

UNIVERZITA PARDUBICE FAKULTA  
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Alžběta Darvašová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Průkaz a sledování enzymu ceramidsyntázy CerS2  
ve vybraných tkáních

Diplomová práce

2025

Bc. Alžběta Darvašová

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Detection and Monitoring of the  
Ceramide Synthase Enzyme CerS2  
in Selected Tissues

Diploma thesis

2025

Bc. Alžběta Darvašová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala všem, kteří mě v průběhu psaní této diplomové práce podporovali a inspirovali. V první řadě patří velké poděkování paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Věře Vozandychové, Ph.D. a RNDr. Pavlu Řehulkovi, Ph.D. z Katedry molekulární patologie a biologie fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové za odborné rady a za možnost změření vzorků u nich na katedře. Poděkování patří také doktorandům Msc. Egzontina Shabani a Mgr. Ondřeji Morávkovi za veškeré rady a pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a nejbližším, za jejich trpělivost a morální podporu. Vaše podpora pro mne znamenala více, než dokážu vyjádřit slovy.

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2024/2025

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Alžběta Darvašová**  
Osobní číslo: **C23225**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Průkaz a sledování enzymu ceramidsyntázy CERS2 ve vybraných tkáních**  
Téma práce anglicky: **Detection and Monitoring of the Ceramide Synthase Enzyme CERS2 in Selected Tissues**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

- 1) Enzym CERS2 a jeho význam v metabolismu lipidů v savčím organismu – struktura, lokalizace, funkce.
- 2) Popis vztahu enzymu CERS2 se vznikem nádorových buněk a rozvojem solidních nádorů.
- 3) Přehled metod pro izolaci a analýzu CERS2 (tkáň jater, pankreatu, buněčný lysát, krev).
- 4) Popis metod pro stanovení aktivity enzymů CERS se zaměřením na enzym CERS2.
- 5) Zaměřte se na popis a zhodnocení vědeckých výsledků dosažených v posledních 10 – 15, maximálně 20 letech.

### Experimentální část:

- 1) Zavedení metody pro izolaci CERS2 z tkání (játra, pankreas) a krevních buněk.
- 2) Optimalizace podmínek sorpce a eluce enzymu CERS2 z tkání jater metodou afinitní chromatografie.
- 3) K vyhodnocení všech výsledků použít vhodné bioinformatické nástroje.

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

Seznam doporučené literatury:

datovába PubMed

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

Konzultanti diplomové práce: **Mgr. Ondřej Morávek**  
Katedra biologických a biochemických věd  
**MSc. Egzontina Shabani**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Průkaz a sledování enzymu ceramidsyntázy CerS2 ve vybraných tkáních 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 dne 9.5. 2025

Bc. Alžběta Darvašová

## **NÁZEV**

Průkaz a sledování enzymu ceramidsyntázy CerS2 ve vybraných tkáních

## **ANOTACE**

Diplomová práce se věnuje enzymu ceramidsyntáza (CerS2), který je v současné době dáván do souvislosti s nádorovým bujením. Informace o struktuře, funkci a lokalizaci enzymu jsou doplněny o poznatky, jak je tento enzym zapojen do metabolismu lipidů, a zda se může podílet na vzniku nádorových buněk. Součástí diplomové práce je zavedení a optimalizace metody izolace CerS2 z jater, pankreatu a z membrán leukocytů, kde jsou využívány vedle centrifugace i elektroforetické metody kombinované s imunochemickou detekcí sledovaného proteinu a jeho MS identifikací. Součástí je i výroba nosiče pro následnou izolaci a purifikaci enzymu metodou imunoafinitní chromatografie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Ceramidsyntáza, ceramid, metabolismus sfingolipidů, separační metody

## **TITLE**

Detection and Monitoring of the Ceramide Synthase Enzyme CerS2 in Selected Tissues

## **ANNOTATION**

The thesis focuses on the enzyme ceramide synthase (CerS2), which has been currently linked to tumor growth. Information on the structure, function and localization of the enzyme is complemented by insights into how this enzyme is involved in lipid metabolism and whether it may be involved in tumor cells origin. The thesis includes the establishment and optimization of a method for the isolation of CerS2 from liver, pancreas, and leukocyte membranes, using not only centrifugation but also electrophoretic methods combined with immunochemical detection of the protein of interest and its MS identification. The production of a carrier for subsequent isolation and purification of the enzyme by immunoaffinity chromatography is also included.

## **KEYWORDS**

Ceramide synthase, ceramide, metabolism of sphingolipids, separation methods

# OBSAH

SEZNAM OBÁZKŮ .....	11
SEZNAM TABULEK A GRAFŮ .....	14
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	16
ÚVOD.....	18
1 ENZYMY LIPIDOVÉHO METABOLISMU – CERAMIDSYNTÁZY .....	20
1.1 Úvod .....	20
1.2 Význam ceramidsyntáz.....	22
2 ENZYM CERAMIDSYNTÁZA 2 .....	26
2.1 Struktura ceramidsyntázy 2 .....	26
2.2 Význam a funkce .....	29
2.3 Fyziologická a patologická role ceramidsyntázy 2 a ceramidů .....	31
2.3.1 Role ceramidsyntázy 2 a ceramidů v apoptóze.....	33
2.3.2 Podíl ceramidsyntázy 2 na rozvoji nádorů.....	34
3 METODY PRO IZOLACI A ANALÝZU CERAMIDSYNTÁZY 2 .....	40
3.2 Metody pro izolaci ceramidsyntázy 2 z buněk a tkání.....	41
3.2.1 Imunoprecipitace .....	41
3.2.2 Afinity chromatografie .....	42
3.3 Metody analýzy proteinu .....	44
3.3.1 Imunohistochemie.....	44
3.3.2 Stanovení genové exprese a proteosyntézy .....	46
3.3.3 Stanovení proteinu .....	46
4 METODY STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU CERAMIDSYNTÁZA 249	
4.2 Fluorescenční metody .....	50
4.3 Stanovení aktivity pomocí hmotnostní spektrometrie .....	51
CÍLE PRÁCE.....	52
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	53
5.1 Seznam laboratorního vybavení.....	53
5.1.1. Software .....	54
5.2 Seznam chemikálií.....	55
5.2.1 Seznam biologického materiálu.....	57
5.3 Příprava vzorků tkáně, homogenizace, centrifugace .....	58

5.4	Gelová elektroforéza 1D-SDS-PAGE .....	59
5.5	Western Blotting .....	62
5.6	Barvení proteinů na nitrocelulózkové membráně .....	63
5.7	Imunochemická detekce enzymu CerS2 .....	64
5.8	Barvení proteinů v gelu pomocí Coomassie Blue .....	66
5.9	Barvení proteinů v gelu dusičnanem stříbrným .....	66
5.10	Redukce, alkylace a precipitace proteinů .....	67
5.11	Izolace CerS2 z krevních buněk .....	69
5.12	Štěpení proteinů v gelu po elektroforetické separaci .....	70
5.13	Odsolení vzorku na mikrokolonce .....	71
5.14	Štěpení proteinů v roztoku .....	73
5.15	Odsolení vzorku na SPE kolonce .....	75
5.16	Bazická mikrogradientová frakcionace peptidů na reverzní fázi .....	76
5.17	Imobilizace IgG na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (ProMag-COOH) .....	78
5.18	Izolace CerS2 částicích na ProMag-anti-CerS2 IgG .....	80
6	VÝSLEDKY .....	82
6.1	Izolace ceramidsyntázy z tkání .....	82
6.2	Izolace ceramidsyntázy 2 z krevních buněk .....	110
6.3	Izolace ceramidsyntázy 2 metodou afinitní chromatografie .....	114
	DISKUSE .....	126
	ZÁVĚR .....	130
	POUŽITÁ LITERATURA .....	131
	PŘÍLOHY .....	143

