříkačky bylo nasáto 50 µl metanolu, jehla stříkačky byla nasazena do širšího konce mikrokolonky (5-10 mm hluboko). Takto byla stříkačka umístěna do držáku, poté bylo nasazeno závaží. Po protlačení obsahu stříkačky mikrokolonkou bylo do stříkačky nasáto 50 µl 500 mM HCOONH₄/30% ACN a opět připojeno ke kolonce, nasazeno závaží. Aby se kolonka správně ekvilibrovala, byla kolonka následně propláchnuta 100 µl 0,1% TFA/50%ACN.

C) Aplikace vzorku

Pro aplikaci vzorku na kolonku bylo do stříkačky nasáto 20 µl 0,1% TFA/50% ACN, poté 20 µl vzorku a nakonec 20 µl 0,1% TFA/50% ACN a připojena k mikrokolonce. Obsah stříkačky protlačený skrz mikrokolonku se stacionární fází byl sbírán jako FT. Tato frakce obsahuje převážně polární kyselá peptidy, které se nezachytily na stacionární fází.

D) Tvorba mikrogradientu a sbírání frakcí

Pro vytvoření mikrogradientu byly do stříkačky pomalu a jehlou vzhůru nasáty roztoky v pořadí a objemech definovaných pro SCX frakcionaci (Tabulka 8). Proces eluce peptidů z SCX stacionární fáze byla rozdělen do tří elučních kroků. V každém elučním kroku byla připojena kolonka, nasazena do stojanu pro HILIC separaci (po celou dobu byla mikrostríkačka v pozici jehlou nahoru) a sbírány frakce (Tabulka 8). K zamezení vzniku nežádoucích bublinek

je třeba se stříkačkou manipulovat opatrně, neotáčet, netřepat a dávat pozor, aby nedošlo k pohybu pístu.

Tabulka 8: Třífázová tvorba gradientu ve stříkačce, sbírání jednotlivých frakcí. (příklad zápisu „1 fr./ 10 µl“ znamená „1 frakce po 10 µl“)

eluční krok	pořadí nasávání mobilních fází	mobilní fáze elučního kroku	nasátý objem mobilní fáze [µl]	počet sbíraných frakcí a jejich objem
I.	1	2	10	1 fr./ 10 µl, 2 fr./ 5 µl
	2	1	10	
II.	1	4	16	8 fr./ 6 µl
	2	3	16	
	3	2	16	
III.	1	6	16	4 fr./ 12 µl
	2	5	16	

Frakce připravené v SCX frakcionaci (Tabulka 8) byly vysušeny na vakuové odparce. V případě pozdější analýzy na LC-UV (či LC-MS) je možné vzorky uchovávat při -20 °C.

E) Výplach a rekondicionace kapilární kolony

Poslední frakce k následné LC-MS analýze byla získána propláchnutím kolony 20 µl 500 mM HCOONH₄/30% ACN a sbírána jako FW. Po ukončení frakcionace byla kolonka promyta od solí propláchnutím 60 µl 0,1% TFA/50% ACN a směsí voda-methanol (z mikrostríkačky, nasáto 70 µl methanolu a 30 µl vody).

2.13 Kapalinová chromatografie peptidů na reverzní fázi s UV detekcí

Chemikálie:

- ACN
- Deionizovaná voda
- Methanol
- TFA

Přístroje, software:

- HPLC systém UltiMate 3000 (Dionex, USA)
- Software Chromeleon (v. 6.80, Dionex, USA)

Postup:

Připravená směs peptidů byla rozpuštěna ve 20 μl 2% ACN/0,1% TFA a 1 μl byl analyzován systémem HPLC UlitMate 3000. Tento systém s UV detekcí zahrnoval μ -Precolumn (300 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$, C18PepMap 5 μm 100 Å částice; Dionex, USA) připojenou k analytické NanoEase koloně (100 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$, Atlantis C18 3 μm 100 Å částice; Waters, USA). Separace peptidů byla prováděna s bilineárním gradientem 3–44% ACN/0,1% TFA během 49 min pro frakcionované vzorky a 65 min pro nefrakcionované vzorky při průtoku 360 nL min^{-1} a UV detekcí nastavenou na 215 nm. Sběr dat a vizualizace chromatogramu byly prováděny v programu Chromeleon.

2.14 Kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí

Chemikálie:

- ACN
- Deionizovaná voda
- Methanol
- TFA

Přístroje, software:

- UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC (Dionex, USA)
- Q Exactive (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Software Xcalibur v. 3.0.

Postup:

Separace peptidů pro analýzu nanoLC-MS / MS byla provedena za použití systému UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC se zachycovací kolonou (75 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$) naplněnou 3 μm částice Acclaim PepMap100 C18 a separační kolonou (75 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$) naplněné 2 μm částicemi Acclaim PepMap RSLC C18. Vzorky byly nanесeny na zachycovací kolonu s 2% ACN/0,05% TFA a peptidová separace byla provedena s dvojitým lineárním gradientem s použitím 3–44% ACN v 0,1% kyselině mravenčí během 90 min pro frakcionované vzorky a 116 min pro nefrakcionované vzorky pod průtokem 300 nL min^{-1} . Teplota kolony byla nastavena na 40 °C. Separace byla monitorována UV detekcí při 214 nm a přímo spojená s analýzou hmotnostní spektrometrie se systémem Q Exactive v pozitivním režimu s MS skenováním v rozsahu 350–1650 m/z při 70000 FWHM, maximální doba plnění byla 100 ms a AGC limit byl $1e^6$. Výběr prekurzorů pro MS/MS byl nastaven s minimální prahovou intenzitou $5e^4$, ma-

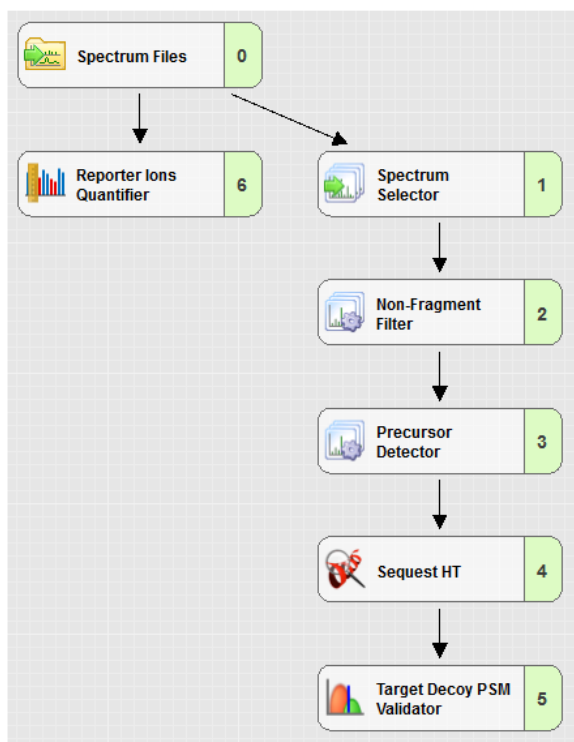
ximální dobou plnění 100 ms a AGC limitem plnění $1e^5$. Bylo vybráno 10 až 12 nejintenzivnějších prekurzorů pro MS/MS analýzu s nábojem prekurzoru 2^+ nebo vyšším při rozlišení MS/MS spekter 17500 FWHM. Instrumentální sběr dat byl proveden pomocí softwaru Xcalibur v. 3.0.

2.15 Bioinformatické zpracování dat

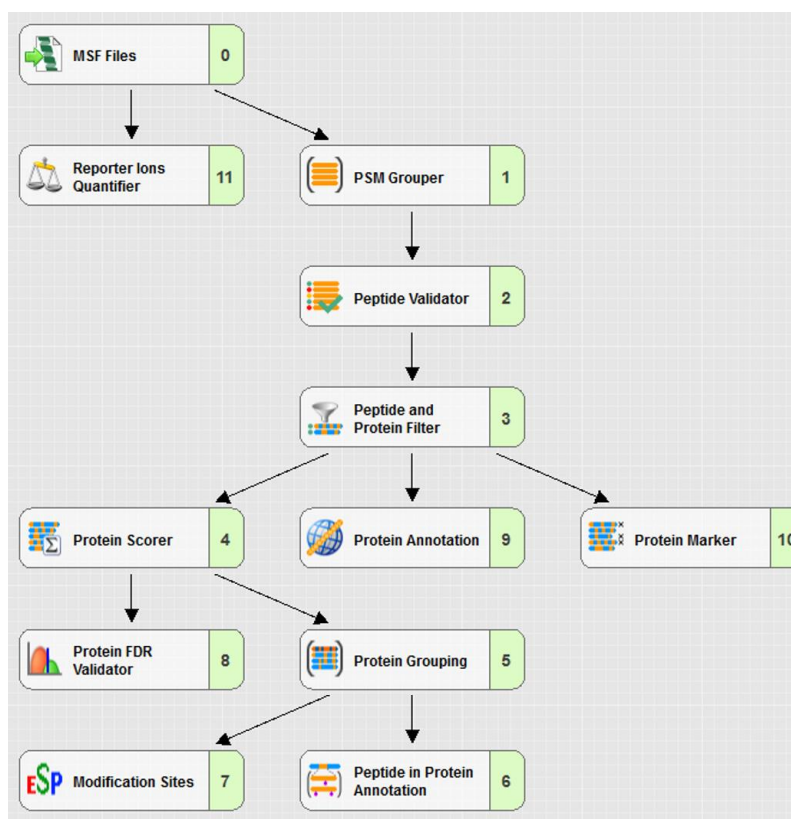
LC-MS/MS data z připravených vzorků (nefrakcionovaných i frakcionovaných) byla vyhodnocena v programu Proteome Discoverer v.2.4. V tomto programu byla definována studie s příslušnými faktory analýzy a celé vyhodnocení zde probíhá ve dvou krocích – první krok zpracování („Processing Step“) a druhý krok vyhodnocení identifikačních dat („Consensus Step“). Jako proteinová databáze byla použita sada referenčních proteinových sekvencí z člověka (reference proteome – Homo sapiens (Human)) [94] spolu s databází depletovaných proteinů a databází běžných kontaminantů cRAP [95].

První krok (Obrázek 5) zpracování LC-MS/MS dat v programu Proteome Discoverer zahrnuje načtení dat a výběr MS/MS spekter podle zadaných parametrů, která jsou dále očištěna od nežádoucích signálů a po identifikaci možných prekurzorů pro dané MS/MS spektrum jsou zpracována programem SequestHT, který je prohledává proti zadané proteinové databázi. Výsledky tohoto porovnání jsou pak vyhodnoceny z hlediska úrovně spolehlivosti identifikace. Paralelně s tímto procesem dochází v datech TMT značených peptidů také k identifikaci a vyhodnocení intenzit jednotlivých reporterových iontů nesoucích kvantitativní informaci o analyzovaných vzorcích. Výsledkem tohoto kroku je datový soubor s příponou „msf“, který obsahuje výsledky tohoto kroku zpracování LC-MS/MS dat.

Druhý krok (Obrázek 6) vyhodnocení identifikačních dat pak pokračuje načtením souboru typu „msf“, kde jsou zidentifikovaná MS/MS spektra (PSMs – Peptide Scoring Matches) seskupena k peptidovým sekvencím a identifikované peptidové sekvence jsou validovány. Následuje filtrování spolehlivě zidentifikovaných peptidů pro identifikaci proteinů, které jsou skórovány, validovány, seskupeny do proteinových skupin a případně dále anotovány. Paralelně k tomuto procesu pak běží kvantitativní analýza získaných kvantitativních údajů spolu se statistickým vyhodnocením.



Obrázek 5: První krok zpracování LC-MS/MS dat v programu Proteome Discoverer („Processing Step“). Data jsou zpracována jednotlivými uzly ve vyhodnocení pro identifikaci peptidů (vpravo) a současně jsou též extrahovány jednotlivé kvantitativní informace pro relativní porovnání jednotlivých analyzovaných vzorků (uzel „Reporter Ions Quantifier“ vlevo).



Obrázek 6: Druhý krok vyhodnocení identifikačních dat v programu Proteome Discoverer („Consensus Step“). Data z identifikace peptidů spolu s kvantitativními údaji jsou vyhodnocena a seřazena na úrovni peptidů a proteinů. Probíhá zde taky kvantitativní vyhodnocení dat a statistická analýza (uzel „Reporter Ions Quantifier“).

Parametry databázového vyhledávání byly následující:

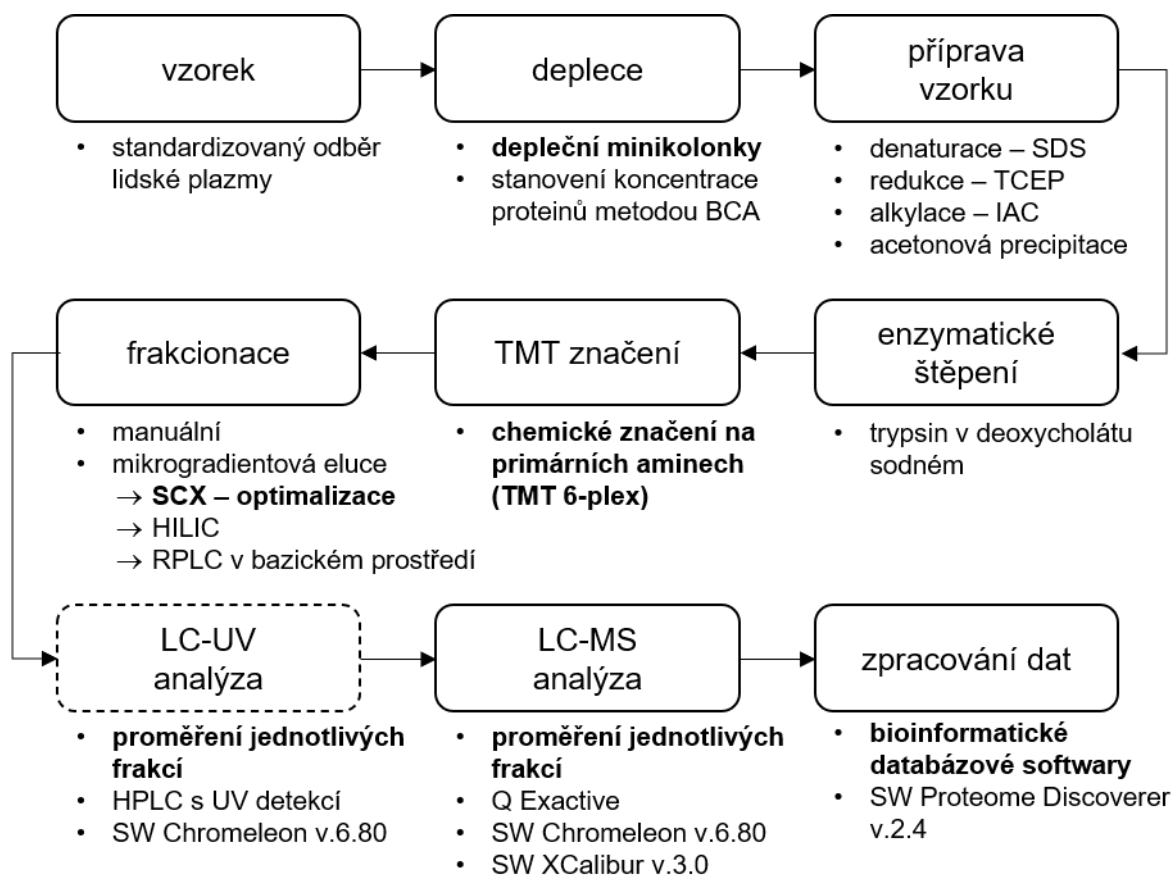
- Proteinová databáze: UP000005640, UniProt, datum stažení 27.1.2021
- Enzym: trypsin
- Max. počet vynechaných štěpných míst: 2
- Min. délka peptidu: 6 aminokyselin
- Tolerance prekurzoru: 20 ppm
- Tolerance pro fragmentové ionty: 0,02 Da
- Statické modifikace:
 - TMT6plex / +229.163 Da (Any N-Terminus)
 - Carbamidomethyl / +57.021 Da (C)
 - TMT6plex / +229.163 Da (K)
- Dynamické modifikace
 - Oxidation / +15.995 Da (M)
- Dynamické modifikace na N-konci proteinu
 - Acetyl / +42.011 Da (N-Terminus)
 - Met-loss / -131.040 Da (M)
 - Met-loss+Acetyl / -89.030 Da (M)

Pro identifikaci proteinů byly použity pouze peptidy identifikované na hladině spolehlivosti s hodnotou False Discovery Rate (FDR) menší než 1 %. Za validní byly považovány pouze proteiny, které byly identifikovány minimálně na základě 2 těchto peptidů. Výpočet poměrů proteinového zastoupení v jednotlivých vzorcích byl založen na abundanci proteinů („Protein Abundance Based“) a statistické vyhodnocení bylo provedeno testem ANOVA.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Experimentální část této práce se věnuje především optimalizaci frakcionační techniky SCX za využití Jurkat buněk a diferenční proteomické analýze plazmatických vzorků. Byly porovnávány dvě skupiny vzorků, z nichž polovinu představovala kontrolní skupina a druhá polovina vzorků byla získána od pacientů s dilatační kardiomyopatií. Stěžejním krokem experimentu bylo použití stabilních izotopových značek (TMT 6-plex) k pozdějšímu srovnávání těchto vzorků z hlediska jejich proteinového profilu.

Byly představeny tři metody manuální frakcionace peptidických vzorků včetně optimalizace jedné z nich (SCX). Identifikace proteinů byla umožněna díky následné nanoLC-MS/MS analýze a bioinformatickém zpracování získaných dat. Obrázek 7 zobrazuje průběh laboratorní práce.

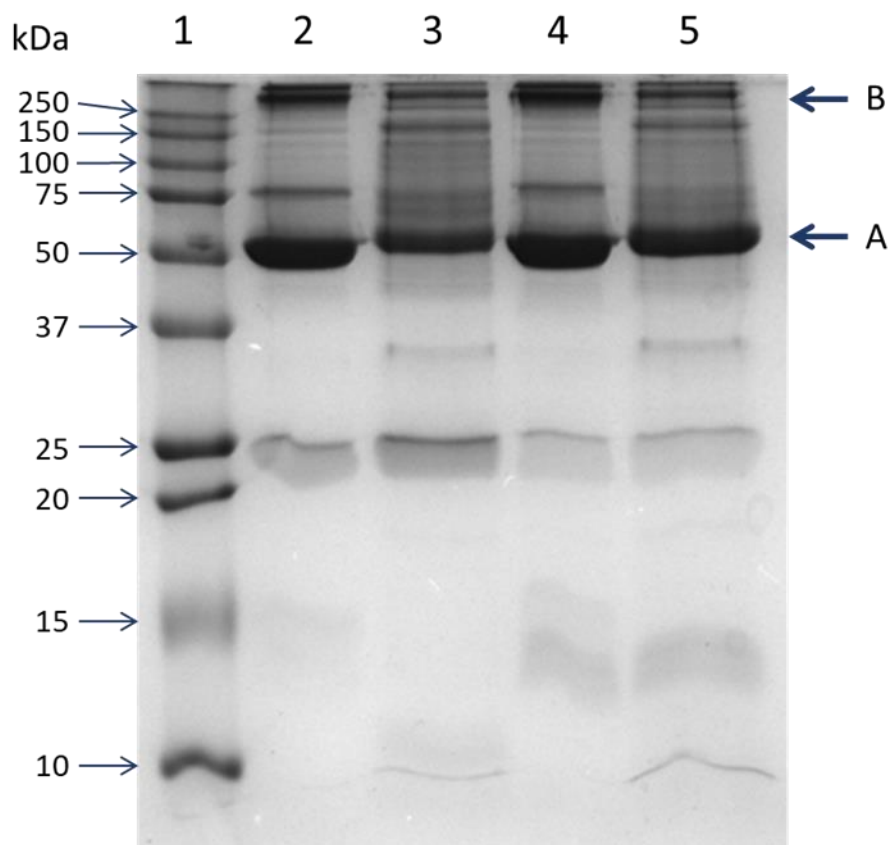


Obrázek 7: Schématické znázornění experimentální práce.

3.1 Deplece abundantních proteinů plazmy a stanovení koncentrace proteinů

Efektivní a přesná analýza klinických vzorků proteomickými technikami s sebou nese řadu komplikací. V této práci se zabýváme analýzou vzorků plazmy, proto je třeba si uvědomit, že složení plazmy je velice komplexní. Lidská plazma obsahuje celou řadu složek (voda, lipidy, hormony, anorganické soli apod.). Taktéž je v ní obsaženo velké množství proteinů, z nichž nejvyšší koncentrace dosahuje albumin a imunoglobuliny, které mohou představovat až 70 % celkových proteinů plazmy. Tyto vysoce abundantní proteiny je nutné ze vzorku odstranit, aby při analýze nedocházelo k maskování proteinů obsažených pouze v nízkých koncentracích, které ale mohou být velmi významné při hledání markerů onemocnění nebo srovnávání patologických a fyziologických stavů [96]. Za tímto účelem byla nejprve provedena deplece plazmy pomocí jednorázových deplečních kolonek z komerčně dodávané soupravy High Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns, Thermo Scientific. Použitím vysoce specifických imobilizovaných protilátek je možné snadno odstranit až 95 % ze 14 nejzastoupenějších plazmatických proteinů [11], a díky tomu umožnit detekci a identifikaci nízce abundantních proteinů hmotnostní spektrometrií či 2D gelovou elektroforézou.

Účinnost depleční metody byla ověřena separací plazmatických vzorků 1D gelovou elektroforézou. Obrázek 8 zobrazuje depleci plazmy, kdy dochází k částečné redukci hojně zastoupeného albuminu a také protilátek, které jsou vidět hlavně v oblasti s MW 300 kDa, kde se obvykle vyskytuje dimer IgG. Deplece jako taková byla provedena úspěšně, nicméně jsme očekávali vyšší účinnost hlavně v případě albuminu.



Obrázek 8: Ukázka gelu z SDS-PAGE elektroforézy vzorků lidské plazmy před a po její depleci. Při depleci byly ze vzorků odstraněny nejvíce zastoupené plazmatické proteiny, jako je albumin (A) a dimer IgG (B). 1- proteinový standard, 2- plazma zdravého pacienta, 3- depletovaná plazma zdravého pacienta, 4- plazma pacienta s DCM, 5- depletovaná plazma pacienta s DCM.

3.2 Příprava peptidické směsi a její značení izobarickými značkami

Příprava vzorků pro proteomickou analýzu musí zahrnovat takové postupy, které budou kompatibilní se všemi kroky celého procesu analýzy. Proteiny izolované z plazmy byly denaturovány SDS za vysoké teploty. SDS napomáhá proteinu k získání záporného náboje. Pro efektivnější štěpení proteinů, při kterém dochází k narušení 3D struktury, je nutné narušit disulfidické můstky zajišťující stabilitu molekuly. K redukci těchto vazeb byl použit TCEP. Aby se zamezilo opětovné tvorbě disulfidických můstků, je nutné blokovat volné -SH skupiny, za tímto účelem byl použit IAC jako alkylační činidlo [97]. Posledním krokem před samotným štěpením byla precipitace acetonem, kterou lze snížit koncentraci interferujících látek. Takto připravený vzorek byl již vhodný pro štěpení proteázou trypsinem. Trypsin je sekvenčně specifická proteáza štěpící proteiny za bazickými aminokyselinami lysinem a argininem. Výhodou použití trypsinu je vysoká specifita, neboť ke štěpení za těmito aminokyselinami dochází vždy, kromě situace, kdy lysin nebo arginin přímo sousedí s prolinem. Arginin a lysin jsou aminokyseliny frekventované v proteinech většiny organismů v takové míře, že se po štěpení trypsinem získají

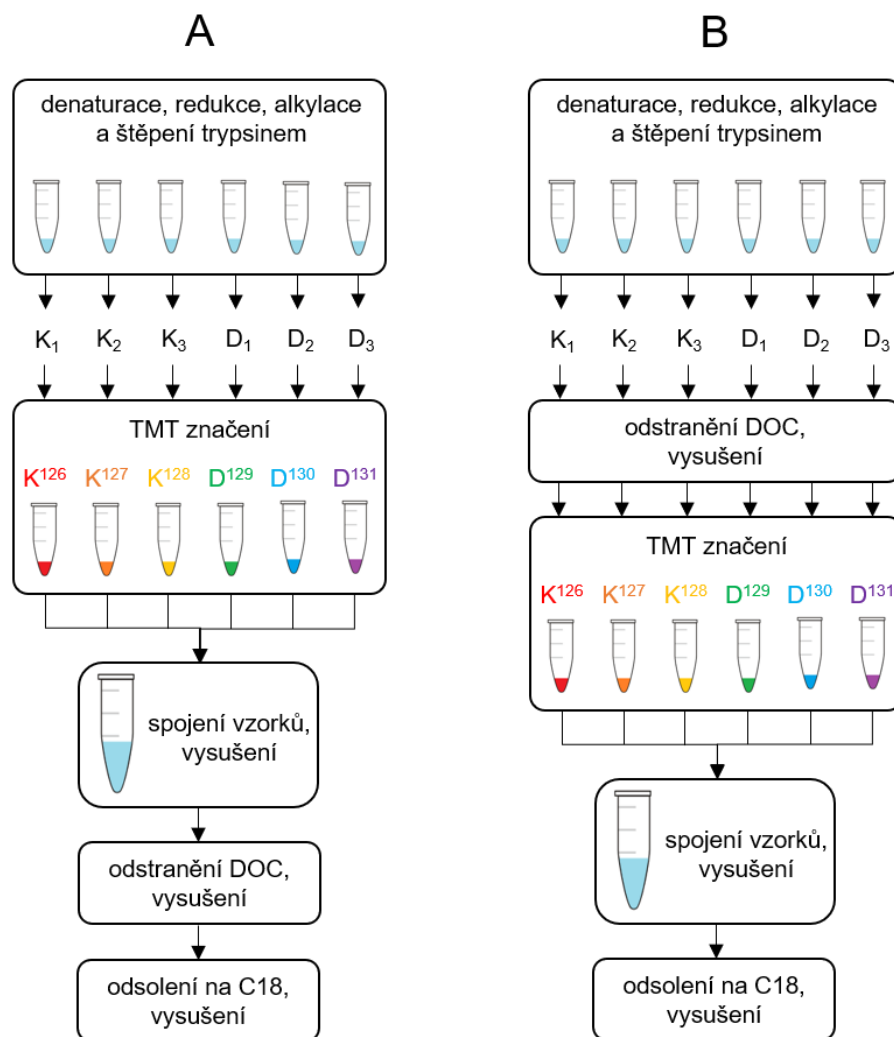
peptidy o průměrné délce 9 aminokyselin, což je velikost vhodná pro analýzu hmotnostní spektrometrií. Peptidy nesoucí na C-konci bazický arginin nebo lysin velmi dobře přijímají v ESI minimálně dva kladné náboje, kdy jeden se nachází na bazickém zbytku C-koncové aminokyseliny, a druhý pochází z N-koncové aminoskupiny peptidu, čímž je usnadněna následná fragmentace i interpretace spekter [98,99].

Ke značení peptidových vzorků byly využity TMT. Molekula této značky je složena z aminoreaktivní skupiny, reportérové skupiny, spaceru a specifické skupiny linkeru zajišťující odštěpení reportérové skupiny během fragmentace [100]. Reagencie v sadě TMT 6-plex použité v této experimentální práci obsahují šest izobarických (mají stejnou strukturu i hmotnost) činidel. Tyto činidla se liší počtem těžkých izotopů v reportérové oblasti, což je dělá jedinečné z hlediska identifikace pomocí MS. Pomocí těchto reagentů je možné označit peptidy v připraveném vzorku, a to až šesti různých vzorků v jedné MS analýze [101].

Příprava vzorku a značení izobarickými TMT značkami byla testována dvěma rozdílnými postupy (viz Obrázek 9). Postup A spočívá v přípravě vzorku před TMT značením a až po spojení všech šesti analytů do jednoho vzorku je odstraněn deoxycholát sodný (DOC). To je hlavní odlišnost od postupu B, kdy je DOC odstraňován ještě před samotným značením a spojením vzorků dohromady. Zkouška těchto dvou typů protokolů byla prováděna jako pilotní experiment se značkou TMT⁰. Modifikace peptidů TMT⁰ značkou byla ověřena v programu PMi Preview v.6.1. Cílem tedy bylo zjistit, který z protokolů je výhodnější pro proteomickou analýzu daných vzorků plazmy. Bylo zjištěno, zda by nebylo možné použít protokol A, jelikož by se ušetřil jeden krok, který by mohl být potenciálním zdrojem variability vzorku (odstranění DOC a vysušení každého vzorku zvlášť). Tento postup se však neosvědčil a dle úspěšnosti značení lysinů a N-konců peptidů (viz Tabulka 9) byl jako vhodnější způsob zvolen postup dle protokolu B, který byl následně aplikován při dalších analýzách plazmatických vzorků.

Tabulka 9: Porovnání dvou typů protokolů z hlediska úspěšnosti modifikace peptidů TMT⁰ značkou.

protokol	značení lysinů	značení N-konců
A	99,9 %	82,7 %
B	100,0 %	99,6 %



Obrázek 9: Znárodnění 2 typů protokolů k TMT⁰ značení.

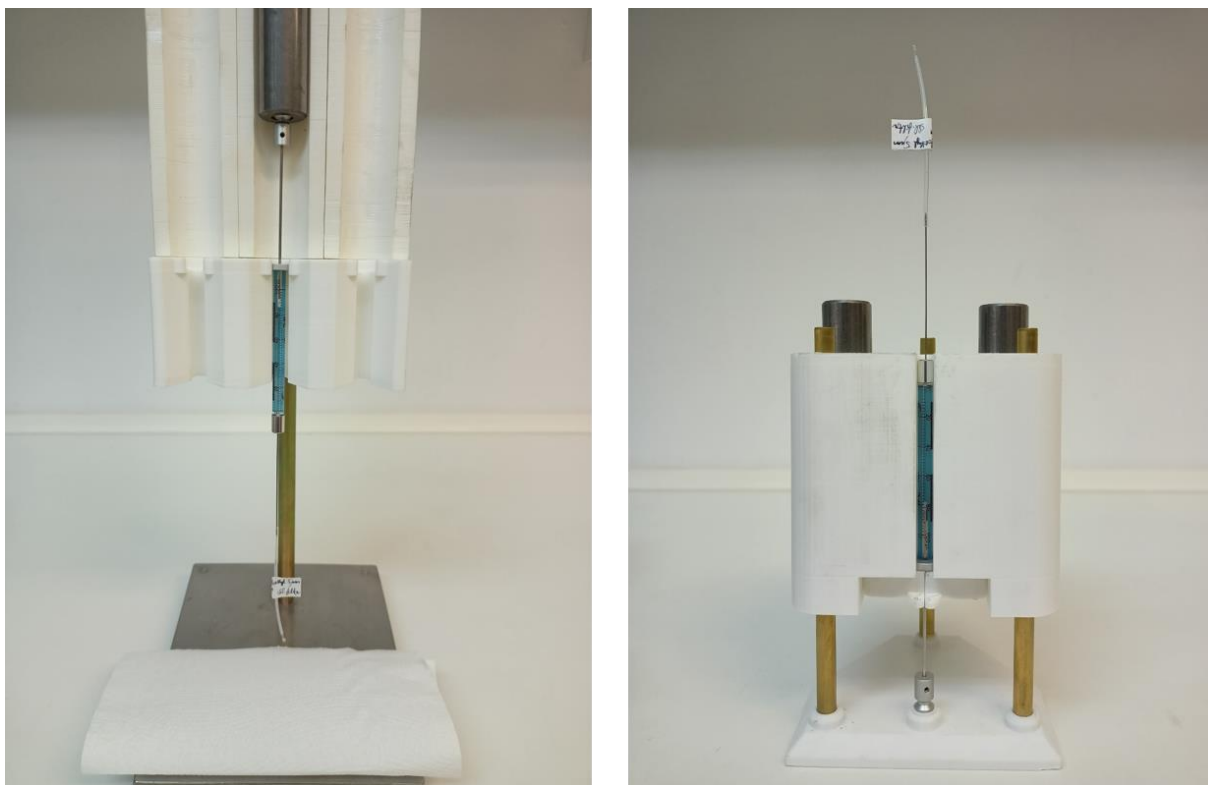
3.3 Frakcionace vzorků

Frakcionace vzorků byla provedena za účelem zlepšení detekce i málo koncentrovaných proteinů, díky tomu je možno pokrýt větší část proteomu analyzovaného vzorku. Čím je frakcionace provedena kvalitněji, tím více proteinů následně dokážeme identifikovat. Pro tyto účely jsme vybrali tři různé chromatografické přístupy separace peptidů pro jejich frakcionaci. Každá z těchto frakcionačních metod navýší počet identifikací proteinů následnou nanoLC-MS/MS analýzou v porovnání s nefrakcionovaným vzorkem. Běžně se separace provádí na kapalinovém chromatografu, nicméně z důvodu zjednodušení experimentu je postačující manuální systém. Není třeba pořizovat nákladné instrumentální zařízení, analýzy jsou poměrně rychlé a účinné. Taktéž postačuje malé množství vzorku, řádově desítky mikrogramů.

3.3.1 Mikrogradientová eluce

Eluce při chromatografické separaci může probíhat dvěma způsoby. První metodou je izokratická eluce, kdy chromatografickým systémem protéká mobilní fáze (MF) o neměnném složení. Izokratická eluce je technicky méně náročná a používá se hlavně pro analýzu látek s podobnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Při analýze složitých biologických vzorků jsou součástí analytu i látky značně se lišící v retenci. Separace by tak byla časově velmi náročná, proto se v těchto případech využívá gradientové eluce, během níž se složení mobilní fáze v čase mění [102]. Např. u RPLC koncentrace organické složky v mobilní fázi stoupá s časem, polarita mobilní fáze tedy naopak klesá. Tím se zvyšuje eluční síla a zadržované látky jsou rychleji eluovány z kolony. Látky silně zadržované s tendencí eluovat až během pozdějších analýz jsou při použití gradientové eluce vymyty vysokým podílem organické složky na závěru eluce. Tím se předejde případnému zanesení chromatografické kolony a problémům s opakovatelností metody [103].

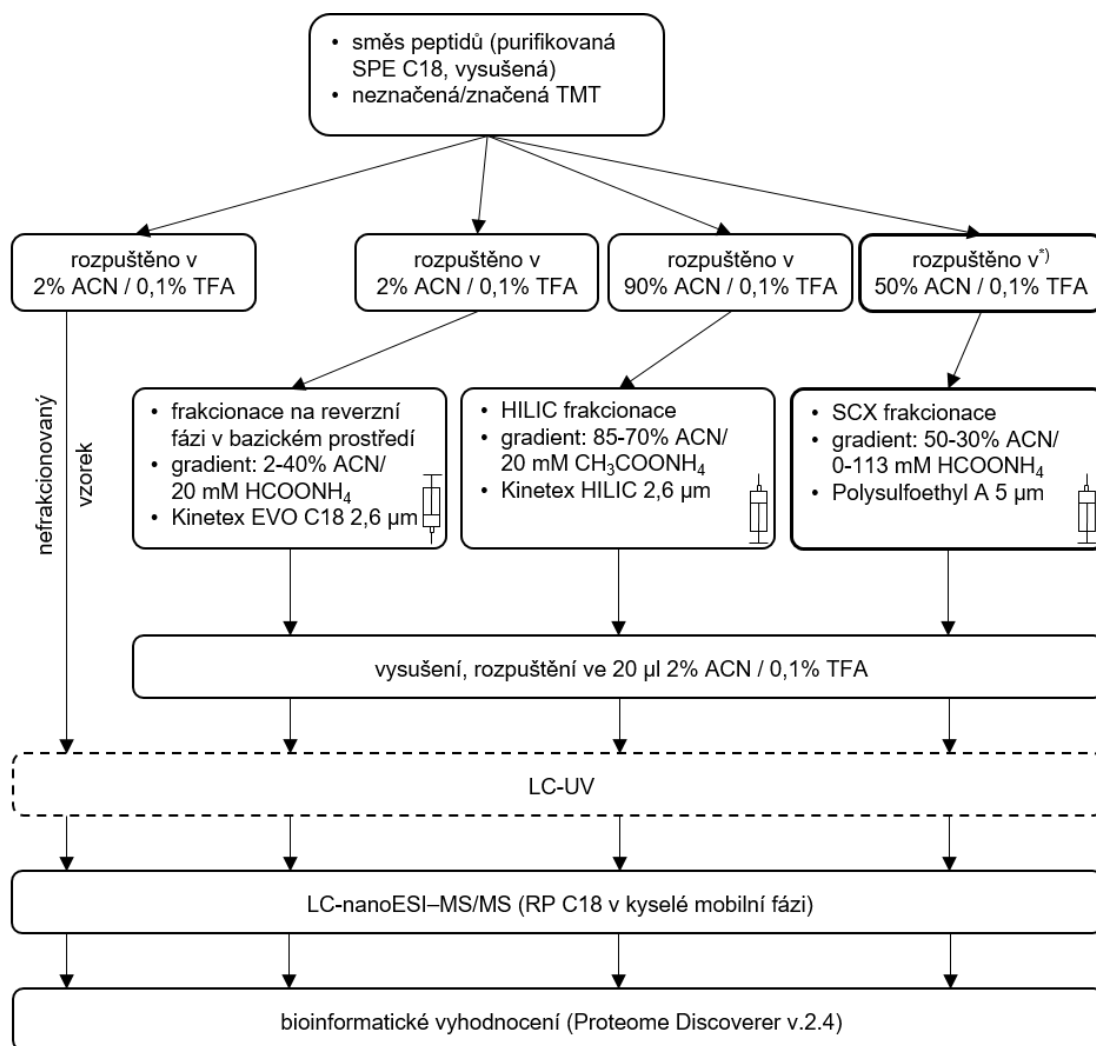
Tato práce se věnuje mikrogradientové eluci, která přenáší separaci z kapalinového chromatografu do jednoduchého manuálního zařízení. To v praxi znamená, že k frakcionaci byla použita jednoduchá, ale specifická aparatura (viz Obrázek 10). Soustava pro mikrogradientovou eluci se skládá z mikrokolonky (příprava viz. protokol 2.11) a k ní připojené plynotěsné stříkačky o objemu 100 μl , která umožňuje aplikaci gradientu mobilní fáze. Tato soustava je po ručním propojení umístěna ve speciálním stojanu se závažími, které zabezpečují stabilní průtok mobilní fáze kolonkou a po jejichž nasazení do stojanu začíná eluce [104]. Tento systém je v našem případě využíván v první rozměru dvourozměrné LC-MS/MS analýzy. Nejdříve jsou vzorky frakcionovány pomocí tohoto jednoduchého systému a v druhém rozměru je již provedena standardní nanoLC-MS/MS analýza.



Obrázek 10: Aparatury pro mikrogradientovou eluci. Vlevo pro uspořádání se stříkačkou s jehlou dolů, vpravo pro uspořádání se stříkačkou s jehlou nahoru.

Prvním přístupem pro mikrogradientovou eluci peptidické směsi, který již byl v laboratoři zaveden je frakcionace na reverzní fázi v bazickém prostředí. Postup pro bazickou mikrogradientovou eluci byl již optimalizován (Řehulka, Řehulková) a na pracovišti katedry molekulární patologie a biologie (KMPB) FVZ UO využíván. Druhou použitou metodou pro frakcionaci peptidů byla HILIC opět v mikrogradientovém uspořádání. Na pracovišti KMPB byla tato HILIC frakcionace již taktéž optimalizována a ověřena její funkčnost (Řehulka, Vozandychová). Výhoda obou těchto frakcionačních přístupů pro identifikaci peptidů analýzou LC-MS byla ověřena (nepublikovaná data).