## SEZNAM OBÁZKŮ

Obrázek 1 – Rozdělení fosfolipidů. ....	20
Obrázek 2 – Struktura sfingosinu a ceramidu.....	21
Obrázek 3 – Struktura ceramidů . ....	22
Obrázek 4 – Schéma jednotlivých cest syntézy ceramidu.....	23
Obrázek 5 – Schéma syntézy ceramidů a teoretická struktura ceramidsyntáz. ....	24
Obrázek 6 – Distribuce jednotlivých ceramidsyntáz v různých tkáních.. ....	24
Obrázek 7 – Aminokyselinová sekvence lidské CerS2 .. ....	26
Obrázek 8 – Grafické znázornění jednotlivých domén v enzymu CerS2.....	27
Obrázek 9 – Teoreticky navržená struktura CerS2.....	27
Obrázek 10 – Grafické znázornění struktury ceramidsyntázy 2.....	28
Obrázek 11 – Posttranslační modifikace .....	28
Obrázek 12 – Model aktivity ceramidsyntáz .....	29
Obrázek 13 – Molekulární interakce a posttranslační modifikace CeS2,.....	30
Obrázek 14 – Funkce ceramidů a ceramidsyntáz .....	32
Obrázek 15 – Schématické znázornění apoptotických cest. ....	33
Obrázek 16 – Schéma znázornění poměru sfingolipidů ve vztahu k rakovině.....	35
Obrázek 17 – Mechanismy související s delecí a nadměrnou expresí <i>CERS2</i> . ....	37
Obrázek 18 – Schéma imunoprecipitace. ....	42
Obrázek 19 – Schéma afinitní chromatografie.. ....	43
Obrázek 20 – Schéma imunohistochemie.....	45
Obrázek 21 – Imunofluorescence. ....	45
Obrázek 22 – Schéma jednotlivých kroků Western Blottingu. ....	47
Obrázek 23 – Schéma reakce pro stanovení aktivity ceramidsyntáz.....	49
Obrázek 24 – Centrifugační protokol izolace .....	82
Obrázek 25 – Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň jater. ....	83
Obrázek 26 –Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň jater.....	84
Obrázek 27 – Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň pankreatu a pakreatu.....	85
Obrázek 28 – Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň pankreatu. ....	86

Obrázek 29 – Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň pankreatu. ....	87
Obrázek 30 – Western blot analýza izolačních frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – Změna roztoku pro homogenizaci, různé koncentrace SDS, tkáň pankreatu.....	88
Obrázek 31 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – ředící řada, tkáň pankreatu.....	90
Obrázek 32 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – ředící řada, tkáň jater.. ....	92
Obrázek 33 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – ředící řada, tkáň jater. ....	94
Obrázek 34 – Western blot analýza izolačních frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – homogenizace ve 2% SDS, vzorky tkáň pankreatu a jater . ....	96
Obrázek 35 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – vzorky tkání pankreatu a jater, homogenizace ve 2% SDS.. ....	97
Obrázek 36 – Záznam LC-MS analýzy vzorků tkáň jater štěpených v gelu.....	99
Obrázek 37 – Záznam LC-MS analýzy vzorků tkáň pankreatu štěpených v gelu. ....	100
Obrázek 38 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Výsledky imunodetekce CerS2 pro vzorky použité pro štěpení v roztoku.....	102
Obrázek 39 – Záznam LC-MS analýzy vzorků tkání jater v roztoku.....	103
Obrázek 40 – Záznam LC-MS analýzy vzorků tkání pankreatu v roztoku.. ....	104
Obrázek 41 – Záznam LC-UV analýzy vzorků frakcí připravených manuální bazickou mikrogradientovou frakcionací peptidů směsného vzorku tkáň jater po štěpení v roztoku.....	105
Obrázek 42 – Záznam LC-UV analýzy vzorků frakcí připravených manuální bazickou mikrogradientovou frakcionací peptidů směsného vzorku tkáň pankreatu po štěpení v roztoku.....	105
Obrázek 43 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Zavedení redukce, alkylace a precipitace do protokolu.....	108
Obrázek 44 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Redukce, alkylace a precipitace proteinů acetonem. ....	109

Obrázek 45 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Výsledek izolace CerS2 z plné krve. ....	110
Obrázek 46 – Příprava buffy coatu. ....	111
Obrázek 47 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Izolace CerS2 z vrstvy buffy coat. ....	112
Obrázek 48 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Analýza frakcí izolace CerS2 z vrstvy buffy coat. ....	113
Obrázek 49 – Gel obarvený stříbrem. Analýza úspěšnosti přípravy nosiče, ověření účinnosti vazby IgG na magnetické částice ProMag COOH. ....	114
Obrázek 50 – Analýza vazebné frakce, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z buněčného lyzátu a kyselé eluci. ....	115
Obrázek 51 – Analýza vazebné frakce, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z buněčného lyzátu kyselé eluci a eluci deoxycholátem deoxycholátem. ....	116
Obrázek 52 – Analýza vazebné frakce, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z buněčného lyzátu a eluci glycinovým pufrem a deoxycholátem. ....	118
Obrázek 53 – Analýza vazebné frakce, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z jaterního homogennátu. Eluce glycinovým pufrem a deoxycholátem. ....	119
Obrázek 54 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Analýza, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z buněčného lyzátu. Zásaditá eluce. ....	119
Obrázek 55 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Analýza promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z jaterního homogennátu. Zásaditá eluce. ....	120
Obrázek 56 – Záznam LC-MS analýzy vzorků po štěpení nosiče s vazbou z jaterního homogennátu. ....	122
Obrázek 57 — LC-MS analýza vzorků po štěpení nosiče s vazbou z buněčného lyzátu. ....	122

## SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

Tabulka 1 —Exprese CERS2 u různých nádorů .....	36
Tabulka 2 – Roztoky pro přípravu gelů .....	60
Tabulka 3 – Objemy roztoků pro přípravu gelů .....	61
Tabulka 4 – Příprava mobilních fází pro mikrogradientové přečištění peptidů ....	73
Tabulka 5 – Tvorba mikrogradientu v mikrostríkačce .....	73
Tabulka 6 – Postup přečištění peptidů na Empore SPE C18.....	76
Tabulka 7 – Příprava mobilních fází pro manuální frakcionaci peptidů na reverzní fází v bazickém prostředí.....	77
Tabulka 8 – Tvorba mikrogradientu v mikrostríkačce, pro manuální frakcionaci peptidů na reverzní fází v bazickém prostředí.....	78
Tabulka 9 – Ředění homogenátu tkání. ....	90
Tabulka 10 – Identifikované peptidy po štěpení v gelu, roztoku a bazické frakcionaci. ....	106
Tabulka 11 – Identifikované peptidy po naštěpení nosičů. ....	124
Tabulka 12 – Přehled počtu identifikovaných peptidů specifických pro protein CerS2. ....	127
Graf 1 – Denzitometrické vyhodnocení membrány B po Western blot analýze pro protein CerS2, tkáň pankreatu. ....	91
Graf 2 – Denzitometrické vyhodnocení membrán B, C, D, po Western blot analýze pro protein CerS2, tkáň jater.. ....	93
Graf 3 – Denzitometrické vyhodnocení membrán A a B, po Western blot analýze pro protein CerS2, tkáň jater. ....	95
Graf 4 — Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky tkáň jater. ....	98
Graf 5 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky tkáň pankreatu.....	98
Graf 6 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky tkání jater po štěpení v roztoku.....	102

Graf 7 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky tkání pankreatu po štěpení v roztoku .....	103
Graf 8 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky po naštěpení nosiče s vazbou z jater. ....	121
Graf 9 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky po naštěpení nosiče s vazbou z buněčného lyzátu. ....	122

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AC – afinitní chromatografie

C1P – ceramid-1-fosfát (Ceramide-1-Phosphate)

CERS2 – gen kódující ceramidsyntázu 2

CerS2 – ceramidsyntáza 2

CerS – ceramidsyntáza

CK2 – kaseinkináza (Casein Kinase II)

CoA – koenzym A (Coenzyme A)

ECL – elektrochemiluminiscence (Electrochemiluminescence, Electrogenerated chemiluminescence)

Elov11 – elongáza mastných kyselin (Elongation of Very Long-Chain Fatty Acids, Very Long Chain Fatty Acid Elongase 1)

ER – endoplazmatické retikulum

Hox – homeodoména, homeobox doména

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

HPTLC – vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (High Performance Thin Layer Chromatography)

IAC – imunoafinitní chromatografie (Immunoaffinity Chromatography)

Lag-1 – gen 1 zajišťující dlouhověkost (Longevity Assurance Gene 1)

LASS 2 – homolog 2 genu zajišťující dlouhověkost (Longevity Assurance homolog 2)

LC – kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)

MS – hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

M<sub>w</sub> – molekulová hmotnost (Molecular weight)