Za účelem většího pokrytí proteomu byla do našeho experimentu zařazena i třetí frakcionační technika – SCX. Tato technika vyžadovala poměrně rozsáhlou optimalizaci, než bylo možné použít výsledný protokol. Prvotní schéma a protokol SCX frakcionace pomocí mikrogradientové eluce byla již dříve úspěšně testována na pracovišti KMPB. V tomto postupu byla použita stacionární fáze Polysulfoethyl A a gradient mobilní fáze obsahoval KH_2PO_4 , acetonitril a zvyšující se koncentraci KCl. Toto schéma bylo se souhlasem pracovníků katedry převzato a dále upravováno a optimalizováno, jak je uvedeno v této práci.



Obrázek 11: Schéma frakcionace. *) lze přímo aplikovat bez vysušení

3.4 Optimalizace SCX mikrogradientové eluce

Schéma SCX frakcionace bylo již v minulosti na pracovišti KMPB úspěšně otestováno, avšak metoda vyžadovala značnou optimalizaci pracovních podmínek. Za tímto účelem bylo provedeno několik úprav jak ve složení mobilních fází a gradientů tak i v jejich elučních objemech. Důležitý aspekt potřeby optimalizace SCX mikrogradientové eluce byl ve výběru takových mobilních fází, které by byly lépe kompatibilní s následnou nanoLC-ESI-MS/MS analýzou, např. v tom, že by nebylo nutné jednotlivé frakce ještě odsolovat před vlastním nástřikem do LC-MS systému. Tato alternativa SCX chromatografie byla převzata z protokolu přečišťování vzorků po TMT značení, kde byla navržena jako postup pro purifikaci peptidických vzorků. V naší práci byl tento způsob následně modifikován pro použití mikrogradientovém uspořádání. V tomto postupu byly mobilními fázemi pro SCX 30% ACN/0,1% TFA a 500mM HCOONH₄/30% ACN [105]. Tyto úpravy byly prováděny dle průběžných výsledků z LC-UV (viz obrázky kapitola 3.4.2). Pro sérii těchto optimalizačních experimentů byly použity vzorky

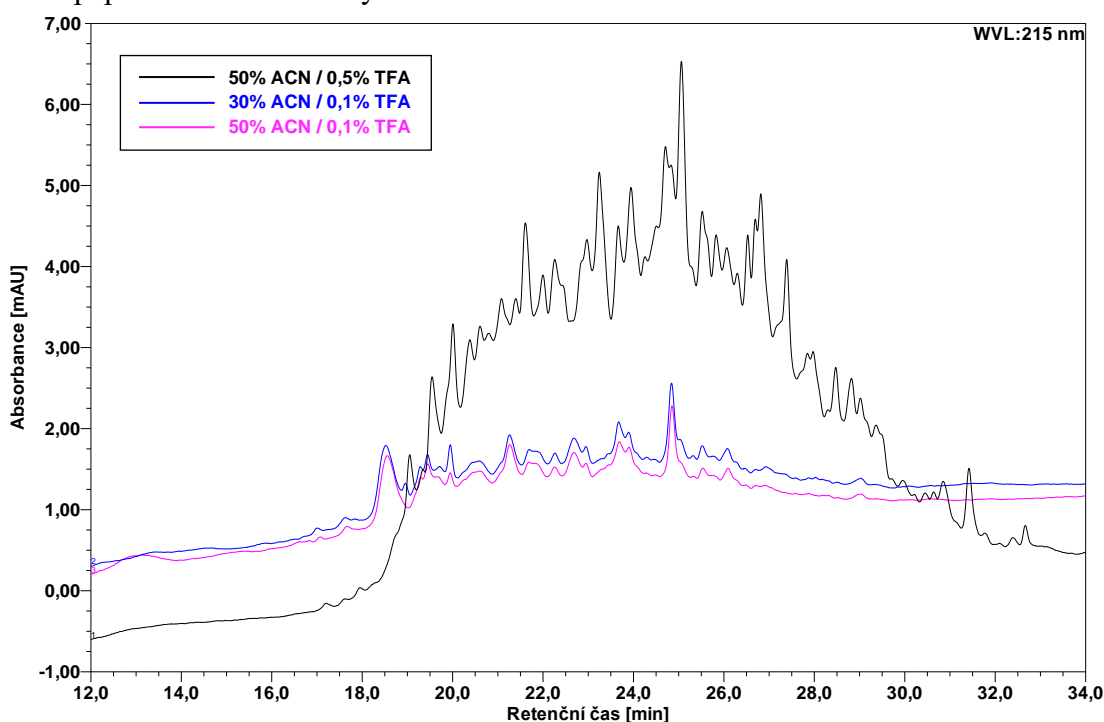
lyzátů Jurkat buněk a konečná verze gradientu na SCX byla následně použita k frakcionaci vzorků lidské plazmy značené TMT značkami. Během celého optimalizačního procesu bylo třeba vzít v potaz několik parametrů, které jsou popsány níže. Celkem bylo provedeno přes dvě desítky různě modifikovaných protokolů, u některých z nich se zjistilo, že jsou pro tuto analýzu nevhodné, proto jim dále nebyla věnována pozornost. V této práci jsou uvedeny pouze varianty protokolů, jejichž výsledky poskytly zajímavé poznatky. Volba vhodného gradientu pro danou analýzu je poměrně náročná a optimalizuje se nejlépe empiricky.

3.4.1 Optimalizace podmínek nanášení vzorku

Nejprve byl řešen výběr vhodného složení mobilních fází. Mobilní fáze s menší eluční silou slouží k rozpouštění vzorku, ekvilibraci kolonky i k nanášení vzorku na kolonku. Pro tuto MF byly testovány rozdílné koncentrace ACN a TFA (Obrázek 12:).

- 50% ACN/0,5% TFA
- 30% ACN/0,1% TFA
- 50% ACN/0,1% TFA

Pro eluci vzorku se používá mobilní fáze o větší eluční síle (v případě tohoto experimentu 30% ACN/500 mM HCOONH₄). Obrázek 12 znázorňuje, že při stejné koncentraci TFA a rozdílné koncentraci ACN je účinnost záchytu peptidické směsi na stacionární fázi podobná. Při vyšší koncentraci TFA v MF je záchyt peptidů výrazně snížen, což se projevilo intenzivním signálem peptidů v LC-UV analýze vazebné frakce testovaného vzorku.



Obrázek 12: Volba vhodné mobilní fáze pro záchyt peptidů na stacionární fázi.

3.4.2 Optimalizace mikrogradientu pro SCX

Další důležitou proměnnou v celém procesu optimalizace metody představuje způsob tvorby mikrogradientu. Do mikrostříkačky bylo třeba nasávat roztoky MF pomalu a konstantní rychlostí tak, aby nedošlo ke smísení MF ve stříkačce. Nabírání do stříkačky probíhalo v uspořádání s jehlou nahoru a takto byla mikrogradientová soustava ponechána po celou dobu frakcionace (Obrázek 10 vpravo). Dalším parametrem pro optimalizaci jsou koncentrace a objemy jednotlivých elučních mobilních fází natahovaných do stříkačky a objemy sbíraných frakcí. Nejprve byla gradientová eluce peptidů prováděna najednou přes celý koncentrační rozsah elučních fází (jednoduchá gradientová eluce) a po dalších úvahách bylo toto modifikováno na eluční schéma rozdělené do tři samostatných elucí pokrývajících celkově rozsah koncentrací elučních mobilních fází (trojitá gradientová eluce).

Jednoduchá gradientová eluce

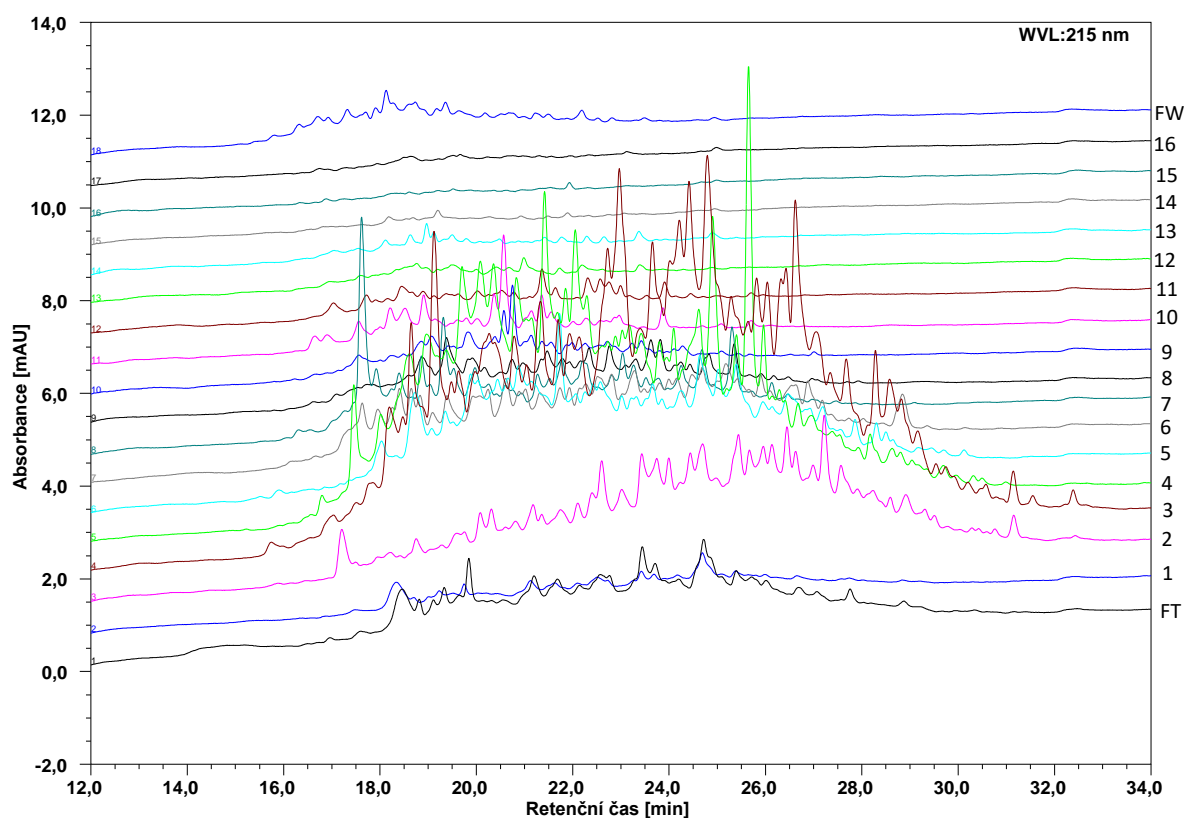
Optimalizační proces SCX mikrogradientové eluce byl nejprve prováděn jednoduchou mikrogradientovou elucí. Do stříkačky s jehlou směřující vzhůru byly postupně natahovány eluční mobilní fáze s klesající koncentrací soli. V tomto uspořádání docházelo i k eluci jednotlivých frakcí. Eluce pak v tomto manuálním systému probíhá tak, že jako první vytéká ze stříkačky MF s nejnižší eluční silou (nejnižší koncentrace soli) a jako poslední naopak MF s nejvyšší eluční silou (nejvyšší koncentrací soli).

Tabulka 10: Přehled variant pro jednoduchou gradientovou eluci (i je číslo protokolu, Δc je koncentrační rozsah mobilní fáze, c_{ACN} je koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi, c_{MF} je koncentrace mobilní fáze v dané frakci, V_N je objem nasávaný do stříkačky a V_S je objem sbíraných frakcí, příklad zápisu „15 fr./ 6 μ l“ znamená „15 frakcí po 6 μ l“)

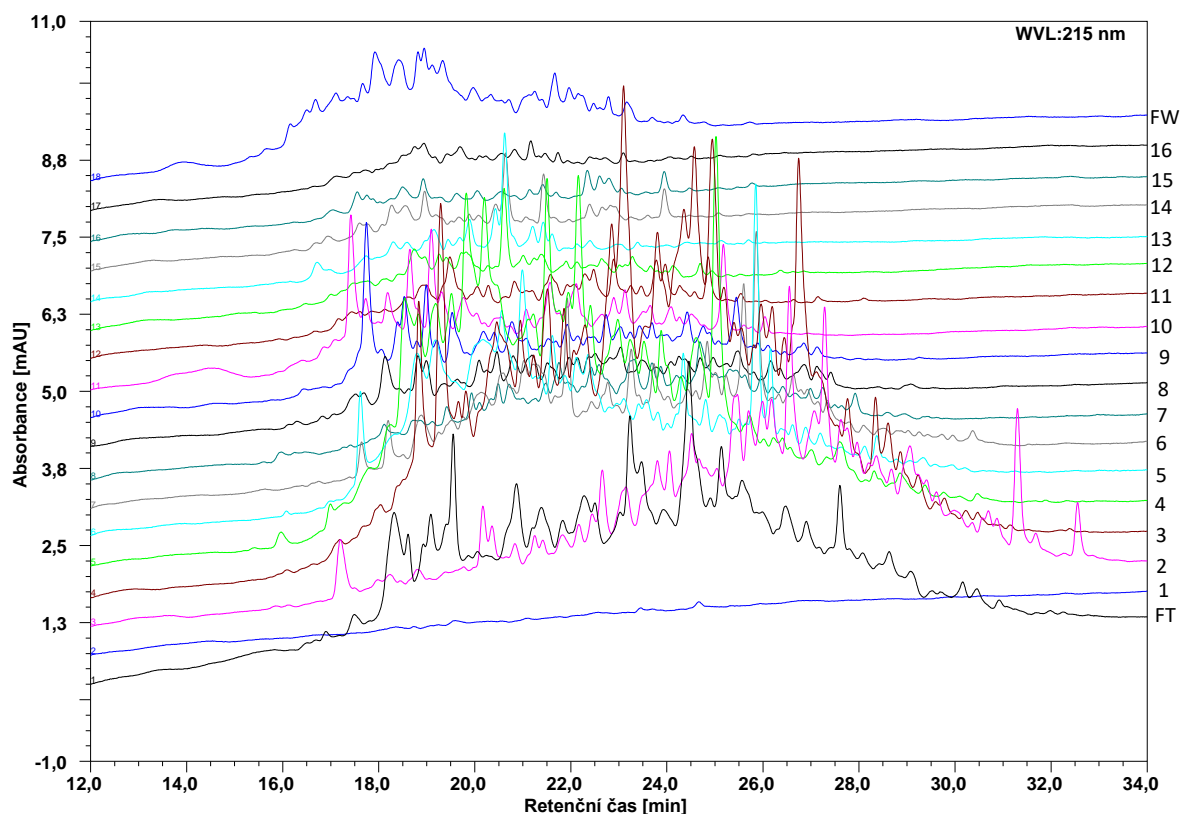
i	Δc [mM]	c_{ACN} [%]	c_{MF} [mM]	V_N [μ l]	V_S [μ l]
1	30-120	30	120	36	15 fr./ 6 μ l, 1 fr./ 10 μ l
			90	28	
			60	22	
			30	14	
2	30-110	30	110	32	15 fr./ 6 μ l, 1 fr./ 10 μ l
			70	26	
			50	24	
			30	18	
3	30-110	50	110	16	15 fr./ 6 μ l, 1 fr./ 10 μ l
			70	22	
			50	26	
			30	36	

Tabulka 10 zobrazuje použité protokoly jednoduché mikrogradientové eluce. Způsob interpretace údajů z tabulky je možné ukázat na protokolu č. 1 (u ostatních protokolů lze údaje interpretovat analogicky). Nejprve bylo nasáto 36 μl 120 mM HCOONH_4 v 30% ACN, dále bylo postupně nasáváno 28 μl 90 mM, 22 μl 60 mM a 36 μl 30 mM HCOONH_4 v 30% ACN. Bylo sbíráno celkem 16 frakcí, z čehož prvních 15 frakcí bylo o objemu 6 μl a poslední frakce byla o objemu 10 μl .

V protokolu číslo 1 byl zvolen koncentrační gradient mobilní fáze s obsahem 30-120 mM HCOONH_4 a 30% ACN. Bylo sbíráno celkem 16 frakcí. Ve střední části gradientu byla pozorována skoková eluce většího množství peptidů, naopak poslední tři sbírané frakce (fr. 14-16) již neobsahovaly peptidy téměř žádné (Obrázek 13). Aby bylo dosaženo rovnoměrnější distribuce, byl v protokolu číslo 2 snížen koncentrační gradient HCOONH_4 na 30-110 mM a došlo k mírné modifikaci natahování jednotlivých roztoků MF do mikrostríkačky (Obrázek 14). Přestože toto schéma poskytovalo již poměrně dobré výsledky, byla snaha rozprostřít eluci peptidových frakcí ze střední části směrem k vyšším frakcím.



Obrázek 13: SCX jednoduchá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 30-120 mM HCOONH_4 . V Tabulka 10 odpovídá označení č. 1. Mobilní fáze A – 0,1% TFA/30% ACN mobilní fáze B – 500 mM HCOONH_4 /30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1 až 16 - gradient (30-120 mM HCOONH_4). FW – promytí mobilní fáze B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.



Obrázek 14: SCX jednoduchá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 30-110 mM HCOONH₄. V Tabulka 10 odpovídá označení č. 2. Mobilní fáze A – 0,1% TFA/30% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1 až 16 - gradient (30-110 mM HCOONH₄). FW – promytí mobilní fázi B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na vodorovné ose o kladnou diferenci.

V protokolu číslo 3 byl obrácen trend nasávání MF do stříkačky tím způsobem, že největší natažené množství do stříkačky představoval roztok s nejnižší koncentrací mravenčanu amonného. Zásadní změnou bylo zvýšení koncentrace ACN v MF (o původním složení 0,1% TFA/30% ACN). Za účelem zvýšení stability gradientu bylo přistoupeno ke změně složení mobilní fáze A na 50% ACN/0,1% TFA (Příloha A). Toto zvýšení koncentrace ACN v MF (o původním složení 0,1% TFA/30% ACN) používané pro nanášení vzorku na kolonku umožňuje též přímé použití elučního roztoku z SPE C18 purifikace naštěpených peptidů bez nutnosti aplikace vysoušecího kroku před nanášením vzorku na SCX kolonku (Obrázek 11). Po proměření získaných frakcí na LC-UV bylo pozorováno relativně větší množství nezachycených peptidů ve FT, nicméně jako frakce pro LC-MS analýzu lze FT takto úspěšně použít. Ve třetí eluční frakci pak navíc došlo k eluci nepřiměřeně velkého množství peptidů. Toto schéma lze tedy použít a nanášení vzorku v 50% ACN je možné a prakticky výhodné, ale vzhledem k chování elučních frakcí při dalších experimentech se do budoucna (po příslušném experimentálním ověření) jeví jako možnost nanášení vzorku v nižším množství ACN a také s nižší koncentrací TFA.

Jednoduchá mikrogradientová eluce se ukázala jako funkční frakcionační technika, při níž lze dosáhnout relativně rovnoměrného rozložení peptidů eluovaných v jednotlivých frakcích. Vzhledem k určité převaze množství peptidů v dřívějších frakcích jednoduché mikrogradientové eluce byl v dalším optimalizačním kroku zvolen experiment trojitě mikrogradientové eluce, který umožňuje jemnější definici průběhu gradientového elučního profilu.

Trojitá gradientová eluce

Eluce trojitým gradientem je založena na stejném principu jako jednoduchá mikrogradientová eluce. Liší se pouze tím, že je prováděna ve třech po sobě jdoucích elučních krocích. Z hlediska provedení představuje každý eluční krok jednoduchou mikrogradientovou eluci. Ovšem pro vytvoření koncentračního gradientu jsou do mikrostříkačky nasávány jen vybrané MF a počet sbíraných frakcí je menší. Cílem použití trojitě eluce bylo dosažení rovnoměrnější distribuce peptidů v jednotlivých frakcích celkové eluce peptidů.

Tabulka 11: Přehled variant pro trojitou gradientovou eluci (i je číslo protokolu, Δc je koncentrační rozsah mobilní fáze, c_{MF} je koncentrace mobilní fáze v dané frakci, c_{ACN} je koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi, V_N je objem nasávaný do stříkačky a V_S je objem sbíraných frakcí, příklad zápisu „2 fr./ 10 μ l“ znamená „2 frakce po 10 μ l“)

i	Δc [mM]	c_{ACN} [%]	1. gradient			2. gradient			3. gradient		
			c_{MF} [mM]	V_N [μ l]	V_S [μ l]	c_{MF} [mM]	V_N [μ l]	V_S [μ l]	c_{MF} [mM]	V_N [μ l]	V_S [μ l]
1	0-150	30	30	10	2 fr./ 10 μ l	90	16	8 fr./ 6 μ l	150	10	3 fr./ 10 μ l
			0	10		60	16		120	10	
						30	16		90	10	
2	0-125	30	25	10	1 fr./ 20 μ l	75	16	8 fr./ 6 μ l	125	16	4 fr./ 12 μ l
			0	10		50	16		100	16	
						25	16		75	16	
3	0-120	30	30	10	1 fr./ 20 μ l	60	16	8 fr./ 6 μ l	120	16	6 fr./ 8 μ l
			0	10		45	16		90	16	
						30	16		60	16	
4	0-113	30	33	10	1 fr./ 20 μ l	53	16	8 fr./ 6 μ l	113	16	6 fr./ 8 μ l
			0	10		43	16		83	16	
						33	16		53	16	
5	0-113	30	33	10	1 fr./ 20 μ l	53	8	8 fr./ 6 μ l	113	16	6 fr./ 8 μ l
			0	10		43	12		83	16	
						33	28		53	16	
6	0-110	50	30	20	2 fr./ 20 μ l	50	24	6 fr./ 10 μ l, 1 fr./ 12 μ l	113	24	6 fr./ 12 μ l
			0	20		40	24		83	24	
						30	24		53	24	
7	0-100	50	10	10	2 fr./ 10 μ l	40	20	10 fr./ 8 μ l	100	30	3 fr./ 20 μ l
			0	10		30	20		40	30	
						20	20				
						10	20				

Natahování MF do stříkačky probíhalo stejně jako u jednoduché eluce v uspořádání s jehlou směřující nahoru. Roztoky MF byly do mikrostříkačky natahovány od nejvyšší koncentrace mravenčanu amonného po nejnižší koncentraci. Eluce pak v tomto manuálním systému probíhá tak, že jako první vytéká ze stříkačky MF s nejnižší eluční silou (nejnižší koncentrace soli) a jako poslední naopak MF s nejvyšší eluční silou (nejvyšší koncentrací soli).

Tabulka 11 zobrazuje použité protokoly trojitě mikrogradientové eluce. Způsob interpretace údajů z tabulky je možné ukázat na protokolu č. 1 (u ostatních protokolů lze údaje interpretovat analogicky). V prvním elučním kroku (1. gradient) bylo nejprve nasáto 10 μl 30 mM HCOONH_4 a následně bylo 10 μl MF bez HCOONH_4 . Byly sbírány 2 frakce o objemu 10 μl . V druhém elučním kroku (2. gradient) bylo nejdříve nasáto 16 μl 90 mM HCOONH_4 , následovalo nasátí 16 μl 60 mM a 16 μl 30 mM. Bylo sbíráno 8 frakcí o objemu 6 μl . V třetím elučním kroku (3. gradient) bylo prvně nasáto 10 μl 150 mM HCOONH_4 , následovalo nasátí 10 μl 120 mM a 10 μl 90 mM. Byly sbírány 3 frakce o objemu 10 μl .

Protokol číslo 1 v rámci trojitě mikrogradientové eluce byl připraven rozdělením do 13 frakcí za použití koncentračního gradientu MF HCOONH_4 0-150 mM (Tabulka 11, Obrázek 15). Po tomto prvním experimentu nebylo rozložení peptidů ve frakcích optimální, proto bylo přistoupeno k dalším modifikacím.

V protokolu číslo 2 byl snížen koncentrační gradient HCOONH_4 na 0-125 mM. První eluční krok byl spojen do jedné frakce, protože v předchozím experimentu byly první dvě vazebné frakce téměř bez peptidů. V druhém elučním kroku byl snížen koncentrační gradient s předpokladem rovnoměrnějšího rozprostření frakcí (Příloha B).

V protokolu číslo 3 byl podruhé snížen koncentrační gradient druhého elučního kroku a zvýšil se celkový počet frakcí z 13 na 15 s cílem lepší distribuce eluovaných peptidů ve vazebných frakcích (Příloha C). Těmito změnami nebylo dosaženo požadovaného vylepšení.

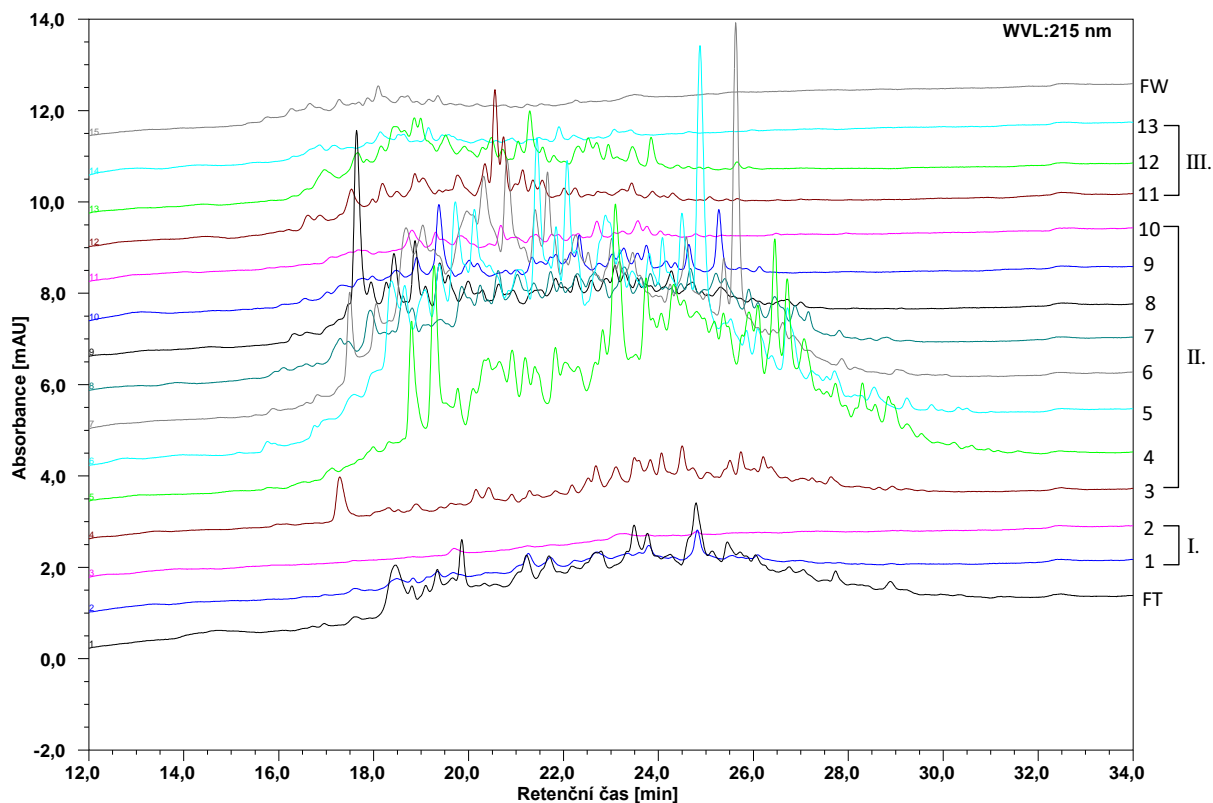
Ve čtvrtém experimentu (Obrázek 16) byl znovu snížen koncentrační gradient v druhém elučním kroku (z původního rozsahu 30-90 mM na nový rozsah 33-53 mM) se snahou umístit tento prostřední eluční krok právě do oblasti, kde se eluuje největší množství peptidů ze vzorku. Toto schéma již poskytovalo poměrně vyhovující distribuci peptidů ve frakcích. Po úpravě počtu frakcí v jednotlivých elučních krocích a změně v koncentraci ACN bylo použito na plazmatické vzorky značené TMT 6-plex.

Stále však byla snaha eluci více rozvolnit. Proto byly provedeny další postupy spočívající především v modifikaci natahovaných objemů jednotlivých roztoků MF do stříkačky. Provedenými změnami nebylo bohužel dosaženo lepších výsledků, což je nyní ve světle pozdějších experimentů připisováno jak velkému objemu mobilní fáze obsahující 33 mM HCOONH_4

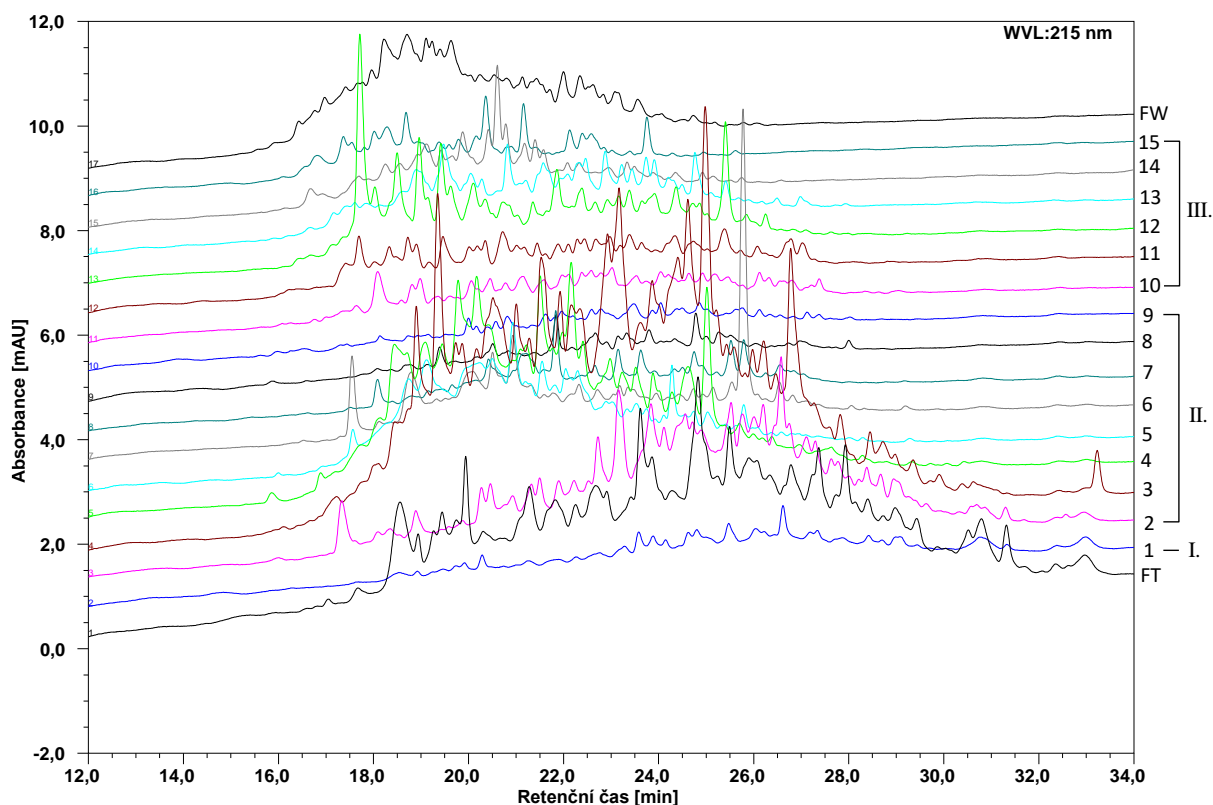
v druhém elučním gradientu, tak také nejspíše zvýšenému obsahu ACN v mobilní fázi A. (Příloha D, Příloha E, Příloha F).

Dále byla testována obecná reprodukovatelnost frakcionační metody na příkladu dvojnásobného provedení protokolu č. 7, které bylo navíc provedeno dvěma osobami nezávisle na sobě (Příloha F, Příloha G). Dle frakcionačních spekter z LC-UV byla reprodukovatelnost považována za dostatečně vyhovující a tím i použitelnost v laboratorních postupech.

Z hlediska trojitě mikrogradientové eluce byl jako nejvhodnější zvolen protokol číslo 4, který byl s úpravou počtu frakcí v prvním a třetím elučním kroku aplikován na frakcionaci plazmatických vzorků. Vzhledem ke snaze o zvýšení stability elučního gradientu a zjednodušení zpracování vzorku peptidů zde byl změněn obsah ACN v mobilní fázi A z původních 30% na 50%, kdy bylo při nanášení vzorku (Obrázek 12) ověřeno, že by se měl vzorek vázat na SCX kolonku dostatečným způsobem.



Obrázek 15: SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-150 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1% TFA/30% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1,2 - 1. gradient (0-30 mM HCOONH₄). Frakce 3 až 10 - 2. gradient (30-90 mM HCOONH₄). Frakce 11 až 13 - 3. gradient (90-150 mM HCOONH₄). FW – promytí mobilní fázi B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.



Obrázek 16: SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-113 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1% TFA/30% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1 - 1. gradient (0-33 mM HCOONH₄). Frakce 2 až 9 - 2. gradient (33-53 mM HCOONH₄). Frakce 10 až 15 - 3. gradient (53-113 mM HCOONH₄). FW – promytí mobilní fázi B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.

3.4.3 Shrnutí výsledků a možnost další optimalizace

Po sérii provedených experimentů lze konstatovat, že se podařilo vytvořit funkční frakcionační protokol peptidů pomocí SCX chromatografie, a lze tak techniku manuální frakcionace peptidů pomocí iontoměničové chromatografie na silném katexu považovat za adekvátní způsob frakcionace proteomických vzorků tohoto typu. Primárním cílem bylo zlepšení následné identifikace proteinů, což bylo pozdější MS/MS analýzou potvrzeno (Tabulka 12, Kapitola 3.6).

Po souhrnném zhodnocení získaných dat lze uvést několik změn, díky kterým by případná pokračující optimalizace mohla poskytnout ještě lepší výsledky z hlediska distribuce peptidů ve frakcích. Koncentrace ACN v mobilní fázi se jeví jako zcela klíčová – s rostoucí koncentrací ACN roste jistým způsobem i eluční síla mobilní fáze, a proto se v případě použití koncentrovanějšího ACN mohly některé peptidy eluovat příliš brzy. Další optimalizační krok by mohl spočívat ve zlepšení protokolu pro jednoduchý gradient a to tak, že by se upravily objemy mobilních fází pro eluci.

Samostatným námětem pro další optimalizaci pak je možnost eluce zvyšující se koncentrací TFA, kdy např. Obrázek 12 ukazuje, že zvýšený obsah TFA zvyšuje eluční sílu mobilní

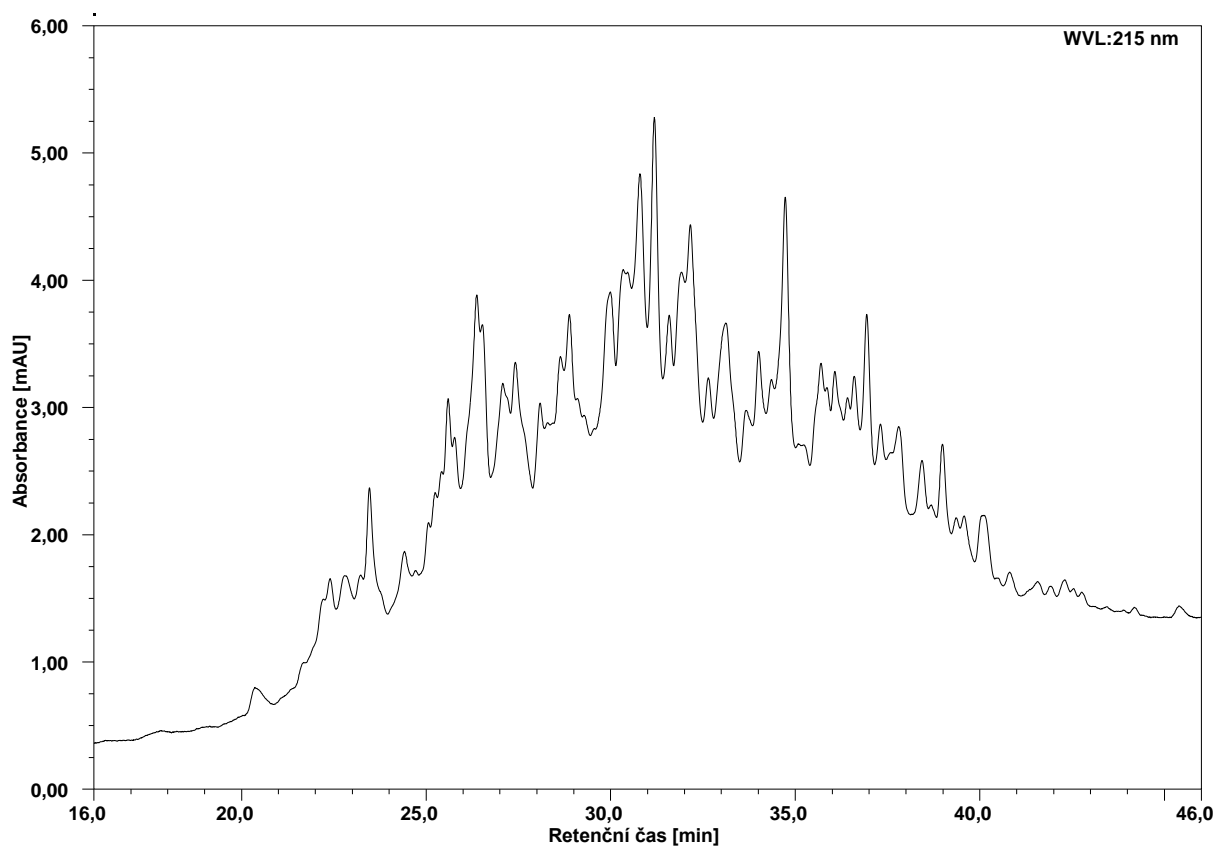
fáze. To pak vhodně nakombinováno s koncentrací ACN může vést např. k tomu, že by se celá eluce mohla provádět i se stříkačkou v pozici jehlou dolů.

3.5 Aplikace frakcionačních metod na vzorky lidské plazmy

Pro proteomickou analýzu vzorků plazmy byly v této práci zvoleny tři frakcionační metody z důvodu identifikace co možná největšího počtu proteinů v daných vzorcích. To je klíčové pro možnost analýzy i méně zastoupených proteinů, které však mohou mít v organismu významné funkce. První metodou byla frakcionace peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí, druhou frakcionace pomocí HILIC. Poslední způsob prováděné frakcionace představovala SCX, které byla věnována největší pozornost z důvodu její nezbytné optimalizace. Tyto tři frakcionační metody byly prováděny netradičně, a to pomocí manuálního systému.

3.5.1 Analýza nefrakcionovaného vzorku

Obrázek 17 znázorňuje bohatou proteinovou směs nefrakcionovaného vzorku. U nefrakcionovaného vzorku je počet kvantifikovaných proteinů menší než u vzorků, které byly podrobeny frakcionaci (Tabulka 12).