NBD – nitrobenzoxadiazol, nitrobenzofurazan

NC – nitrocelulóza

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

PCR – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

PVDF – polyvinylidenfluorid

S1P – sfingosin-1-fosfát (Sfingosine-1-phosphate)

SDS – dodecylsírán sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)

SIRT3 – sirtuin 3

TMSG1 – gen potlačující metastazující nádory (Tumor Metastasis Suppressor Gene 1)

TRAM – protein spojený s translokací přes membránu (Translocation Associated Membrane protein)

TLC doména – doména pojmenovaná po proteinech ve kterých byla původně objevena TRAM-LAG1-CLN8

WB – Western Blotting

## ÚVOD

V současné době představují nádorová onemocnění závažné zdravotní komplikace. Jejich výskyt i mortalita roste. Zvýšený výskyt nádorů je ovlivněn nejen stárnutím populace, ale také zlepšujícími se diagnostickými metodami a dostupností lékařské péče. Dalším důležitým faktorem přispívající k výskytu nádorových onemocnění je životní styl a prostředí, ve kterém žijeme. Důsledkem nádorového onemocnění dnes, nejen v České republice umírá, stále více lidí. Rakovina plic, tlustého střeva a konečníku, dále slinivky břišní, prsu a také prostaty jsou nejčastějšími typy nádorů s fatální prognózou. Úmrtnost na tyto typy nádorů je u nás i přes vysokou kvalitu lékařské péče stále vysoká.

Jeden z klíčových momentů v léčbě rakoviny je její včasná diagnostika již v prekancerózní fázi. Mnoho nádorových onemocnění lze vyléčit, pokud jsou včas odhaleny a účinně léčeny. Z tohoto důvodu je stále větší snaha o nalezení vhodných biomarkerů, které by mohly sloužit k včasné identifikaci nádorů v jejich raných stádiích.

U mnoha nádorů, především gastrointestinálního traktu, jsou pozorované změny v lipidovém metabolismu. Nádorové buňky vykazují významné změny v metabolismu lipidů, které jsou klíčové pro jejich růst, přežití a metastazování [1-3]. Tyto změny zahrnují zvýšenou syntézu a příjem lipidů, pozměněný metabolismus mastných kyselin a další. Pochopením těchto procesů se otevírá možnost pro cílenou léčbu. Pacienti s nádory gastrointestinálního traktu často přicházejí k lékaři již ve vyspělém stádiu onemocnění, což vede k omezeným možnostem léčby.

Na změnách v lipidovém metabolismu se podílí celá řada enzymů [4,5]. Specifické změny byly pozorovány v lipidovém profilu spojeném s karcinomem slinivky břišní [6,7]. Dále také u kolorektálního karcinomu [8,9,10]. Těchto změn se často účastní enzymy, například syntáza mastných kyselin [11], acetyl-koenzym A karboxyláza [12], stearoyl-koenzym A desaturáza [13] a další [14]. Jedním z dalších možných klíčových enzymů by mohla být ceramidsyntáza 2 [15].

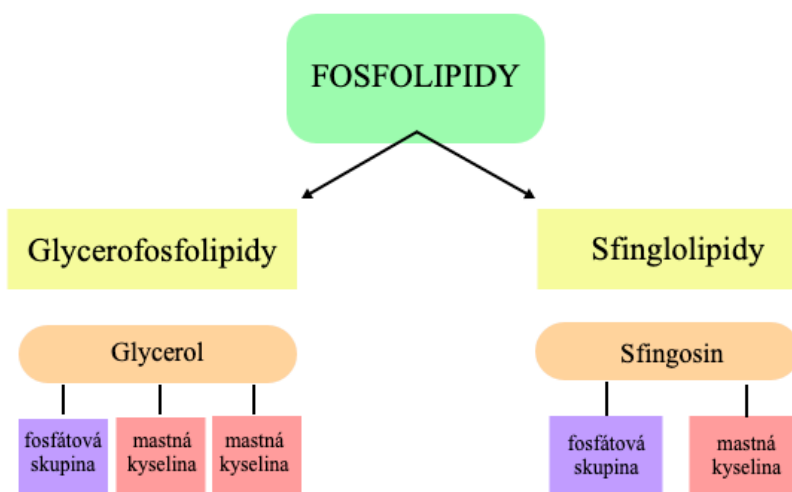
U různých typů nádorů již byly pozorovány změny nejen v expresi, ale také v aktivitě enzymu CerS2 [16]. Tyto změny naznačují nejen její potenciální úlohu v patogenezi, rané diagnostice, ale může se stát také potencionálním terapeutickým cílem. Ceramidsyntáza 2 katalyzuje syntézu ceramidů s velmi dlouhým acylovým řetězcem. Ceramidy jsou klíčovými složkami buněčných membrán. Hrají také zásadní roli v biologických procesech, včetně vývoje rakoviny, obezity, diabetu mellitu 2. typu, bariérové funkce kůže, ukládání lipidů a u neurologických poruch [15]. Pochopení toho, jak jednotlivé CerS a ceramidy, které syntetizují, narušují buněčnou homeostázu a podporují tak progresi onemocnění, má proto velký význam.

# 1 ENZYMY LIPIDOVÉHO METABOLISMU – CERAMIDSYNTÁZY

## 1.1 Úvod

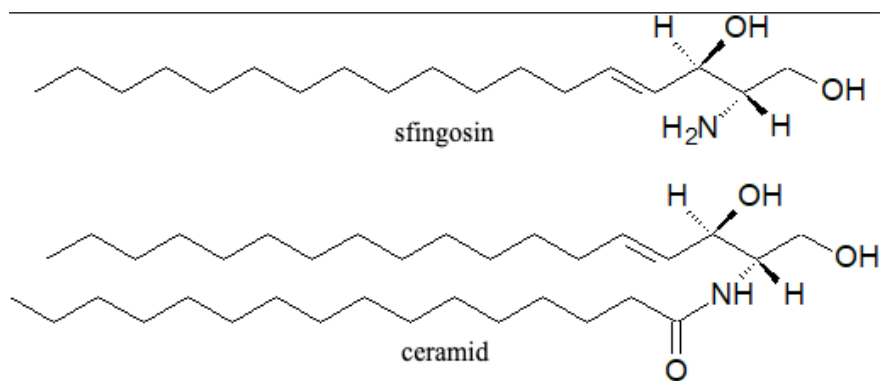
Buněčné membrány jsou nepostradatelnou součástí prokaryotických a eukaryotických buněk. Jsou to složité a dynamické struktury, skládající se především z lipidů a proteinů. Mezi jejich hlavní funkce patří oddělení buňky od okolního prostředí a členění vnitřního prostředí buňky. Kromě své strukturální role díky své permeabilitě umožňuje membrána také selektivní transport látek. Dále zajišťuje signalizaci a podílí se na regulaci buněčných procesů [17].

Membrány jsou tvořené dvěma lipidovými vrstvami nazývané jako fosfolipidová dvojvrstva. V membránách eukaryotických buněk se vyskytuje mnoho typů lipidů nejčastěji však tři typy: fosfolipidy, glykolipidy a steroly (konkrétně cholesterol). Komplexní fosfolipidy podílející se na stavbě membrán buněk jsou hlavně glycerofosfolipidy a sfingolipidy. Glycerofosfolipidy obsahují glycerol, na který jsou navázané dvě mastné kyseliny a jedna fosfátová skupina. Na fosfátovou skupinu se může vázat další složka např. cholin, serin. Sfingolipidy místo glycerolu obsahují sfingosin (viz obr.č.1) [17-20].



Obrázek 1 – Rozdělení fosfolipidů, rozdíl mezi glycerofosfolipidy a sfingolipidy.

Základní stavební jednotkou sfingolipidů jsou ceramidy [19,20]. Ceramidy vzniknou spojením sfingosinu a mastné kyseliny pomocí amidové vazby (viz obr.č.2).



Obrázek 2 – Struktura sfingosinu a ceramidu, převzato a upraveno z [21].