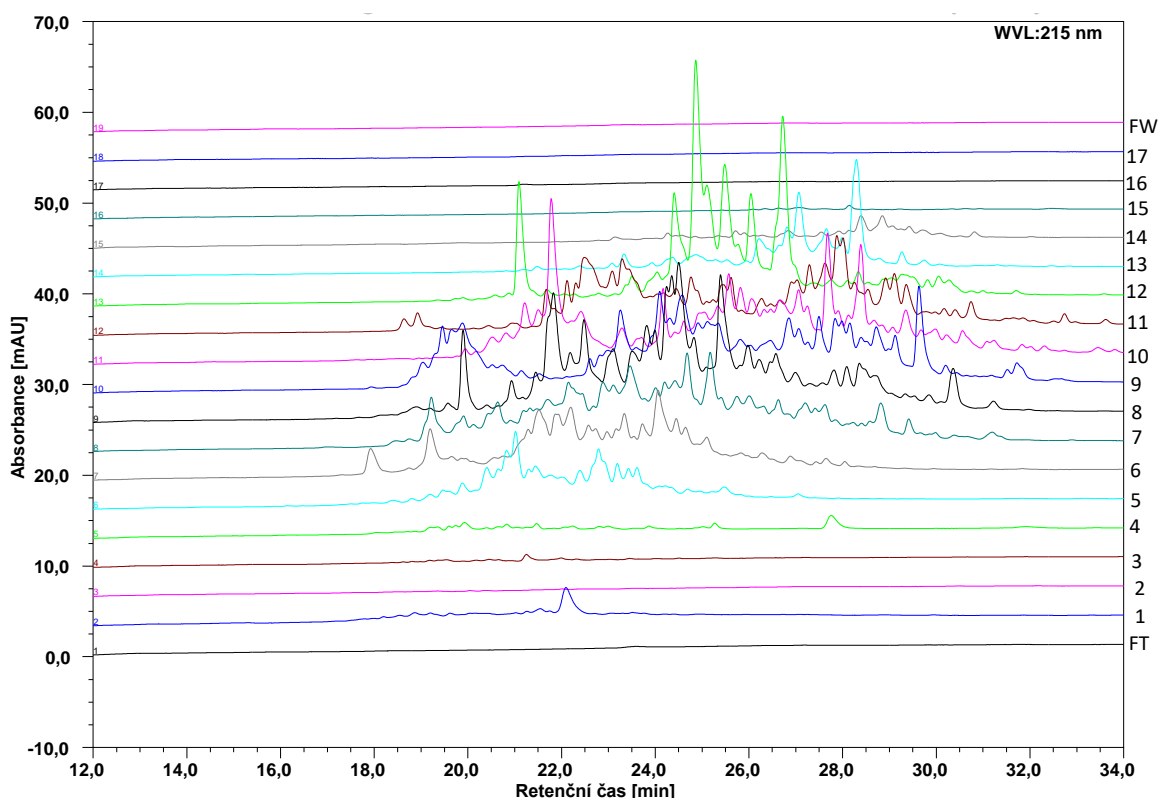


Obrázek 17: Nefrakcionovaný vzorek.

3.5.2 Bazická mikrogradientová eluce

Frakcionace vzorku plazmy na reverzní fázi v zásaditých mobilních fázích probíhala na stacionární fázi Kinetex C18 EVO. Vzorek byl na stacionární fázi aplikován v kyselém prostředí, jelikož za těchto podmínek dochází k efektivnějšímu zachytu peptidů (ověřeno Řehulka, Vozandychová). Po ekvilibraci mikrokolonky na bazické prostředí (frakce č.1) byla prováděna samotná frakcionace do 16 frakcí (viz. protokol 2.12.1). Spolu s frakcemi byl proměřen i vzorek po jeho aplikaci na mikrokolonku (FT) a konečný proplach po frakcionaci zásaditou mobilní fází s nejvyšší eluční silou (FW).

Obrázek 18 znázorňuje rozložení frakcí proměřením na LC-UV. Při manuální bazické mikrogradientové eluci je peptidická směs vzorku poměrně rovnoměrně rozfrakcionována do 17 frakcí. V prvních frakcích není téměř žádný signál, frakcionace proběhla dle očekávání a předchozích zkušeností na pracovišti KMPB FVZ UO. Následovalo proměření frakcí na hmotnostním spektrometru.

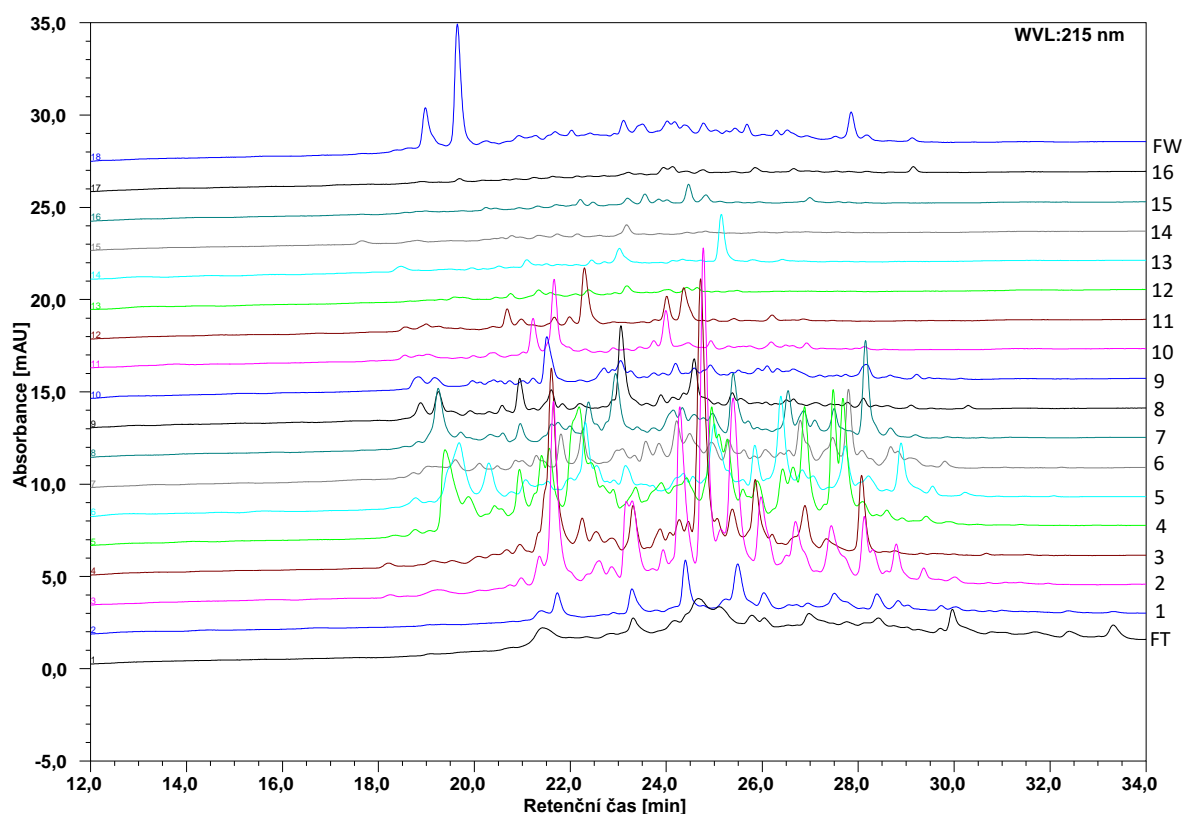


Obrázek 18: Bazická mikrogradientová eluce na vzorcích TMT značené plazmy. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.

3.5.3 HILIC

Frakcionace vzorku plazmy pomocí hydrofilní chromatografie. Jako stacionární fáze byla použita Kinetex HILIC a při frakcionaci bylo sbíráno 16 frakcí (viz. protokol 2.12.2). Spolu s frakcemi byl proměřen i vzorek po jeho aplikaci na mikrokolonku (FT) a konečný proplach po frakcionaci fází s nejvyšší eluční silou (FW).

Obrázek 19 zobrazuje výsledky z LC-UV frakcionací získaných pomocí HILIC. Můžeme pozorovat, že jistý signál vzorku byl již v prvních dvou frakcích a podobně i ve frakci poslední – ve výplachu. Nicméně dominantní signál je pozorován ve frakci číslo 2. V ostatních frakcích je signál vcelku rovnoměrný. Následovalo proměření frakcí na hmotnostním spektrometru.

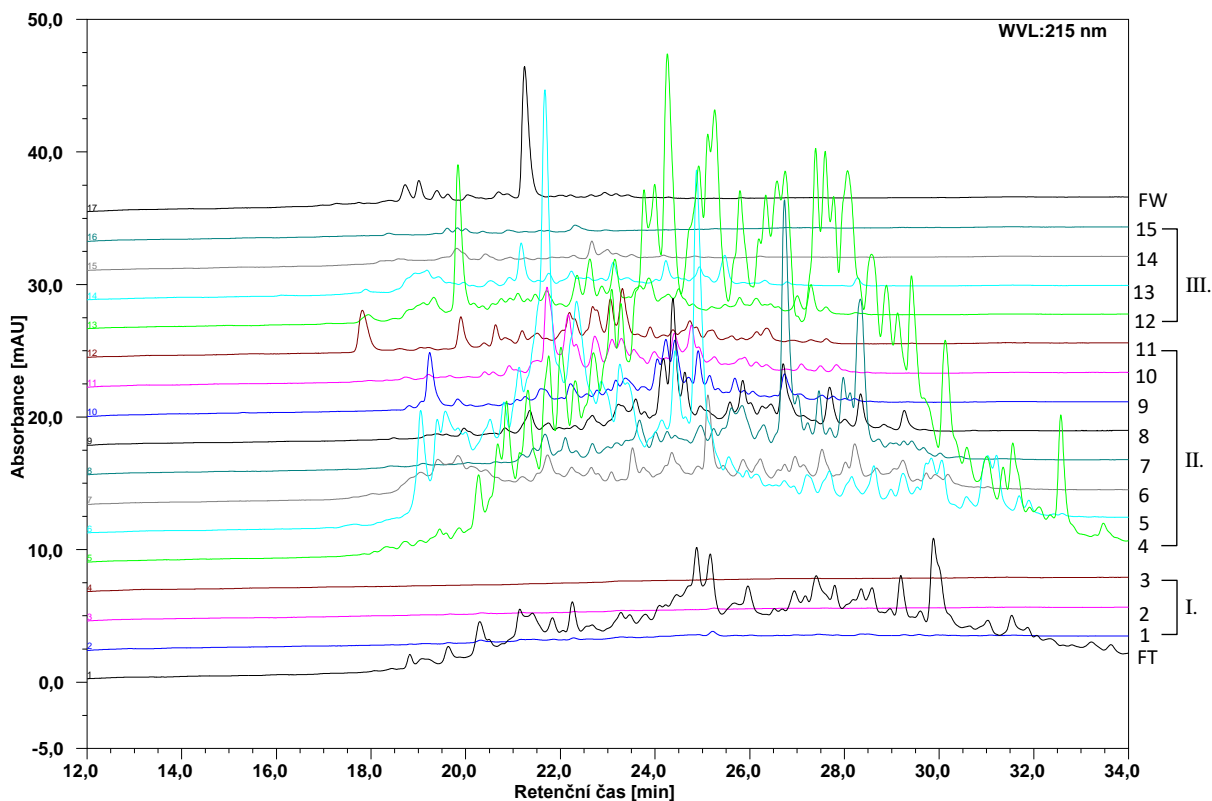


Obrázek 19: HILIC mikrogradientová eluce na vzorcích TMT značené plazmy. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.

3.5.4 SCX mikrogradientová eluce

Pro SCX frakcionaci na vzorcích plazmy byl použit optimalizovaný protokol (2.12.3). Pro frakcionaci vzorku plazmy iontově výměnnou chromatografií byla použita stacionární fáze Polysulfoethyl A. Eluce vytvořeným gradientem byla sbírána do 15 frakcí. Vzorek zde byl na SCX kolonku nanášen v 50% ACN/0,1% TFA a podobně byla u mobilní fáze A zvýšena koncentrace ACN na 50%. Spolu s frakcemi byly opět proměřeny vzorky FT a FW.

Obrázek 20 zobrazuje rozložení frakcí při manuální SCX frakcionaci. Peptidická směs je rozdělena do 15 frakcí, přičemž lze pozorovat intenzivní signál již ve FT. Následující tři frakce jsou téměř bez signálu, frakce číslo 4 pak zase poskytuje intenzivní signál. Odezva dalších frakcí je už menší a rozprostřena vcelku rovnoměrně.



Obrázek 20: SCX trojitá mikrogradientová eluce na vzorkách TMT značené plazmy. Koncentrační gradient 0-113 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1% TFA/50% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1 až 3 - 1. gradient (0-33 mM HCOONH₄). Frakce 4 až 11 - 2. gradient (33-53 mM HCOONH₄). Frakce 12 až 15 - 3. gradient (53-113 mM HCOONH₄). FW – promytí mobilní fáze B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.

Podářilo se úspěšně využít optimalizovaný protokol (2.12.3) k frakcionaci reálného vzorku (technikou SCX), kterým je lidská plazma. Zároveň na tyto vzorky byly aplikovány techniky manuální frakcionace na reverzní fázi v bazickém pH a HILIC. Konkrétní výsledky shrnující úspěšnost frakcionace v kombinaci s nanoLC-MS/MS jsou uvedeny v následující kapitole.

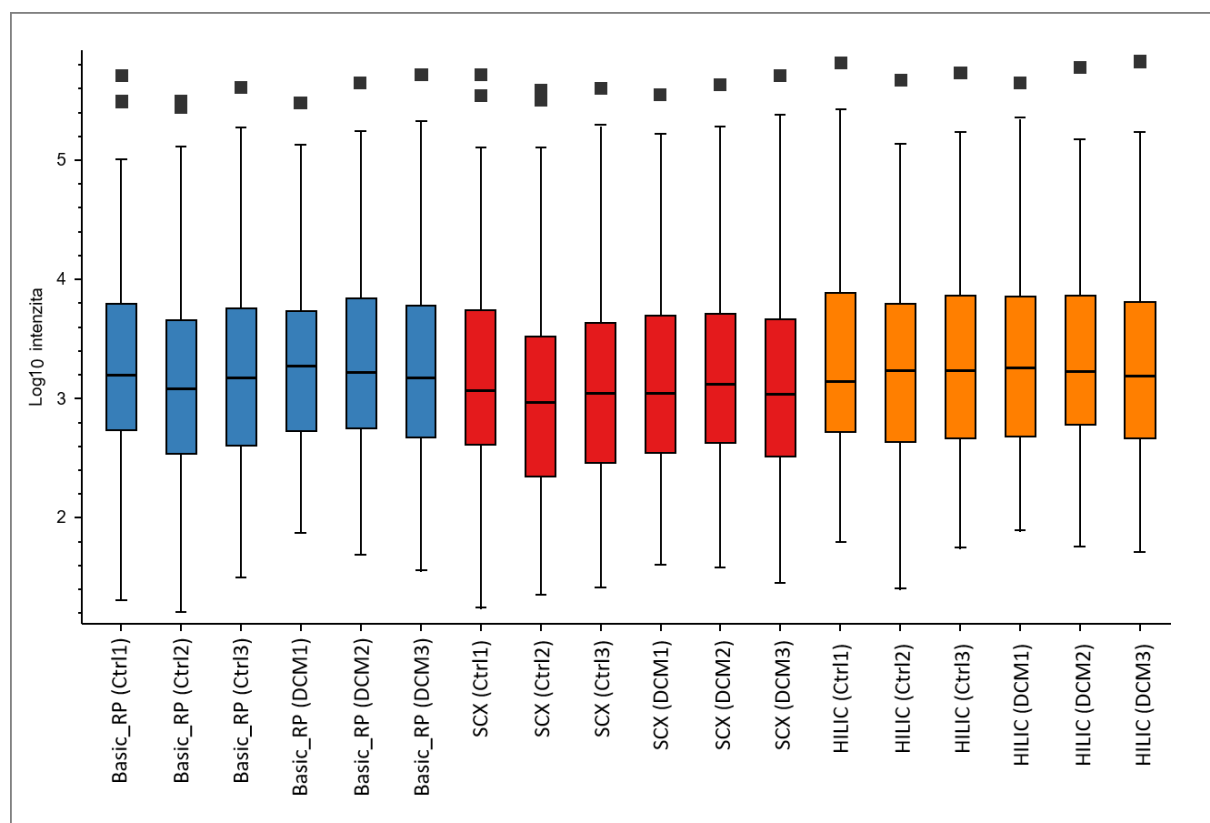
3.6 Vyhodnocení MS

Posledním krokem této experimentální práce byla hmotnostně-spektrometrická analýza připravených frakcí peptidických vzorků. Logickým předpokladem bylo, že díky použití frakcionačních technik bude následně identifikováno větší množství proteinů ve vzorcích v porovnání se vzorkem, který frakcionaci nebyl podroben. Byla zjišťována účinnost frakcionačních

technik, zejména SCX frakcionace, která byla v této práci zavedena a optimalizována. Dále byly porovnávány vzorky zdravých jedinců se vzorky pacientů s DCM z hlediska plazmatického proteinového profilu. K tomu byly využity databázové softwary Proteome Discoverer.

3.6.1 Ověření účinnosti

Obrázek 21 zobrazuje distribuci intenzity izobarických značek v MS/MS nezávisle na frakcionaci. Je patrné, že hodnoty \log_{10} mediánu intenzit se po normalizaci dat mezi sebou příliš neliší, přestože drobné odchylky mezi značkami patrné jsou. Nicméně je možné tato data použít k dalšímu zpracování, čemuž nahrává i fakt, že se jedná o modelový systém, který sloužil především k ověření metodiky a zavedení separačních technik. Bylo by vhodné pro hodnocení biologické relevance a změn v koncentraci klinicky významných proteinů zopakovat analýzu s větším počtem pacientů tak, aby byl více eliminován vliv biologické variability jedinců.



Obrázek 21: Intenzita TMT reportérových značek

3.6.2 Identifikace proteinů

Hmotnostně-spektrometrickou analýzou byly proměřeny všechny připravené vzorky které sloužily jako modelová směs pro zavedení metod pro případnou další analýzu specifických biomarkerů pro dilatační kardiomyopatii. Na základě předešlých analýz popsanych a optimalizovaných v předešlých kapitolách (2.12) byly do analýzy zahrnuty tyto metody manuální

frakcionace vzorku plazmy. Jednalo se o frakce připravené manuální frakcionací peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí (Basic_RP), manuální frakcionací peptidů pomocí HILIC a manuální frakcionací peptidů pomocí SCX. Takto připravené frakce byly následně podrobeny nanoLC-MS/MS analýze pomocí UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC. Vyhodnocením naměřených dat pomocí Proteome Discoverer (v.2.4) bylo identifikováno 310 proteinů a 3587 peptidových skupin. Zaměřili jsme se na porovnání jednotlivých přístupů frakcionace a porovnali je mezi sebou.

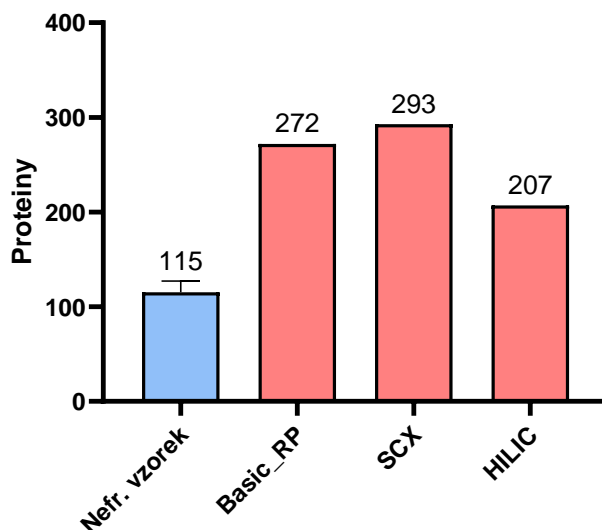
Tabulka 12 a Obrázek 22 uvádí množství identifikovaných proteinů jednotlivými způsoby frakcionace včetně těchto údajů u vzorku nefrakcionovaného. Je zřejmé, že při analýze vzorků za použití technik frakcionace bylo identifikováno výrazně více proteinů nežli v případě analýzy bez použití frakcionace. Zavedenou technikou SCX frakcionace bylo identifikováno celkem 293 proteinů, což je o 155 % více v porovnání s počtem identifikovaných proteinů bez použití frakcionace. Technikou Basic_RP, resp. HILIC bylo identifikováno 272, resp. 207 proteinů, což je o 137 %, resp. o 80 % více proteinů v porovnání s analýzou vzorku nefrakcionovaného.