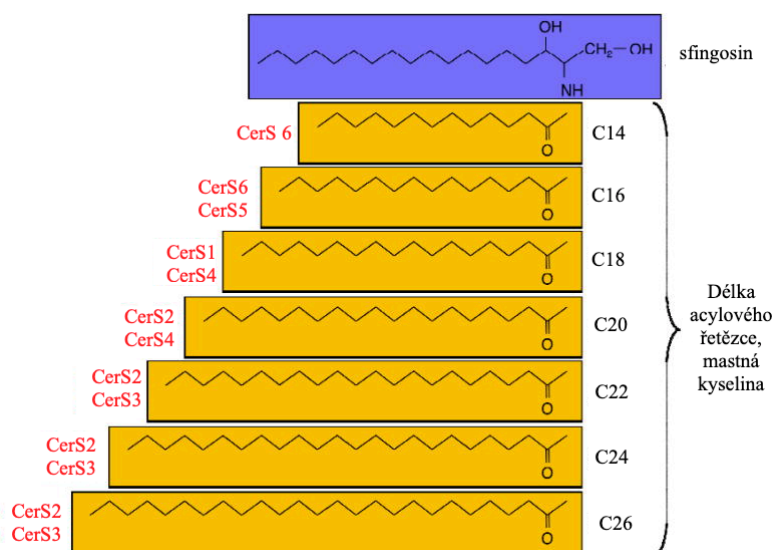
Ceramidy jsou důležitou strukturní součástí membrán. Díky své hydroxylové funkční skupině a amidové vazbě skupině na sfingosinové páteři mají ceramidy schopnost vytvářet rozsáhlé vodíkové vazby s jinými membránovými lipidy. Takto uspořádané lipidové domény také nazývané lipidové rafty jsou důležité pro ukotvení receptorů a membránových proteinů, dále ovlivňují fluiditu a propustnost membrány [20,22]. Dále se ceramidy podílejí na buněčné signalizaci, řízené buněčné smrti (apoptóze) a mohou být zapojeny do imunitní odpovědi a reakci na stres [23]. Jsou to antiproliferativní, propapoptické a nádor supresorové lipidy [24].

Ceramidy dokáží perforovat lipidové dvojvrstvy buněk tvorbou kanálů naplněných vodou. Během iniciace apoptózy se hladiny mitochondriálních ceramidů zvyšují, to má za následek rozrušení integrity vnější mitochondriální membrány. Tvorbou pórů dochází k uvolnění proapoptických proteinů např. cytochromu c z mezimembránového prostoru mitochondrie do cytosolu, což vede ke ztrátě potenciálu mitochondriální membrány [25,26].

## 1.2 Význam ceramidsyntáz

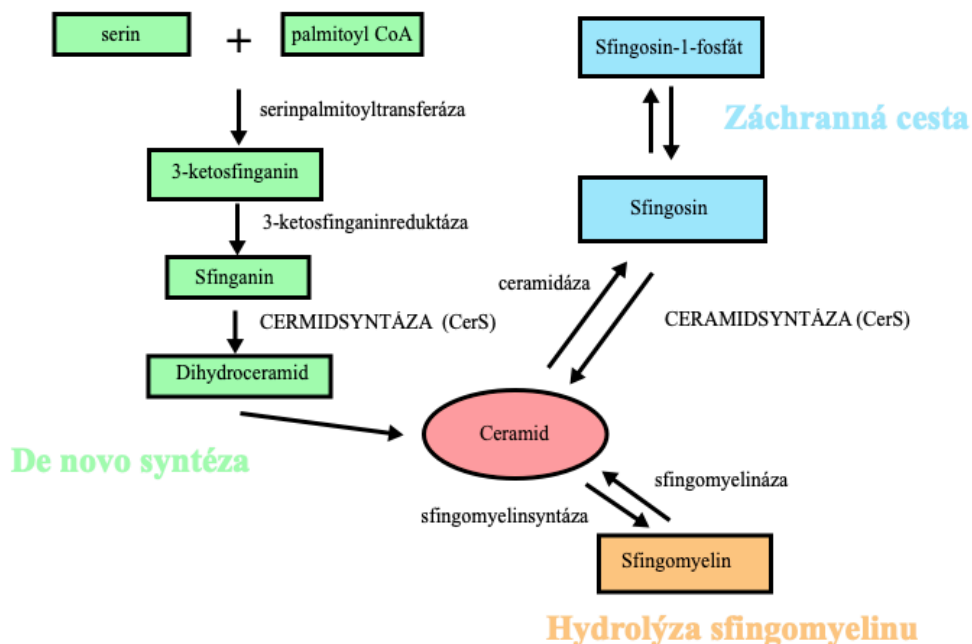
### Biosyntéza ceramidu

Produkce sfingolipidů je přesně regulovaná dráha a její dysregulace má zásadní vliv na fyziologické a patofyziologické procesy [27]. Hlavním centrem metabolické sfingolipidové dráhy je ceramid. U savců jsou ceramidy syntetizovány rodinou šesti enzymů – ceramidsyntázami (CerS1-6), které patří mezi acyltransferázy [28,29]. Syntéza ceramidů probíhá v endoplazmatickém retikulu (ER), kde jsou enzymy CerS lokalizovány, a které je nejdůležitějším zdrojem ceramidů. Každá z ceramidsyntáz má specifitu pro různé délky mastných kyselin (viz obr.č.3)



Obrázek 3 – Struktura ceramidů sřingoidní báze je spojená amidovou vazbou s postranním řetězcem mastné kyseliny. Ceramidsyntázy 1-6 preferují rozdílné délky acylověho řetězce, převzato a upraveno z [28].

Existují tři cesty tvorby ceramidu. *De novo* syntéza, záchranná cesta a hydrolýza sřingomyelinu (viz obr. č. 4) [30]. *De novo* syntéza probíhá především na povrchu ER. Po syntéze jsou ceramidy transportovány z ER do Golgiho aparátu. Ceramidy vzniklé záchranou cestou mohou být deacetylovány ceramidázou za vzniku sřingosinu. Výhodou hydrolýzy sřingomyelinu je rychlá produkce ceramidů v případě potřeby [31].

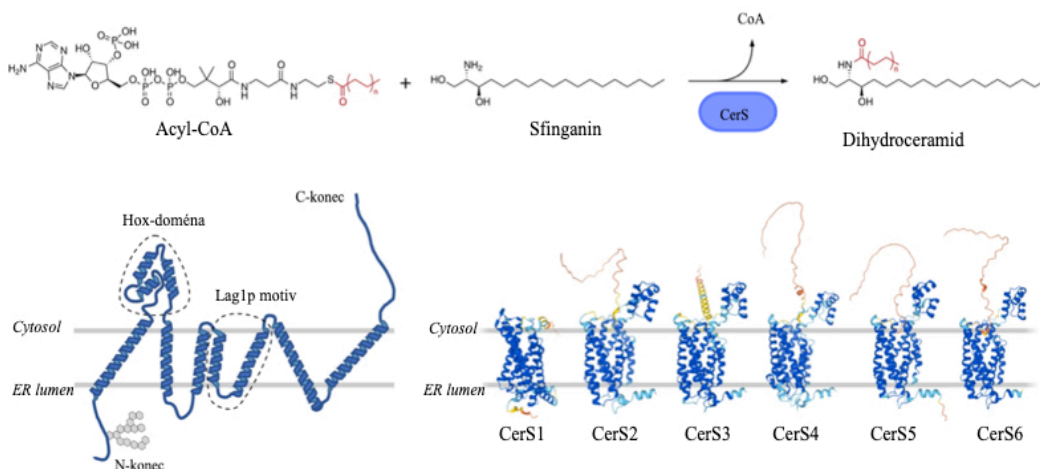


Obrázek 4 – Schéma jednotlivých cest syntézy ceramidu, převzato a upraveno z [30].

*De novo* syntéza začíná kondenzací serinu a palmitoyl-CoA za vzniku 3-ketosfinganinu pomocí serinpalmitoyltransferázy. Dále je 3-ketosfinganin redukován (3-ketosfingasinreduktázou) na sfinganin. Poté následuje syntéza dihydroceramidu ceramidsyntázou. Dihydroceramid je desaturován za vzniku ceramidu (dihydroceramiddesaturázou) a to vložení dvojné vazby [30,32].

Různá substrátová specifita jednotlivých ceramidsyntáz přispívá k rozdílným délkám řetězcům mastných kyselin ceramidu a komplexních sfingolipidů v buňce [33,34].