Tabulka 12: Počet zidentifikovaných proteinových a peptidových skupin. (Suma neobsahuje nefrakcionovaný vzorek!)

	Proteinové skupiny	Navíc k nefr. vzorkům [%]	Peptidové skupiny	Navíc k nefr. vzorkům [%]
Nefrakcionovaný vzorek	115	-	1124	-
Basic_RP	272	137	2410	114
SCX	293	155	2707	141
HILIC	207	80	1164	4

Tabulka 12 dále ukazuje, že při analýze vzorků za použití technik frakcionace SCX a Basic_RP bylo identifikováno významně více peptidových skupin nežli v případě analýzy bez použití frakcionace. Technikou HILIC bylo identifikováno téměř shodné množství peptidových skupin jako u vzorku bez frakcionace. Optimalizovanou technikou SCX frakcionace, resp. Basic_RP bylo identifikováno celkem 2707, resp. 2410 peptidových skupin, což je o 141 %, resp. o 114 % více v porovnání s počtem identifikovaných peptidových skupin bez použití frakcionace. Technikou HILIC bylo identifikováno 1164 peptidových skupin, což je jen o 4 % více v porovnání s analýzou vzorku nefrakcionovaného.

Lze konstatovat, že použití uvedených technik frakcionace má významný vliv na celkový počet identifikovaných proteinů, resp. peptidových skupin, z čehož největší účinnost identifikace vykazuje technika SCX frakcionace. Tento fakt navíc potvrzují (Obrázek 23 a Obrázek 24).



Obrázek 22: Počet zidentifikovaných proteinů u nefrakcionovaného vzorku a vzorků frakcionovaných.

Pro snadnou orientaci v získaných datech byly v softwaru Proteome Discoverer vytvořeny Vennovy diagramy, jak pro identifikované proteiny (Obrázek 23), tak i pro peptidové skupiny (Obrázek 24).

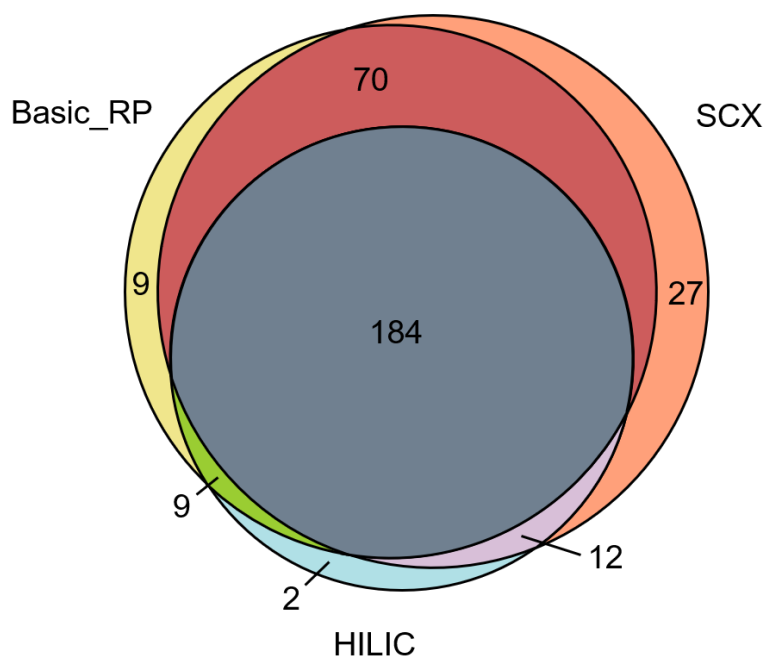
Celkově bylo pro všechny techniky analýzy nalezeno 313 proteinů (Obrázek 23). Je zřejmé, že všemi třemi technikami frakcionace bylo současně identifikováno 184 proteinů (šedá oblast). Dále je patrné, že zavedenou technikou SCX frakcionace bylo identifikováno 293 proteinů, tj. 94 % z celkového počtu nalezených proteinů. Je evidentní, že s použitím techniky SCX frakcionace je dosaženo velmi vysoké účinnosti identifikace proteinů.

Optimalizovanou technikou SCX bylo identifikováno 27 unikátních proteinů. V porovnání s technikou Basic_RP jde o nalezení trojnásobného množství jedinečných proteinů. Ve srovnání s technikou HILIC se jedná o nalezení téměř čtrnáctinásobku počtu identifikovaných unikátních proteinů. Lze konstatovat, že zavedená technika SCX frakcionace dosahuje nejvyšší účinnosti z hlediska počtu celkově identifikovaných unikátních proteinů.

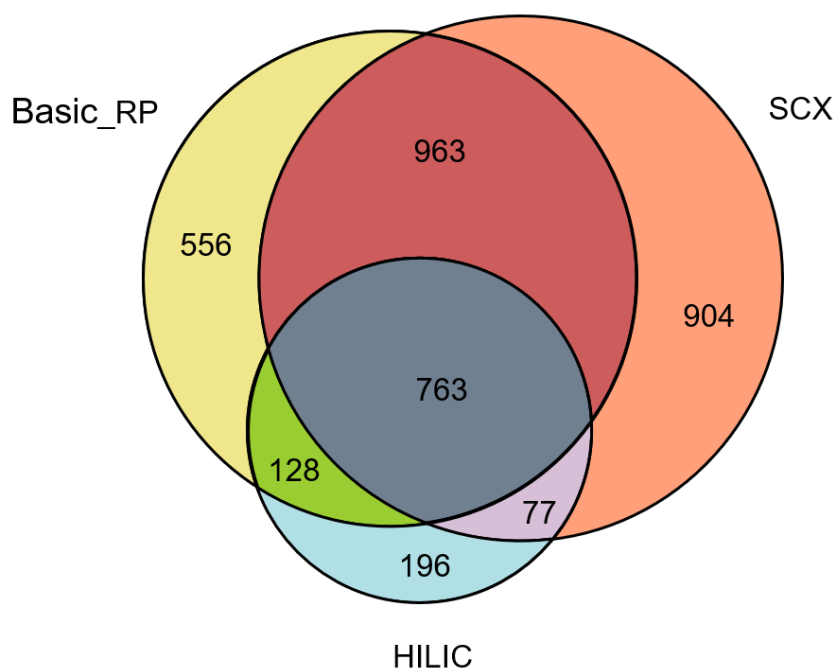
Celkově bylo nalezeno 3587 peptidových skupin (Tabulka 12, Obrázek 24). Je zřejmé, že technikou SCX frakcionace bylo identifikováno 2707 peptidových skupin, tj. 75 % z celkového počtu nalezených peptidových skupin. Zároveň stejnou technikou bylo identifikováno 904 unikátních peptidových skupin, tj. 25 % z celkového počtu identifikovaných peptidových skupin. Je patrné, že obdobně jako u proteinů použití techniky SCX frakcionace vede k identifikaci

nejvyššího počtu peptidových skupin a dosahuje nejvyšší účinnosti z hlediska počtu celkově identifikovaných unikátních peptidových skupin.

Přestože z hlediska provedení je SCX frakcionace nejsložitější technika ze tří prováděných frakcionačních technik v této práci, její nepochybnou výhodou je získání největšího množství unikátních proteinů a peptidových skupin.



Obrázek 23: Vennův diagram nalezených proteinů jednotlivými technikami frakcionace.



Obrázek 24: Vennův diagram nalezených peptidových skupin jednotlivými technikami frakcionace.

3.6.3 Komparativní proteomická analýza

Dále byly sledovány rozdíly v proteinovém složení plazmy mezi kontrolními vzorky zdravých dárců a pacienty s dilatační kardiomyopatií. Tabulka 13 obsahuje výčet proteinů, které vykazují signifikantní změnu v plazmě nemocných pacientů s DCM v porovnání se zdravými jedinci. Jelikož testovaných subjektů bylo pouze 6 (3 nemocní pacienti a 3 zdraví jedinci), je na výsledky nahlíženo tak, že by se mohlo jednat o potenciální markery dilatační kardiomyopatie, které by mohly být podkladem pro další studie. U všech signifikantně změněných proteinů byla v plazmě pacientů s DCM zjištěna jejich snížená koncentrace.

Aby mohl být protein považován za signifikantní, hodnotí se výsledky LC-MS analýzy v databázových vyhledávacích programech se zadáním určitých kritérií. V našem experimentu byla kritéria zvolená v programu Proteome Discoverer následující:

- Protein musí být identifikován minimálně dvěma unikátními peptidy
- Nesmí se jednat o depletovaný protein
- Abundance ratio (udávající míru změny při porovnání vzorku pacienta ku zdravému jedinci); pokud je < 1 – jedná se o snížení koncentrace proteinu u vzorku nemocného a naopak
- P-hodnota (úroveň spolehlivosti identifikace proteinu) $< 0,01$

Tabulka 13: Signifikantně změněné proteiny zjištěné v softwaru Proteome Discoverer.

Protein	Kód proteinu	Počet unikátních peptidů	Poměr zastoupení DCM/zdravý	P-hodnota
Fibronectin	P02751-1	68	0,513	$6,3e^{-7}$
Inter- α -trypsin inhibitor	P19823	31	0,619	$7,6e^{-4}$
Plasminogen	P00747	43	0,694	$1,2e^{-3}$
Gelsolin	P06396	36	0,565	$2,6e^{-6}$
β -2-glykoprotein	P02749	13	0,345	$5,1e^{-4}$

V následující části bude nastíněna možná důležitost zjištěných signifikantně změněných proteinů (viz Tabulka 13) v rámci proteomické analýzy srdečních chorob. Mezi nejzajímavější nálezy tohoto experimentu patří fibronectin a gelsolin.

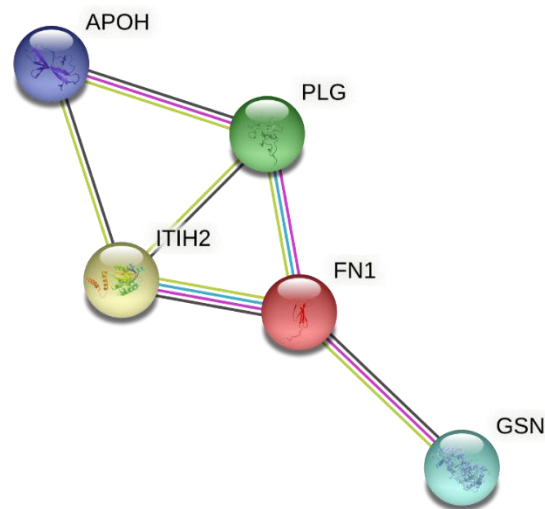
Fibronectin je již několika studií potvrzeným potencionálním indikátorem remodelace tkáně myokardu související s hypertrofickou kardiomyopatií. V předchozí studii [106] byla

plazmatická hladina tohoto proteinu u pacientů se srdeční nemocí snižena ve srovnání se zdravými subjekty. Studie [107] byla věnována vlivu inhibice polymerace fibronektinu na remodelaci myokardu, kdy byl zjištěn jeho potenciál pro terapeutickou strategii léčby srdeční fibrózy a srdečního selhání.

Gelsolin je také studován ve spojitosti s remodelací srdeční tkáně. V pracích [108,109] byla zmíněna funkce gelsolinu při cytoskeletální remodelaci při srdečním selhání u myši a jeho možnou funkci v terapii srdečního selhání. Ve studii [110] byla nalezena snížená hladina gelsolinu v séru žen s onemocněním srdce.

Další zjištěné proteiny s významnou změnou při porovnání plazmatických vzorků pacientů s DCM a zdravých jedinců jsou plasminogen, β -2-glykoprotein a inter- α -trypsin inhibitor. U těchto proteinů však nebyla v literatuře nalezena žádná významná korelace se srdečními chorobami. Pro potvrzení nebo vyvrácení markerů, které nejsou běžně asociovány se srdečními chorobami bude nutné provést další komparativní analýzu s více subjekty.

Zajímavým zjištěním byl také fakt, že všechny zmíněné signifikantně změněné proteiny byly pomocí STRING databáze (v.11.0) vyhodnoceny v jednom shluku (Obrázek 25), to znamená, že spolu vzájemně mohou interagovat, či se jinak ovlivňovat. Přičemž fibronektin a gelsolin jsou dokonce součástí jednoho komplexu.



Obrázek 25: Zjištěná souvislost mezi signifikantně změněnými proteiny. APOH – β -2-glykoprotein, PLG – plasminogen, ITIH2 - inter- α -trypsin inhibitor, FN1 – fibronektin, GSN – gelsolin. Vytvořeno na www.string-db.org.

Všechny již dosažené výsledky v této práci naznačují, že zvolený přístup k analýze, včetně několika dílčích optimalizací byl úspěšný a že jej bude možné využít v následné komparativní analýze pro identifikaci proteinů, které jsou ve vztahu ke studovanému onemocnění pacientů.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zavést do přípravy plazmatických vzorků pro proteomickou analýzu takové techniky, které by umožnily vyšší záchyt a identifikaci peptidů metodou LC-MS. K tomu byly zvoleny tři typy frakcionačních technik prováděné v manuálním uspořádání a následně byly takto získané frakce analyzovány pomocí nanoLC-MS/MS. Frakcionace peptidů byla nejdříve provedena na reverzní fázi v bazickém prostředí a technikou HILIC, jejíž funkčnost byla již v minulosti na pracovišti KMPB FVZ UO ověřena. Třetí frakcionační technikou byla SCX, která před aplikací na plazmatické vzorky vyžadovala značnou optimalizaci.

Optimalizace byla prováděna sérií experimentů, které probíhaly s pomocí specifické aparatury pro tvorbu koncentračního gradientu. Bylo třeba zvolit vhodné podmínky pro nanášení vzorku a tvorbu mikrogradientu ve speciální aparatuře s využitím mikrostríkačky. Gradient byl tvořen dvěma způsoby – jednoduchou a trojitou mikrogradientovou elucí. Po několika modifikacích byl zvolen vhodný protokol, který byl poté použit na práci s plazmatickými vzorky. Pro experimenty optimalizace SCX techniky byly použity již připravené vzorky Jurkat buněk.

Součástí práce byla také komparativní proteomická analýza vzorků lidské plazmy pro studium a diagnostiku dilatační kardiomyopatie s využitím chemického značení izobarickými značkami. Tato práce byla součástí grantového projektu č. NV19-02-00297. K tomuto účelu bylo použito celkem šest vzorků plazmy (tři vzorky od pacientů s dilatační kardiomyopatií a tři vzorky od zdravých jedinců). Příprava těchto vzorků pro samotnou analýzu zahrnovala depleci abundantních proteinů, přípravu proteinových vzorků před štěpením a samotné enzymatické štěpení trypsinem. Naštěpené vzorky byly posléze naznačeny izobarickými TMT značkami.

Takto připravené vzorky byly podrobeny frakcionaci třemi výše zmíněnými technikami. Získané frakce spolu se vzorkem nefrakcionovaným byly proměřeny na LC-UV, následně analyzovány pomocí nanoLC-MS/MS. Získaná data byla hodnocena v databázovém softwaru Proteome Discoverer.

Jak bylo předpokládáno, frakcionační techniky umožnily identifikaci výrazně většího množství proteinů při porovnání s nefrakcionovaným vzorkem. Byla porovnána účinnost těchto frakcionačních technik, z nichž nejvyšší úspěšnosti frakcionace dosahuje zavedená technika SCX. Tento typ frakcionace poskytuje v kombinaci s následnou nanoLC-MS/MS analýzou největší množství identifikovaných unikátních proteinů.

Na závěr byly porovnávány vzorky pacientů s DCM a vzorky zdravých jedinců. Bylo nalezeno pět signifikantně změněných proteinů, které zároveň vykazují jistou míru vzájemné interakce. V tomto experimentu bylo pouze šest testovaných subjektů, a proto je třeba tyto výsledky dále potvrdit v dalších návazných studiích.

Touto prací byly splněny všechny zadané cíle, podařilo se zavést a použít účinné frakcionační techniky a aplikovat je na reálné vzorky plazmy. Výsledky experimentální práce rovněž poskytly zajímavé podněty pro budoucí studie v oblasti hledání nových biomarkerů srdeční kardiomyopatie.

5 LITERATURA

- [1] Graves, P. R., Haystead, T. A. J., Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *MMBR* 2002, 66, 39–63.
- [2] Moradian, A., Kalli, A., Sweredoski, M. J., Hess, S., The top-down, middle-down, and bottom-up mass spectrometry approaches for characterization of histone variants and their post-translational modifications. *Proteomics* 2014, 14, 489–497.
- [3] Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C., Yates, J. R., Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* 2013, 113, 2343–2394.
- [4] Gillet, L. C., Leitner, A., Aebersold, R., Mass Spectrometry Applied to Bottom-Up Proteomics: Entering the High-Throughput Era for Hypothesis Testing. *Annual Rev. Anal. Chem.* 2016, 9, 449–472.
- [5] McDonald, W. H., Yates, J. R., Shotgun Proteomics and Biomarker Discovery. *Disease Markers* 2002, 18, 99–105.
- [6] Savaryn, J. P., Catherman, A. D., Thomas, P. M., Abecassis, M. M., Kelleher, N. L., The emergence of top-down proteomics in clinical research. *Genome Med* 2013, 5, 53.
- [7] Armirotti, A., Damonte, G., Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics* 2010, 10, 3566–3576.
- [8] Lermyte, F., Tsybin, Y. O., O'Connor, P. B., Loo, J. A., Top or Middle? Up or Down? Toward a Standard Lexicon for Protein Top-Down and Allied Mass Spectrometry Approaches. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2019, 30, 1149–1157.
- [9] Wiśniewski, J. R., *Methods in Enzymology*. Elsevier 2017, pp. 15–27.
- [10] Geyer, P. E., Kulak, N. A., Pichler, G., Holdt, L. M., Teupser, D., Mann, M., Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Systems* 2016, 2, 185–195.
- [11] Abundant Protein Depletion for Mass Spectrometry - CZ, [//www.thermo-fisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-mass-spectrometry-analysis/sample-prep-mass-spectrometry/abundant-protein-depletion-mass-spectrometry.html](http://www.thermo-fisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-mass-spectrometry-analysis/sample-prep-mass-spectrometry/abundant-protein-depletion-mass-spectrometry.html) (last time accessed: March 2, 2021).
- [12] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O., *Laboratorní techniky biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2005.
- [13] Hale, J. E., Butler, J. P., Gelfanova, V., You, J.-S., Knierman, M. D., A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and mass spectral analysis. *Analytical Biochemistry* 2004, 333, 174–181.
- [14] Havliš, J., Štosová, T., Šebela, M., Lenobl, R., Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku. *Chemické listy* n.d., 2005, 896–905.
- [15] Klouda, P., *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [16] Neverova, I., Van Eyk, J. E., Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *Journal of Chromatography B* 2005, 815, 51–63.
- [17] Aguilar, M.-I. (Ed.), *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ 2004.
- [18] Rapley, R., Walker, J. M. (Eds.), *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ 2008.
- [19] McCalley, D. V., The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 858–880.
- [20] Cation Exchange Chromatography | LSR | Bio-Rad, <https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/cation-exchange-chromatography?ID=MWHB018UU> (last time accessed: March 12, 2021).