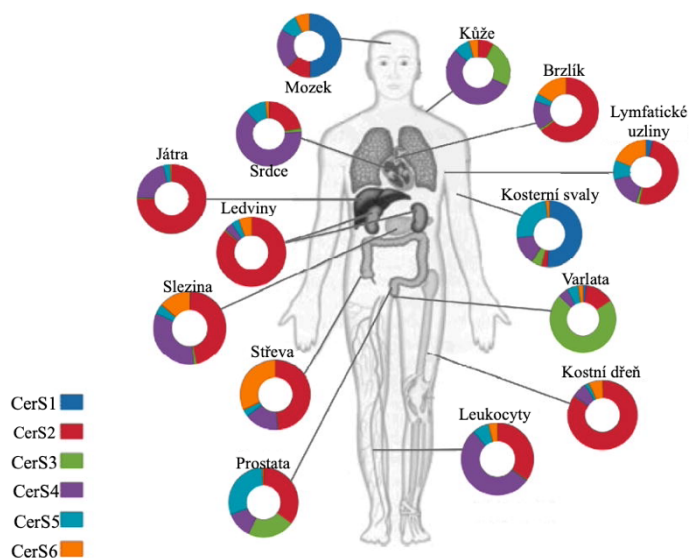
Na obrázku č.5 je znázorněno reakční schéma aktivity ceramidsyntáz v *de novo* syntéze ceramidů. Dále pravděpodobná struktura CerS a modely jednotlivých ceramidsyntáz. Jak již bylo zmíněno výše ER je hlavním místem biogeneze sfingolipidů. CerS se nacházejí v membráně ER. N-konec CerS směřuje do lumenu ER a C-konec do cytosolu (viz obr.5) [35].



Obrázek 5 – Schéma de novo syntézy ceramidů a teoretická struktura ceramidsyntáz, převzato a upraveno z [34], CoA – koenzym A, CerS – ceramidsyntáza, ER – endoplazmatické retikulum.

Jak je patrné z obrázku č.5 jednotlivé ceramidsyntázy se liší délkou C-konce a Cers1 neobsahuje Hox doménu.

Kromě délky preferovaného mastného řetězce se taky jednotlivé ceramidsyntázy liší distribucí v různých tkáních. Na obrázku č.6 je znázorněné zastoupení jednotlivých hladin mRNA (korelující se zastoupením jednotlivých CerS) v lidském těle [28].



Obrázek 6 – Distribuce jednotlivých ceramidsyntáz v různých tkáních, převzato a upraveno z [28].

Ceramidsyntázy vykazují rozdílné, tkáňově specifické expresní vzorce. Zároveň v kombinaci s dostupností různých mastných kyselin přispívají ke komplexnímu, tkáňově specifickému distribučnímu vzorci ceramidů s různou délkou acylového řetězce [36].

CerS1 je exprimována hlavně centrální nervové soustavě, konkrétně v neuronech [37,38]. Ceramidy které syntetizuje (C18) jsou nezbytné pro vývoj mozku a metabolismus glukózy [36]. CerS2 je široce exprimována mezi tkáněmi, především v játrech, ledvinách, slezině a ve střevech [39,40]. CerS3 je převážně exprimována ve varlatech, dále v prostatě a kůži [41,42]. Ceramidy C24 syntetizované CerS3 jsou klíčové pro udržení bariérové funkce kůže [36]. CerS4 není přímo specifická pro určité tkáně. Exprimována ve většině z nich. [43,44]. CerS 5 není specifická pro určité tkáně. Exprimována ve většině z nich [45,46]. CerS6 také není úplně specifická pro určité tkáně, ale je převážně exprimována v ledvinách, ve střevech a také v tukových buňkách [47,48]. Ceramidy C16 syntetizované CerS5 a CerS6 jsou klíčové pro energetickou homeostázu buňky, konkrétně regulaci lipolýzy a lipogeneze. Rozvoj obezity a jiných metabolických onemocnění souvisí se zvýšenou produkcí ceramidu C16 [36,49-51].

## 2 ENZYM CERAMIDSYNTÁZA 2

Enzym ceramidsyntáza 2 (2.3.1.297) je enzym, který je u člověka kódován genem *CERS2*. Lidská ceramidsyntáza 2 byla prvně identifikována a popsána v roce 2001 [52]. Je známa také jako Longevity Assurance Gene Homolog 2, (LASS 2) nebo jako Tumor Metastasis-Suppressor Gene 1 (TMSG1).

### 2.1 Struktura ceramidsyntázy 2

Lidská CerS2 má molekulovou hmotnost okolo 45 kDa a je tvořena 380 aminokyselinami (viz obr. č.7) [40].

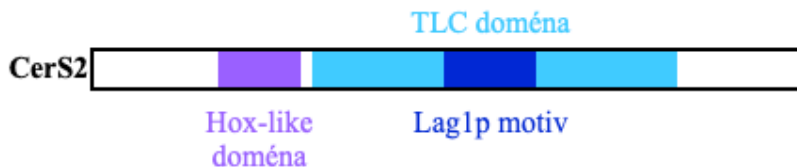
Length 380	Last updated 2001-12-01 v1
Mass (Da) 44,876	Checksum <sup>1</sup> C8CEAF6AAD0B4577
10 20 30 40 50 60 70 80 90	
MLQTLYDYFW WERLWLPVNL TWADLEDRDG RYAKASDLY ITLPLALLFL IVRYFFELYV ATPLAALLNI KEKTRLRAPP NATLEHFYLT	
100 110 120 130 140 150 160 170 180	
SGKQPKQVEV ELLSRQSGLS GRQVERWFRR RRNQRPSLL KKFREASWRF TFYLIAFIAG MAVIVDKPWF YDMKKVWEGY PIQSTIPSQY	
190 200 210 220 230 240 250 260 270	
WYMIELSFY WSLLFASIAD VKRKDFKEQI IHHVATIILI SFSWFANYIR AGTLIMALHD SSDYLLES AK MFNYAGWKNT CNNIFIVFAI	
280 290 300 310 320 330 340 350 360	
VFIITRLVIL PFWILHCTLV YPLELYPAFF GYFFNSMMG VLQLLHIFWA YLILRMAHKF ITGKLVEDER SDREETESSE GEEAAAGGGA	
370 380	
KSRPLANGHP ILNNHRKND	

Obrázek 7 – Aminokyselinová sekvence lidské CerS2 převzata a upraveno z [40].

CerS2 je protein se dvěma hlavními doménami. Hox doménou a TLC doménou (TRAM/LAG1/CLN8). TLC doména se skládá z několika transmembránových alfa helixů. TLC doména je translokační, je nezbytná pro aktivitu a má strukturu potřebnou pro katalýzu a vazbu substrátu. Aktivní místo se nachází v oblasti známé jako Lag 1p motiv, která obsahuje dva histidinové zbytky a nachází se v doméně TLC [53] (viz kapitola o aktivitě CerS2).

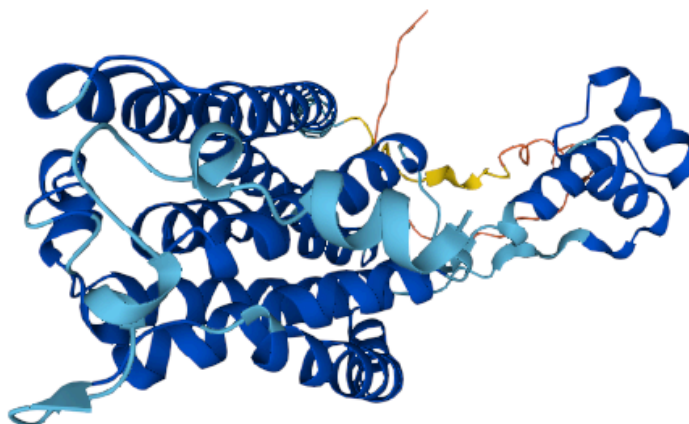
Další oblast Hox – homeobox doména, která se nachází v CerS2-S6, je odvozena od homeoboxových proteinů, sekvenčně specifických transkripčních faktorů důležitých při vývoji [28]. Hox doména obsahuje zbytky, které jsou kritické pro katalytickou aktivitu, ale nezdá se, že by hrály roli při určování specifity acyl-CoA [35,54,55]. Poslední dvě transmembránové šroubovice obsahují sekvenci

jedenácti aminokyselin, která se podílí na určení specifity acylového řetězce [35,56]. Na obrázku č. 8. jsou znázorněné jednotlivé domény.