- [21] McMaster, M. C., HPLC, a Practical User's Guide. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J. 2007.
- [22] Ahamed, T., Nfor, B. K., Verhaert, P. D. E. M., van Dedem, G. W. K., van der Wielen, L. A. M., Eppink, M. H. M., van de Sandt, E. J. A. X., Ottens, M., pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations. *Journal of Chromatography A* 2007, 1164, 181–188.
- [23] Manadas, B., English, J. A., Wynne, K. J., Cotter, D. R., Dunn, M. J., Comparative analysis of OFFGel, strong cation exchange with pH gradient, and RP at high pH for first-dimensional separation of peptides from a membrane-enriched protein fraction. *Proteomics* 2009, 9, 5194–5198.
- [24] Essader, A. S., Cargile, B. J., Bundy, J. L., Stephenson, J. L., A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. *Proteomics* 2005, 5, 24–34.
- [25] Delahunty, C. M., Yates, J. R., MudPIT: multidimensional protein identification technology. *Biotechniques* 2007, 43, 563, 565, 567 passim.
- [26] Jandera, P., Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1421–1437.
- [27] Boersema, P. J., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2008, 391, 151–159.
- [28] Yoshida, T., Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2004, 60, 265–280.
- [29] Hoffmann, E. de, Stroobant, V., Mass Spectrometry: Principles and Applications. J. Wiley, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ 2007.
- [30] Cole, R. B. (Ed.), Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications. Wiley, Hoboken, N.J 2010.
- [31] Aebersold, R., Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 422, 198–207.
- [32] Kebarle, P., Tang, L., From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1993, 65, 972A-986A.
- [33] Wilm, M., Mann, M., Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1–8.
- [34] Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., Chait, B. T., Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem.* 1991, 63, 1193A-1203A.
- [35] Knochenmuss, R., Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* 2006, 131, 966.
- [36] Dass, C., Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J 2007.
- [37] Barner-Kowollik, C. (Ed.), Mass Spectrometry in Polymer Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim 2012.
- [38] Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., Thomson, B. A., An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2001, 36, 849–865.
- [39] Radionova, A., Filippov, I., Derrick, P. J., In pursuit of resolution in time-of-flight mass spectrometry: A historical perspective: IN PURSUIT OF RESOLUTION IN TOF MASS SPECTROMETRY. *Mass Spec Rev* 2016, 35, 738–757.
- [40] Cotter, R. J., Iltchenko, S., Wang, D., Gundry, R., Tandem Time-of-Flight (TOF/TOF) Mass Spectrometry and Proteomics. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 2005, 53, 7–17.
- [41] Makarov, A., Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1156–1162.

- [42] Yates, J. R., Cociorva, D., Liao, L., Zabrouskov, V., Performance of a Linear Ion Trap-Orbitrap Hybrid for Peptide Analysis. *Anal. Chem.* 2006, 78, 493–500.
- [43] Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., Performance evaluation of a high-field orbitrap mass analyzer. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009, 20, 1391–1396.
- [44] Savaryn, J. P., Toby, T. K., Kelleher, N. L., A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics* 2016, 16, 2435–2443.
- [45] Glish, G. L., Burinsky, D. J., Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008, 19, 161–172.
- [46] Q Exactive™ BioPharma Platform, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/0726055> (last time accessed: April 14, 2021).
- [47] Q Exactive řada Orbitrap | Pragolab, <https://www.pragolab.cz/chromatografie-a-ms/hplc-ms/orbitrapy/q-exactive-rada-orbitrap> (last time accessed: April 14, 2021).
- [48] Koppenaal, D. W., Barinaga, C. J., Denton, M. B., Sperline, R. P., Hieftje, G. M., Schilling, G. D., Andrade, F. J., Barnes, J. H., Iv, I., MS Detectors. *Anal. Chem.* 2005, 77, 418 A-427 A.
- [49] Gross, J. H., Mass Spectrometry: A Textbook. 2004.
- [50] Batey, J. H., The physics and technology of quadrupole mass spectrometers. *Vacuum* 2014, 101, 410–415.
- [51] Proteome Discoverer Software - CZ, [//www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-software/multi-omics-data-analysis/proteome-discoverer-software.html](https://www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-software/multi-omics-data-analysis/proteome-discoverer-software.html) (last time accessed: March 2, 2021).
- [52] MaxQuant, <https://www.maxquant.org/> (last time accessed: April 16, 2021).
- [53] Tyanova, S., Temu, T., Cox, J., The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 2016, 11, 2301–2319.
- [54] Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E., Warscheid, B., Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 2007, 7, 340–350.
- [55] Chen, X., Wei, S., Ji, Y., Guo, X., Yang, F., Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics* 2015, 15, 3175–3192.
- [56] Sheldrick, W. S. (Ed.), Organic Chemistry. Springer, Berlin 1978.
- [57] Ünlü, M., Morgan, M. E., Minden, J. S., Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997, 18, 2071–2077.
- [58] Řehulka, P., Řehulková, H., Chmelik, J., Acquisition of proteomic data using mass spectrometry and their bioinformatics interpretation. *Chemické Listy* 2007, 101, 279–286.
- [59] Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M., Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 376–386.
- [60] Elliott, M. H., Smith, D. S., Parker, C. E., Borchers, C., Current trends in quantitative proteomics. *J. Mass Spectrom.* 2009, n/a-n/a.
- [61] Schmidt, C., Gronborg, M., Deckert, J., Bessonov, S., Conrad, T., Luhrmann, R., Urlaub, H., Mass spectrometry-based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic labeling (SILAC), chemical labeling (iTRAQ), and label-free spectral count. *RNA* 2014, 20, 406–420.
- [62] Lindemann, C., Thomanek, N., Hundt, F., Lerari, T., Meyer, H. E., Wolters, D., Marcus, K., Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. *Biological Chemistry* 2017, 398, DOI: 10.1515/hsz-2017-0104.
- [63] Miyagi, M., Rao, K. C. S., Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2007, 26, 121–136.

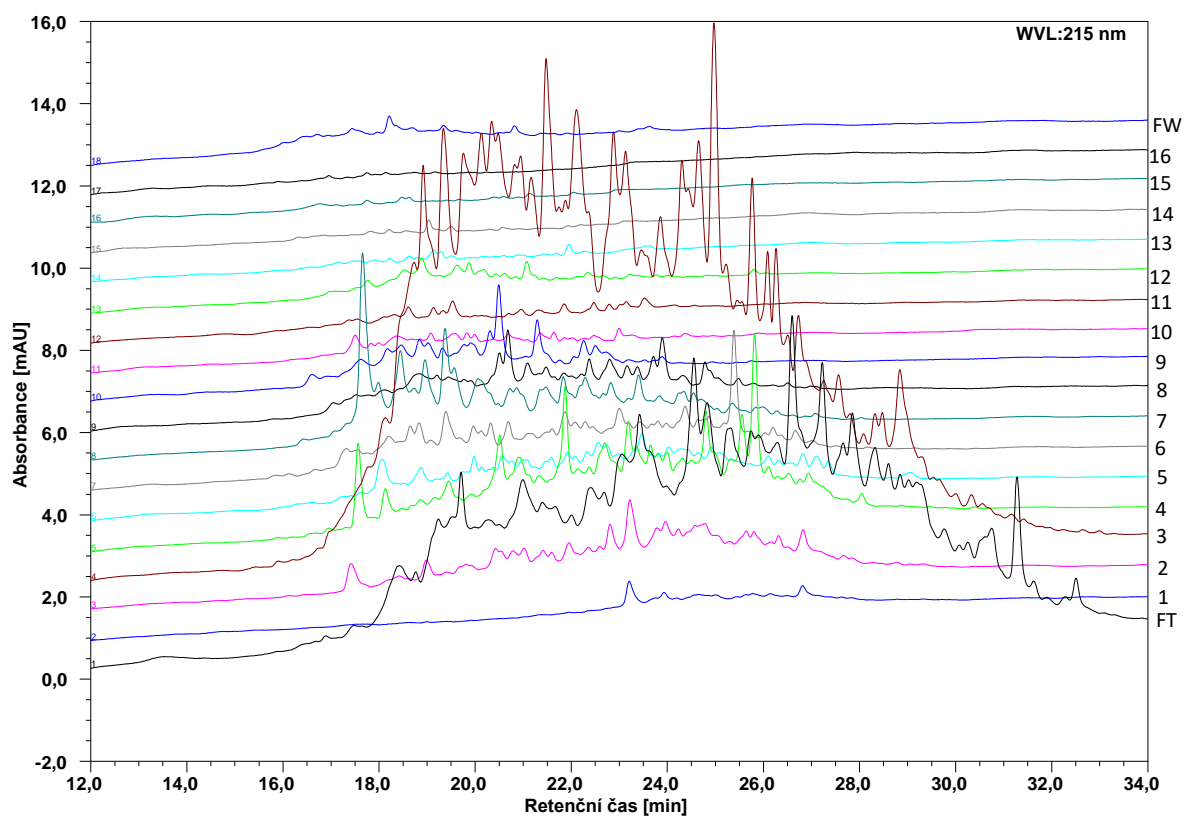
- [64] Ye, X., Luke, B., Andresson, T., Blonder, J., 18O Stable Isotope Labeling in MS-based Proteomics. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 2009, 8, 136–144.
- [65] Wright, P. C., Noirel, J., Ow, S.-Y., Fazeli, A., A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology* 2012, 77, 738-765.e52.
- [66] Ramus, C., de Peredo, A. G., Dahout, C., Gallagher, M., Garin, J., An Optimized Strategy for ICAT Quantification of Membrane Proteins. *Mol Cell Proteomics* 2006, 5, 68–78.
- [67] Larda, S. T., Bokoch, M. P., Evanics, F., Prosser, R. S., Lysine methylation strategies for characterizing protein conformations by NMR. *J Biomol NMR* 2012, 54, 199–209.
- [68] Koehler, C. J., Strozynski, M., Kozielski, F., Treumann, A., Thiede, B., Isobaric Peptide Termini Labeling for MS/MS-Based Quantitative Proteomics. *J. Proteome Res.* 2009, 8, 4333–4341.
- [69] Ferret-Bernard, S., Castro-Borges, W., Dowle, A. A., Sanin, D. E., Cook, P. C., Turner, J. D., MacDonald, A. S., Thomas, J. R., Mountford, A. P., Plasma membrane proteomes of differentially matured dendritic cells identified by LC–MS/MS combined with iTRAQ labelling. *Journal of Proteomics* 2012, 75, 938–948.
- [70] Moulder, R., Bhosale, S. D., Goodlett, D. R., Lahesmaa, R., Analysis of the plasma proteome using iTRAQ and TMT-based Isobaric labeling. *Mass Spec Rev* 2018, 37, 583–606.
- [71] Murphy, J. P., Everley, R. A., Coloff, J. L., Gygi, S. P., Combining Amine Metabolomics and Quantitative Proteomics of Cancer Cells Using Derivatization with Isobaric Tags. *Anal. Chem.* 2014, 86, 3585–3593.
- [72] Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Hamon, C., Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* 2003, 75, 1895–1904.
- [73] TMTsixplex™ Isobaric Mass Tagging Kit, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/90064> (last time accessed: April 14, 2021).
- [74] Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., van Sluyter, S. C., Haynes, P. A., Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 2011, 11, 535–553.
- [75] Hubbard, S. J., Jones, A. R. (Eds.), *Proteome Bioinformatics*. Humana, New York, NY 2010.
- [76] Megger, D. A., Pott, L. L., Ahrens, M., Padden, J., Bracht, T., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Meyer, H. E., Sitek, B., Comparison of label-free and label-based strategies for proteome analysis of hepatoma cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2014, 1844, 967–976.
- [77] Galaxy Training: Label-free versus Labelled - How to Choose Your Quantitat..., <https://shiltemann.github.io/training-material/topics/proteomics/tutorials/labelfree-vs-labelled/tutorial.html> (last time accessed: March 2, 2021).
- [78] Cosme, J., Emili, A., Gramolini, A. O., in: Vivanco, F. (Ed.), *Heart Proteomics*. Humana Press, Totowa, NJ 2013, pp. 1–10.
- [79] Haas, B., Serchi, T., Wagner, D. R., Gilson, G., Planchon, S., Renaut, J., Hoffmann, L., Bohn, T., Devaux, Y., Proteomic analysis of plasma samples from patients with acute myocardial infarction identifies haptoglobin as a potential prognostic biomarker. *Journal of Proteomics* 2011, 75, 229–236.
- [80] Xu, C., Su, X., Chen, Y., Xu, Y., Wang, Z., Mo, X., Proteomics analysis of plasma protein changes in patent ductus arteriosus patients. *Ital J Pediatr* 2020, 46, 64.

- [81] Li, W., Rong, R., Zhao, S., Zhu, X., Zhang, K., Xiong, X., Yu, X., Cui, Q., Li, S., Chen, L., Cai, J., Du, J., Proteomic analysis of metabolic, cytoskeletal and stress response proteins in human heart failure. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2012, 16, 59–71.
- [82] Sharma, P., Cosme, J., Gramolini, A. O., Recent advances in cardiovascular proteomics. *Journal of Proteomics* 2013, 81, 3–14.
- [83] Beck, H. C., Overgaard, M., Melholt Rasmussen, L., Plasma proteomics to identify biomarkers – application to cardiovascular diseases. *Translational Proteomics* 2015, 7, 40–48.
- [84] Mayr, M., Madhu, B., Xu, Q., Proteomics and Metabolomics Combined in Cardiovascular Research. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2007, 17, 43–48.
- [85] Dolci, A., Panteghini, M., The exciting story of cardiac biomarkers: From retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more. *Clinica Chimica Acta* 2006, 369, 179–187.
- [86] Chow, S. L., Maisel, A. S., Anand, I., Bozkurt, B., de Boer, R. A., Felker, G. M., Fonarow, G. C., Greenberg, B., Januzzi, J. L., Kiernan, M. S., Liu, P. P., Wang, T. J., Yancy, C. W., Zile, M. R., Role of Biomarkers for the Prevention, Assessment, and Management of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2017, 135, DOI: 10.1161/CIR.0000000000000490.
- [87] Mann, D. L., Zipes, D. P., Libby, P., Bonow, R. O., Braunwald, E. (Eds.), Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Elsevier/Saunders, Philadelphia, PA 2015.
- [88] Jefferies, J. L., Towbin, J. A., Dilated cardiomyopathy. *The Lancet* 2010, 375, 752–762.
- [89] Maron, B. J., Maron, M. S., Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet* 2013, 381, 242–255.
- [90] Muchtar, E., Blauwet, L. A., Gertz, M. A., Restrictive Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res* 2017, 121, 819–837.
- [91] Towbin, J. A., McKenna, W. J., Abrams, D. J., Ackerman, M. J., Calkins, H., Darrieux, F. C. C., Daubert, J. P., de Chillou, C., DePasquale, E. C., Desai, M. Y., Estes, N. A. M., Hua, W., Indik, J. H., Ingles, J., James, C. A., John, R. M., Judge, D. P., Keegan, R., Krahn, A. D., Link, M. S., Marcus, F. I., McLeod, C. J., Mestroni, L., Priori, S. G., Saffitz, J. E., Sanatani, S., Shimizu, W., van Tintelen, J. P., Wilde, A. A. M., Zareba, W., 2019 HRS expert consensus statement on evaluation, risk stratification, and management of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 2019, 16, e301–e372.
- [92] Kupcik, R., Macak, J. M., Rehulkova, H., Sopha, H., Fabrik, I., Anitha, V. C., Klimentova, J., Murasova, P., Bilkova, Z., Rehulka, P., Amorphous TiO₂ Nanotubes as a Platform for Highly Selective Phosphopeptide Enrichment. *ACS Omega* 2019, 4, 12156–12166.
- [93] BD™,P100,Blood,Collection,System,RUO - BD™ P100 Blood Collection System | Cell & Biomarker Preservation | Blood Collection | Applications | BD Biosciences-US, <https://www.bdbiosciences.com/us/applications/blood-collection/cell-biomarker-preservation/bdtrade-p100-blood-collection-system/p/366422> (last time accessed: March 2, 2021).
- [94] Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., Young, I. G., Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981, 290, 457–465.
- [95] cRAP protein sequences, <https://www.thegpm.org/crap/> (last time accessed: May 6, 2021).

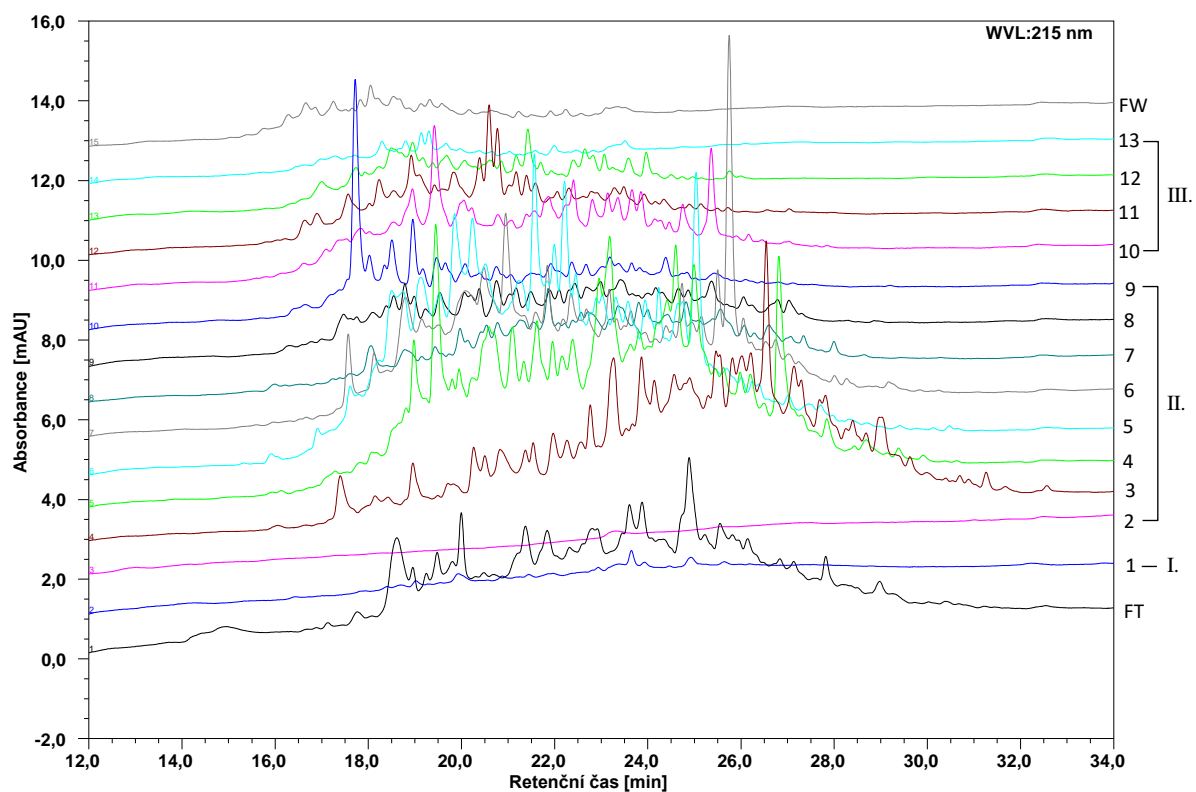
- [96] Anderson, N. L., Anderson, N. G., The Human Plasma Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002, 1, 845–867.
- [97] Dvořáková, P., Hernychová, L., Vojtěšek, B., Analysis of Protein Using Mass Spectrometry. *Klin Onkol* 2014, 27, S104–S109.
- [98] Burkhart, J. M., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A., Zahedi, R. P., Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of Proteomics* 2012, 75, 1454–1462.
- [99] Swaney, D. L., Wenger, C. D., Coon, J. J., Value of Using Multiple Proteases for Large-Scale Mass Spectrometry-Based Proteomics. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 1323–1329.
- [100] Vaudel, M., Sickmann, A., Martens, L., Peptide and protein quantification: A map of the minefield. *Proteomics* 2010, 10, 650–670.
- [101] TMTsixplexTM Isobaric Label Reagent Set, 1 x 0.8 mg, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/90061> (last time accessed: April 25, 2021).
- [102] Dolan, J. W., Snyder, L. R., in: Meyers, R. A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK 2018, pp. 1–19.
- [103] Nováková, L., Douša, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Lucie Nováková; Michal Douša, Praha [i.e. Hradec Králové]; [Klatovy 2013].
- [104] Rehulka, P., Zahradnikova, M., Rehulkova, H., Dvorakova, P., Nenutil, R., Valik, D., Vojtesek, B., Hernychova, L., Novotny, M. V., Microgradient separation technique for purification and fractionation of permethylated N-glycans before mass spectrometric analyses. *J. Sep. Sci.* 2018, 41, 1973–1982.
- [105] Strategies for removal of non-reacted TMT tag, Strategies for removal of non-reacted TMT tag (last time accessed: March 2, 2021).
- [106] Fucikova, A., Lenco, J., Tambor, V., Rehulkova, H., Pudil, R., Stulik, J., Plasma concentration of fibronectin is decreased in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta* 2016, 463, 62–66.
- [107] Valiente-Alandi, I., Potter, S. J., Salvador, A. M., Schafer, A. E., Schips, T., Carrillo-Salinas, F., Gibson, A. M., Nieman, M. L., Perkins, C., Sargent, M. A., Huo, J., Lorenz, J. N., DeFalco, T., Molkenstin, J. D., Alcaide, P., Blaxall, B. C., Inhibiting Fibronectin Attenuates Fibrosis and Improves Cardiac Function in a Model of Heart Failure. *Circulation* 2018, 138, 1236–1252.
- [108] Patel, V. B., Zhabyeyev, P., Chen, X., Wang, F., Paul, M., Fan, D., McLean, B. A., Basu, R., Zhang, P., Shah, S., Dawson, J. F., Pyle, W. G., Hazra, M., Kassiri, Z., Hazra, S., Vanhaesebroeck, B., McCulloch, C. A., Oudit, G. Y., PI3K α -regulated gelsolin activity is a critical determinant of cardiac cytoskeletal remodeling and heart disease. *Nat Commun* 2018, 9, 5390.
- [109] Li, G. H., Shi, Y., Chen, Y., Sun, M., Sader, S., Maekawa, Y., Arab, S., Dawood, F., Chen, M., De Couto, G., Liu, Y., Fukuoka, M., Yang, S., Da Shi, M., Kirshenbaum, L. A., McCulloch, C. A., Liu, P., Gelsolin Regulates Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through DNase I-Mediated Apoptosis. *Circulation Research* 2009, 104, 896–904.
- [110] Al-Kraity, W. R. H., Al-Dujaili, A. N. G., Assessment of gelsolin level in women with heart disease after menopause. *Rese. Jour. of Pharm. and Technol.* 2017, 10, 1657.