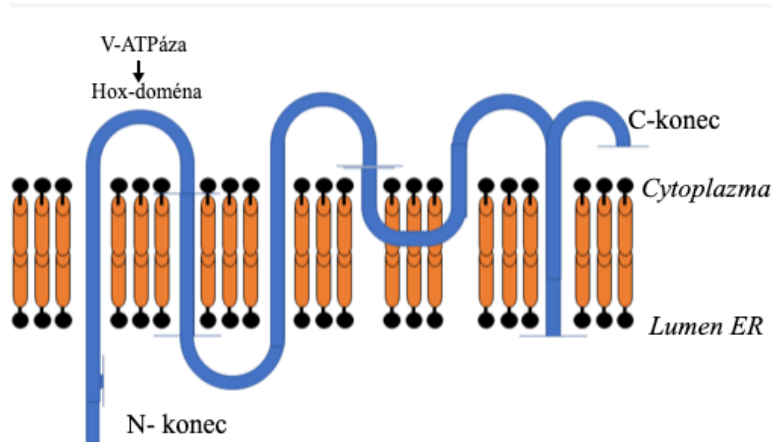
Obrázek 8 – Grafické znázornění jednotlivých domén v enzymu CerS2, CerS2 – ceramidsyntáza 2, TLC doména – transmembránová doména, převzato a upraveno z [43].

Na obrázku č. 9 je znázorněná teoretická struktura enzymu CerS2 (z databáze Uniprot).



Obrázek 9 – Teoreticky navržená struktura CerS2 převzato z [40], jednotlivé oblasti označené odlišnými barvami znázorňují důvěru modelu (pravděpodobnost shody se skutečnou strukturou). Tmavě modrá znázorňuje velmi vysokou důvěru, světle modrá je důvěryhodná, žlutá nízkou a červená velmi nízkou důvěru.

Jak již bylo zmíněno výše CerS2 se nachází v membráně endoplazmatického retikula (ER). N-konec CerS2 směřuje do lumenu ER a C-konec do cytosolu (viz obr.č.10).



Obrázek 10 – Grafické znázornění struktury ceramidsyntázy 2, skládá se ze šesti transmembránových helixů. Převzato a upraveno z [59].

## Posttranslační modifikace CerS2

Ceramidsyntáza 2 podléhá několika posttranslačním modifikacím. Konkrétně glykosylaci, acetylaci a fosforylaci [40,58]. Posttranslační modifikace (PTM) CerS2 ovlivňují stabilitu a enzymatickou aktivitu. Protein CerS2 je na svém N-konci glykosylován (asparagin 19). Kromě glykosylace je také fosforylován na C-konci (serinové a threoninové zbytky 341, 346, 348, 349 viz obr.č.11) [40].

10	20	30	40	50	60
MLQTLYDYFW	WERLWLPVNL	TWADLEDRDG	RVYAKASDLY	ITLPLALLFL	IVRYFFELYV
70	80	90	100	110	120
ATPLAALLNI	KEKTRLRAPP	NATLEHFYLT	SGKQPKQVEV	ELLSRQSGLS	GRQVERWFRR
130	140	150	160	170	180
RRNQDRPSLL	KKFREASWRF	TFYLIAFIAG	MAVIVDKPWF	YDMKKVWEGY	PIQSTIPSQY
190	200	210	220	230	240
WYYMIELSFY	WSLLFSIASD	VKRKDFKEQI	IHHVATIILI	SFSWFANYIR	AGTLIMALHD
250	260	270	280	290	300
SSDYLLESA	MFNYAGWKNT	CNNIFIVFAI	VFIITRLVIL	PFWILHCTLV	YPLELYPAFF
310	320	330	340	350	360
GYFFNSMMG	VLQLLHIFWA	YLILRMAHKF	ITGKLVEDER	SDREETESSE	GEEAAAGGGA
370	380				
KSRLANGHP	ILNNNHRKND				

Obrázek 11 – Posttranslační modifikace, předpokládané místo glykosylace je vyznačené červeně, modře jsou vyznačená místa pravděpodobné fosforylace, převzato a upraveno z [40].

CerS2 je fosforylován proteinkinázou 2 (CK2) což vede ke zvýšení jeho aktivity [58,59]. CK2 je serin/threoninová proteinkináza, která fosforyluje různé proteiny. Hraje klíčovou roli v mnoha buněčných procesech [59].

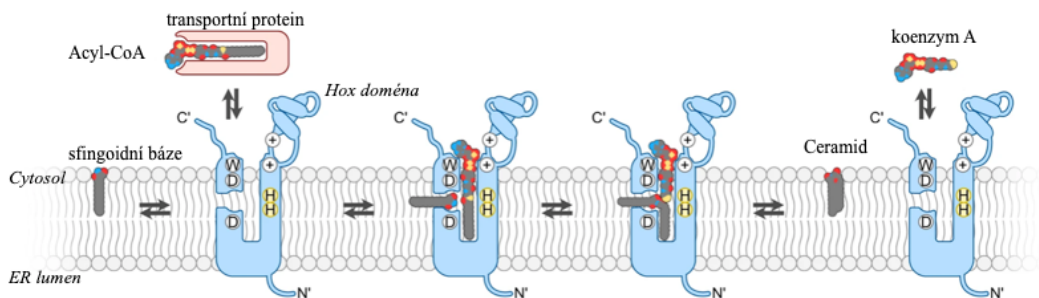
Další PTM je acetylace. Deacetylace CerS2 prostřednictvím sirtuinu 3 (SIRT3) vede ke zvýšené aktivitě enzymu CerS2. SIRT3, z rodiny NAD<sup>+</sup>-dependentních proteinových deacetyláz, je primární deacetyláza. Koordinuje adaptivní reakce několika metabolických drah v mitochondriích [60,61].

## 2.2 Význam a funkce

Ceramidsyntáza 2 (CerS2) je enzym, podílející se na metabolismu sfingolipidů. Je klíčovým enzymem v biosyntéze ceramidů konkrétně syntéze ceramidů s velmi dlouhými řetězci (C22-26). Katalyzuje přenos acylového řetězce z acyl-CoA na sfingoidní bázi. Nachází se v endoplazmatické retikulu a také na jaderné membráně. CerS2 je exprimována v různých tkáních, nejvíce především v játrech a ledvinách [39,40].

### *Aktivita ceramidsyntázy 2*

Aktivita CerS2 podporuje různé biologické funkce od udržování správné funkce ledvin a mozku, až po ochranu před nádory jater [39,40]. Předpokládá se, že aktivním místem CerS2 je dvojitý histidinový motiv, konkrétně v oblasti (pozici) aminokyselin 212-213 (viz obr.č.12) [62].

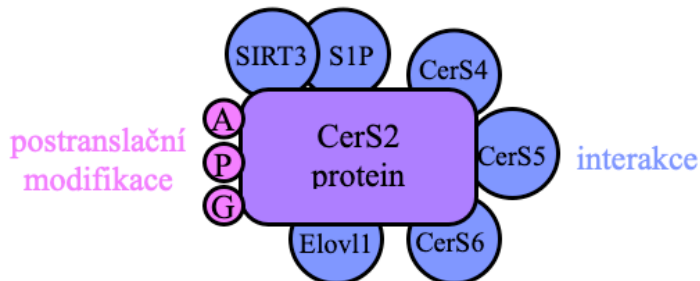


Obrázek 12 – Model aktivity ceramidsyntáz převzato a upraveno z [34], z ER – endoplazmatické retikulum, C' – C konec aminokyseliny, N' – N konec aminokyseliny, zkratky aminokyselin: W – tryptofan, D – kyselina asparagová, H – histidin.

Na obrázku č.12 je znázorněn model aktivity N-acyltransferázy CerS. V aktivním místě CerS se nachází acyl-CoA, který je z cytoplazmatické strany membrány ER přenášen prostřednictvím acyl-CoA transportních proteinů. Sfingoidní báze se do aktivního místa dostávají bočním kanálem. Acylový ocas zůstane volný v hydrofobní oblasti dvojvrstvy. Předpokládá se, že k přenosu acylového řetězce dochází, jakmile jsou obě molekuly v aktivním místě. Po syntéze ceramidu se produkt uvolní do dvojvrstvy, zatímco volný CoA se uvolní do cytoplazmy. Poloha konzervovaných zbytků tryptofanu (W), asparagové kyseliny (D) a histidinu (H) jsou vyznačeny zkratkami [34].