6 PŘÍLOHY

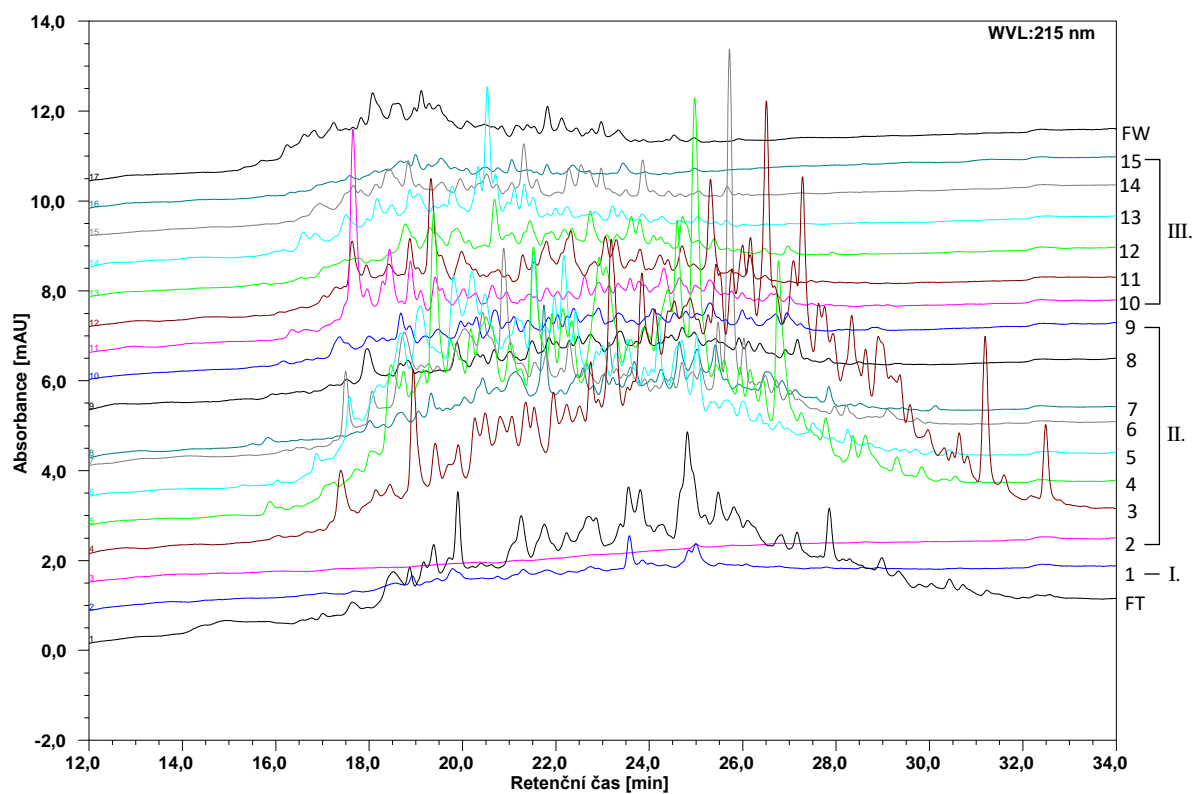
Příloha A SCX jednoduchá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 30-110 mM HCOONH ₄	96
Příloha B SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-125 mM HCOONH ₄	97
Příloha C SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-120 mM HCOONH ₄	98
Příloha D SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-113 mM HCOONH ₄	99
Příloha E SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-110 mM HCOONH ₄	100
Příloha F SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-100 mM HCOONH ₄	101
Příloha G SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-100 mM HCOONH ₄	102



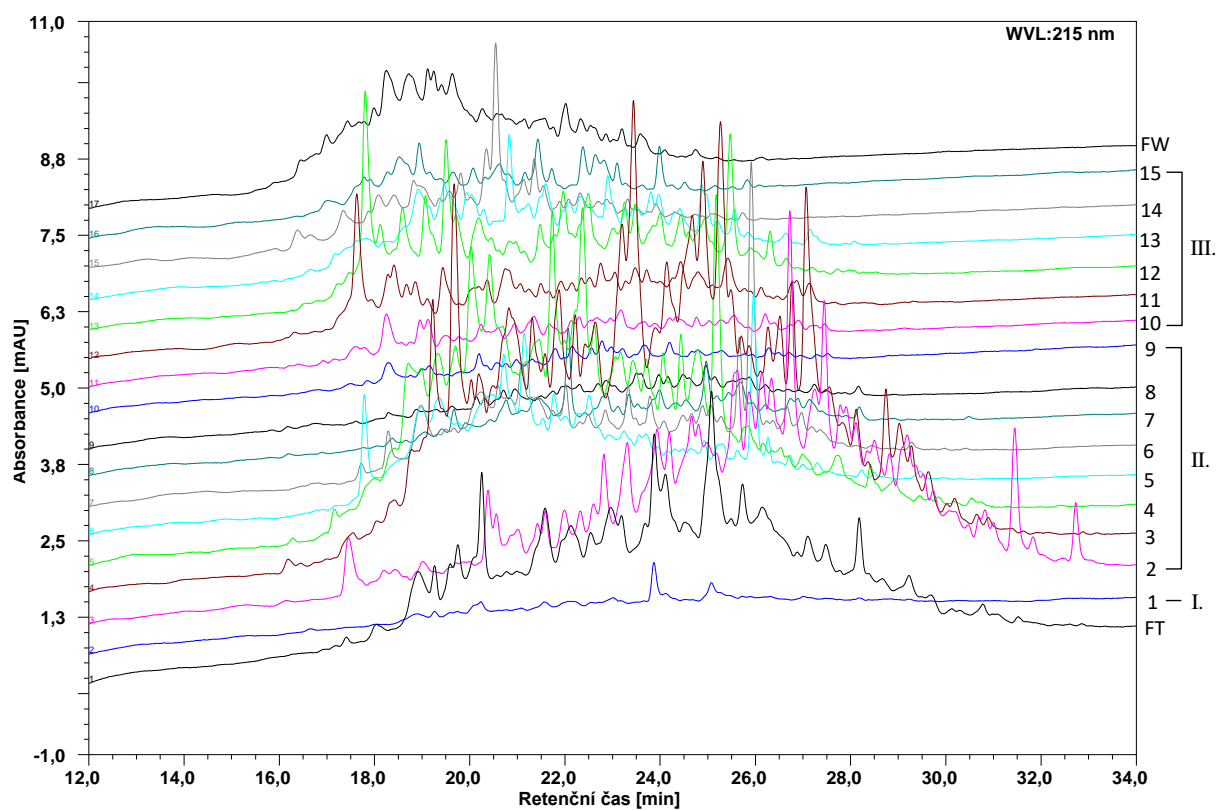
Příloha A. SCX jednoduchá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 30-110 mM HCOONH₄.



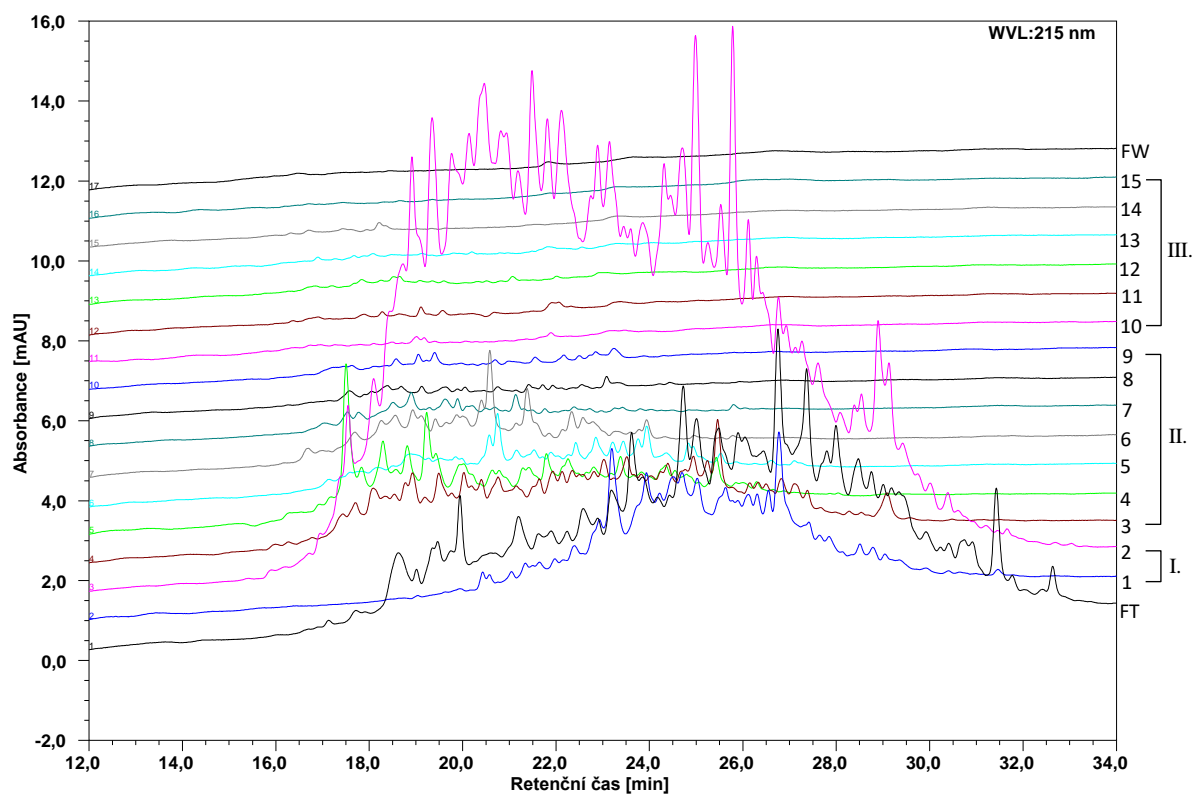
Příloha B. SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-125 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1%TFA/30% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1 - 1. gradient (0-25 mM HCOONH₄). Frakce 2 až 9 - 2. gradient (25-75 mM HCOONH₄). Frakce 10 až 13 - 3. gradient (75-125 mM HCOONH₄). FW –promytí mobilní fázi B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.



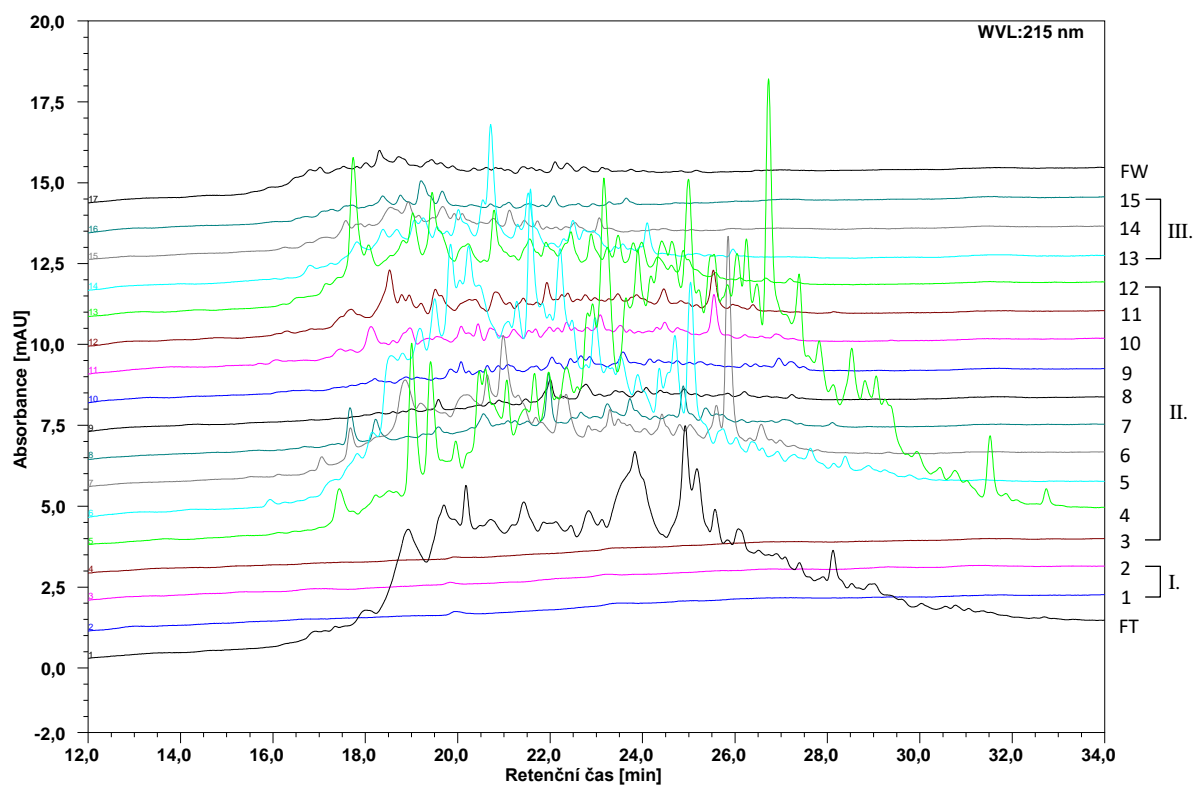
Príloha C. SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentračný gradient 0-120 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1%TFA/30% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – prvni frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1 - 1. gradient (0-30 mM HCOONH₄). Frakce 2 až 9 - 2. gradient (30-60 mM HCOONH₄). Frakce 10 až 15 - 3. gradient (60-120 mM HCOONH₄). FW – promytí mobilní fáze B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.



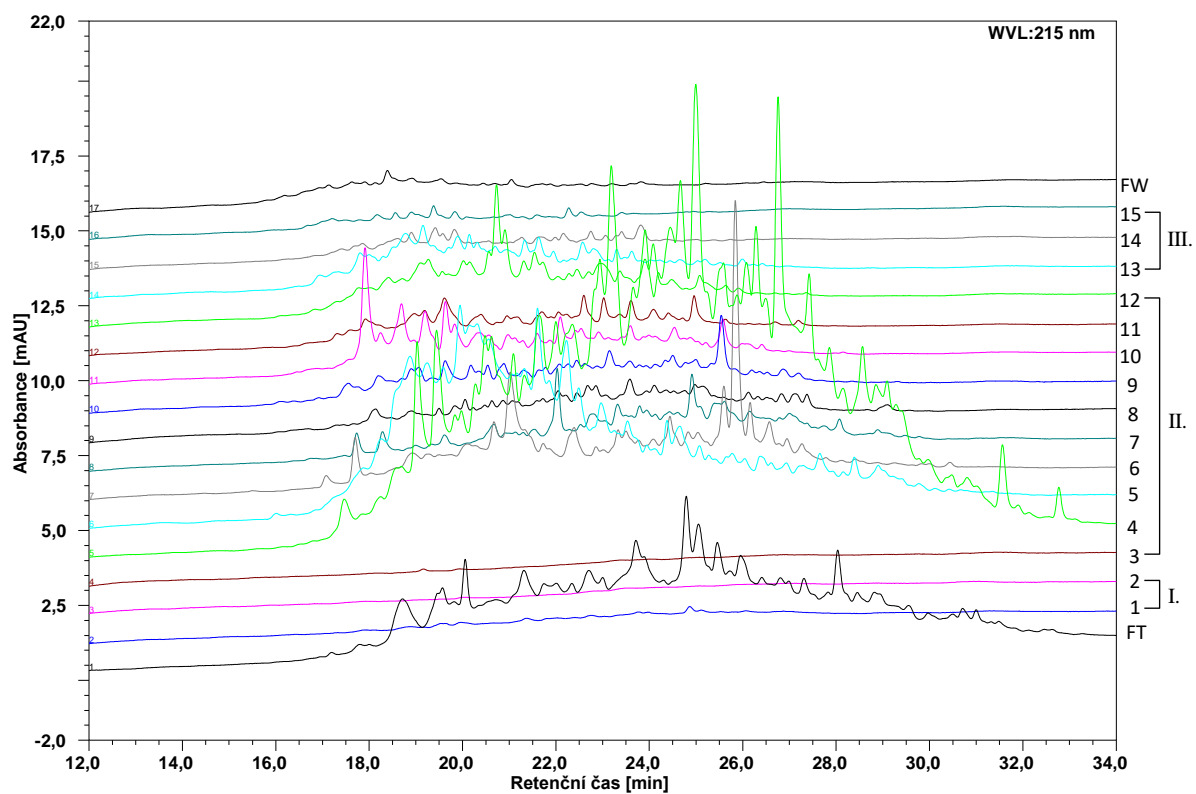
Příloha D. SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-113 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1%TFA/30% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1 - 1. gradient (0-33 mM HCOONH₄). Frakce 2 až 9 - 2. gradient (33-53 mM HCOONH₄). Frakce 10 až 15 - 3. gradient (53-113 mM HCOONH₄). FW – promytí mobilní fáze B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.



Příloha E. SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-110 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1%TFA/50% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1,2 - 1. gradient (0-30 mM HCOONH₄). Frakce 3 až 9 - 2. gradient (30-50 mM HCOONH₄). Frakce 10 až 15 - 3. gradient (50-110 mM HCOONH₄). FW –promytí mobilní fází B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.



Příloha F. SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentrační gradient 0-100 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1%TFA/50% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – první frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1,2 - 1. gradient (0-10 mM HCOONH₄). Frakce 3 až 12 - 2. gradient (10-30 mM HCOONH₄). Frakce 13 až 15 - 3. gradient (30-100 mM HCOONH₄). FW –promytí mobilní fázi B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.



Príloha G. SCX trojitá mikrogradientová eluce. Koncentračný gradient 0-100 mM HCOONH₄. Mobilní fáze A – 0,1% TFA/50% ACN, mobilní fáze B – 500 mM HCOONH₄/30% ACN. FT – prvni frakce analyzovaná na obsah kyselých peptidů nezadržujících se na stacionární fázi. Frakce 1,2 - 1. gradient (0-10 mM HCOONH₄). Frakce 3 až 12 - 2. gradient (10-30 mM HCOONH₄). Frakce 13 až 15 - 3. gradient (30-100 mM HCOONH₄). FW – promytí mobilní fázi B. Pro přehlednost byly závislosti posunuty na svislé ose o kladnou diferenci.