### ***Mechanismy regulace aktivity ceramidsyntázy 2***

Aktivita CerS2 je závislá na koncentraci substrátu a je regulována posttranslačními modifikacemi (viz kapitola o PTM), dále tvorbou dimerů a dalšími protein-proteinovými interakcemi [56].



Obrázek 13 – Molekulární interakce a posttranslační modifikace CeS2,

*A – acetylace, P – fosforylace, G – glykosylace, SIRT3 – Sirtuin 3, S1P – sfingosin-1-fosfát, Elov11 – elongáza mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem, CerS4-6 – ceramidsyntázy, převzato a upraveno z [56].*

Aktivita CerS2 je regulována několika protein-proteinovými interakcemi, včetně dalších CerS (viz obr. č.13.). Další bioaktivní sfingolipidy mohou také regulovat aktivitu CerS2 [56]. Aktivita CerS2 je inhibována sfingosin-1-fosfátem (S1P) prostřednictvím interakce S1P s motivem podobným S1P receptoru, který

se nachází pouze u CerS2. V důsledku toho je S1P nekompetitivním inhibitorem CerS2 [29].

Kromě vazby SP1 na CerS2 interaguje s proteinem CerS2 také protein 1 pro prodlužování mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (Elovl1). Elovl1 interaguje s CerS2 nepřímo prostřednictvím společných faktorů generovaných z elongázového komplexu, jako je 3-ketoacyl-CoA reduktáza nebo trans-2,3-enoyl-CoA reduktáza. Aktivita Elovl1 závisí na expresi CerS2 [27].

Tvorbou dimerů může být aktivita CerS2 modulována. Aktivita CerS2 je zvýšena koexpresí s katalyticky aktivní formou CerS5 nebo CerS6. V konstitutivním heterodimeru složeném z CerS5 a CerS2 závisí aktivita CerS2 na katalytické aktivitě CerS5 [63].

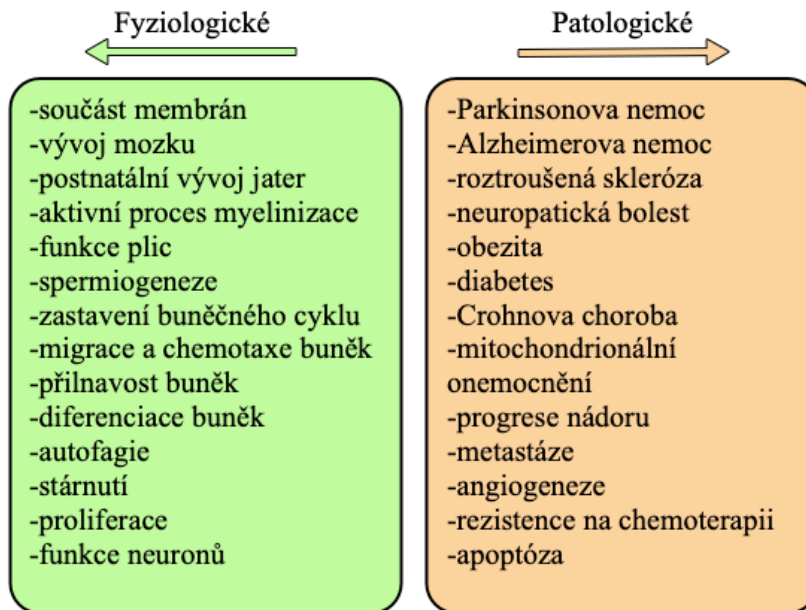
### **2.3 Fyziologická a patologická role ceramidsyntázy 2 a ceramidů**

Ceramidy a ceramidsyntázy mají mnoho funkcí a rolí nejen v rámci fyziologických procesů probíhajících v buňkách a tkáních, konkrétně podíl na apoptóze a regulaci rovnováhy mezi ceramidy s krátkými a dlouhými řetězci.

Dosavadní výsledky výzkumu ale také naznačují, že se podílejí také i na mnoha patologických dějích souvisejících mj. s dysfunkcí mitochondrií, hepatopatií a změnou permeability buněčných membrán [30,31,36]. Na obrázku č.14 jsou znázorněny fyziologické a patologické procesy na kterých se podílejí ceramidy a ceramidsyntázy [56].

V následující kapitolách se budeme věnovat souvislosti CerS2 rozvojem nádorových onemocnění a roli ceramidů a CerS 2 v apoptóze. V různých souvislostech může aktivita CerS2 v závislosti na různých faktorech buď podporovat apoptózu, nebo ji inhibovat. To poukazuje na všestrannou úlohu CerS2 nejen u nádorových onemocnění [26].

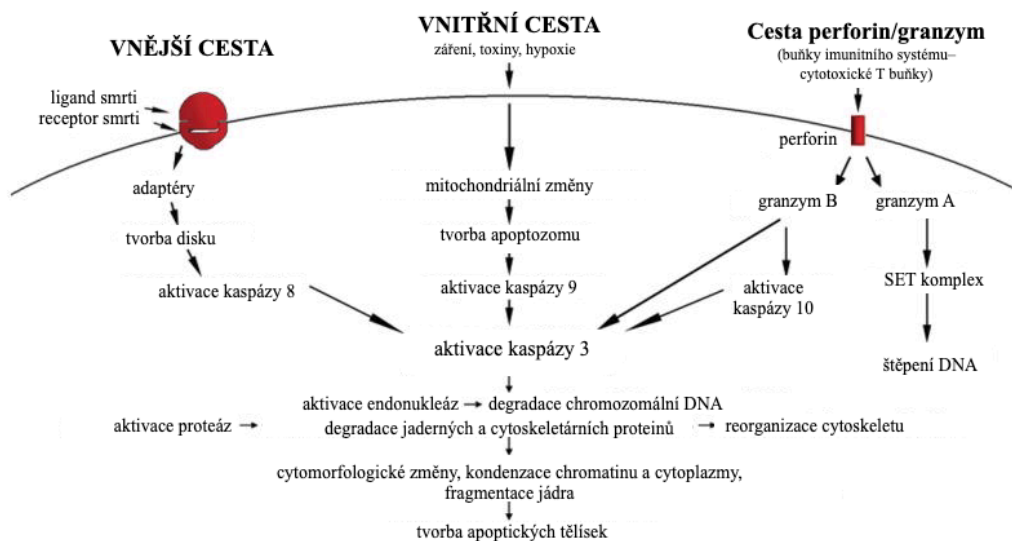
## Funkce ceramidů a CerS



Obrázek 14 – Funkce ceramidů a ceramidsyntáz, převzato a upraveno z [56], CerS – ceramidsyntáza.

### 2.3.1 Role ceramidsyntázy 2 a ceramidů v apoptóze

Apoptóza je řízený proces, při kterém jsou buňky odsouzeny k zániku. Hlavní úlohou apoptózy je udržení tkáňové homeostázy. Změny v apoptotických drahách proto ovlivňují vlastnosti tkání. Nadměrná apoptóza může vést k atrofii tkáně a také k některým neurodegenerativním onemocněním. Naopak snížený zánik buněk apoptózou, nebo její úplné potlačení, může mít za následek rozvoj nádorového bujení [64]. Existují dvě hlavní apoptotické cesty (vnější a vnitřní, viz obr.č.15) [64-66].



Obrázek 15 – Schématické znázornění apoptotických cest. Dvě hlavní dráhy jsou vnitřní a vnější. Další je dráha perforin/granzym. Každá z nich vyžaduje specifické spouštěcí signály. V každé z cest je aktivována vlastní iniciační kaspáza, která aktivuje popravčí kaspázu 3. Granzym A není závislý na kaspáze. Všechny cesty vedou k morfologickým změnám buňky, tvorbě apoptotických tělísek a k samotnému zániku dané buňky. Převzato a upraveno z [66].

Vnější cesta je aktivována prostřednictvím imunitních buněk. Vnitřní apoptóza probíhá na vnější membráně mitochondrií. Dochází k ní při vychýlení rovnováhy proapoptických a protiapoptických faktorů [65]. Mitochondrie hraje klíčovou roli při vnitřní apoptóze. Ztráta integrity vnější membrány vede k apoptotické smrti. S iniciací apoptózy souvisí různé proteiny, které vedou k permeabilitě membrány

tvorbou různých pórů [25,26] Na tvorbě kanálů ve vnější membráně mitochondrií se podílejí také bioaktivní lipidy, ať už ve spojení s proteiny nebo samostatně [67].

Ceramidsyntáza 2 hraje významnou roli v apoptóze, protože se podílí na syntéze ceramidů s velmi dlouhými řetězci. Tím CerS2 ovlivňuje rovnováhu mezi ceramidy s dlouhými řetězci (C16) a s velmi dlouhými řetězci (20-26). Tato rovnováha je klíčová pro osud buňky [68].

Tvorba ceramidových kanálů závisí na hladině volného ceramidu v membráně a struktuře molekuly ceramidu. Zvýšená hladina volného ceramidu v mitochondriích tedy vede ke tvorbě kanálů a uvolňování proteinů. Produkce ceramidů s různou délkou řetězce trvale mění biofyzikální vlastnosti membrán, ty se proto v důsledku vyčerpání ceramidů s dlouhým řetězcem mění [25,61].

Ceramidy ovlivňují mitochondrie v závislosti na transportu ceramidů z ER a plazmatické membrány do mitochondrií a na syntéze ceramidů se podílejí i samotné mitochondrie [20].

### **2.3.2 Podíl ceramidsyntázy 2 na rozvoji nádorů**

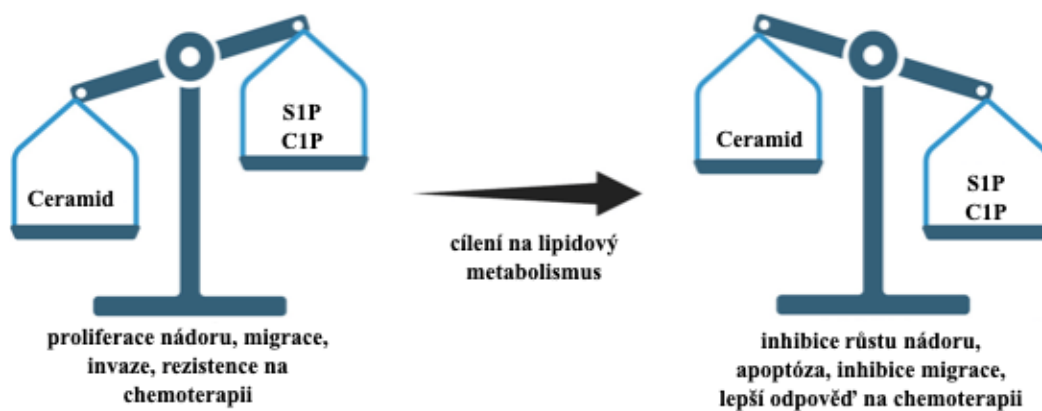
Souvislost CerS2 s rakovinou je složitá. Zpočátku byla CerS2 identifikován jako nádor supresorový protein, ale později byly pozorovány její role jako inhibitor i promotor rakoviny. Malé změny v koncentracích ceramidů mohou vést k onemocnění nebo být jeho důsledkem [69] Pravděpodobně nerovnováha mezi ceramidy s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem ovlivňuje rozvoj rakoviny [27,70].

CerS2 se nachází nejméně v 12 lidských tkáních, s vysokou expresí v ledvinách a játrech, se střední expresí v mozku, srdci, plicích. CerS2 je spojován s nádory prsu [71], jater [72], močového měchýře [73] prostaty [74,75] a dalšími [16,26,40].

Sekvence lidského genu *CERS2* má kompaktní velikost genu, nízký počet intronů a vysoké procento okolních chromozomálních sekvencí obsahujících CpG a Alu oblasti. Nachází se v chromozomálních oblastech, které se replikují na počátku buněčného cyklu [28]. Změna funkčnosti *CERS2* má vliv na rozvoj rakoviny. *CERS2* je nezbytný pro správný mechanismus apoptózy [32].

Buněčný stres vyvolává tvorbu sfingolipidů, které zprostředkovávají komplexní procesy jako je například apoptóza. Rakovinné buňky mohou tyto ochranné procesy narušit dysregulací enzymů zapojených do metabolismu sfingolipidů [76]. Dosud bylo identifikováno více než 30 enzymů podílejících se na metabolismu sfingolipidů. Malé odchylky v koncentracích sfingolipidů mohou vést k onemocnění nebo být jeho důsledkem [77].

Nejdůležitější z těchto sfingolipidů jsou ceramid, sfingosin a jejich fosforylované formy ceramid-1-fosfát (C1P) a sfingosin-1-fosfát (S1P). Intracelulární koncentrace těchto metabolitů udržuje přesnou rovnováhu dějů v buňce [69]. Zatímco ceramid a sfingosin jsou proapoptické, C1P a S1P jsou proliferační a antiapoptické signální molekuly (viz obr. č.16) [78].



Obrázek 16 – Schéma znázornění poměru sfingolipidů ve vztahu k rakovině, S1P – sfingosin-1-fosfát, C1P – ceramid-1-fosfát, převzato a upraveno z [78].

Rakovinné buňky mohou takto podpořit svou proliferaci a metastazování tím, že zvýší produkci sfingolipidů podporující přežití (sfingosin-1-fosfát) a sníží produkci sfingolipidů podporující smrt buněk, jako je ceramid [79].

V nádorových buňkách je hladina ceramidů potlačena, což podporuje několik signálních drah vedoucích k proliferaci a přežívání nádorových buněk [76].

V souvislosti s koncentrací ceramidu má také přítomnost či nepřítomnost CerS2 důležitý vliv na mitochondrie. Nedostatek CerS2 vede k poklesu ceramidů s délkou

mastného acylového řetězce převážně C22 až C24 což má za následek zvýšení množství ceramidů C16, které jsou produkovány CerS5 a CerS6. To může ovlivnit mitochondriální dýchací řetězec přímou inhibicí komplexu IV a následně generovat oxidační stres [80].

Protože CerS jsou klíčovými enzymy sfingolipidového metabolismu, bylo identifikováno mnoho genetických, transkripčních, posttranskripčních a posttranslačních regulačních mechanismů regulujících geny *CERS* v různých patofyziologických procesech [33,81]. *CERS2* je nadměrně exprimován v maligních tkáních prsu u karcinomu močového měchýře je naopak exprimován málo a nízká exprese je spojena s progresí a invazí nádoru [82].

CerS2 produkuje ceramidy s dlouhým řetězcem (C22-24), které jsou spojovány s protinádorovými účinky. Přestože ceramidy jsou spojovány se zastavením buněčného cyklu a indukci apoptózy, nemusí mít vždy jen tyto účinky. Kromě signální molekuly je také ceramid prekurzorem komplexních sfingolipidů v biosyntetických drahách. Ceramid může být modifikován nebo i metabolizován na molekulu S1P, která má naprosto opačné účinky než ceramid [25,69,83].

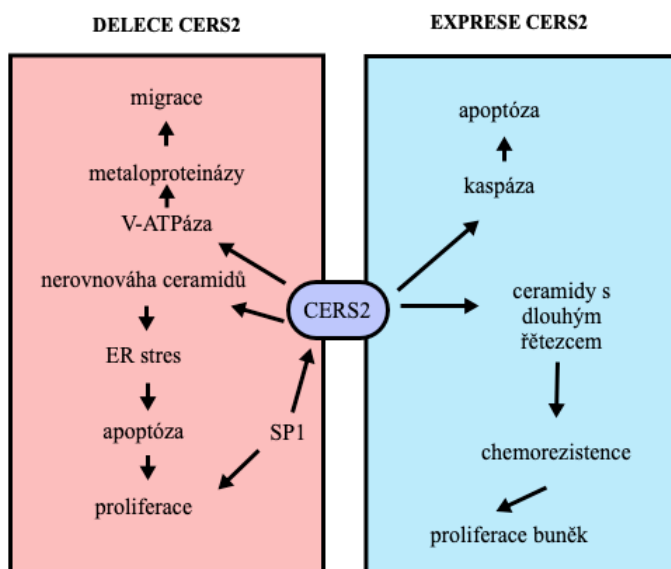
Ve většině onemocnění jsou hladiny proteinu CerS2 regulovány. Je považována za gen potlačující metastazování nádorů u různých druhů rakoviny [16]. V tabulce č.1 je znázorněná pozměněná exprese *CERS2* v patofyziologických procesech.

Tabulka 1 —Expresa *CERS2* u různých nádorů, převzato a upraveno z [54].

	Tkáň	Expresa <i>CERS2</i>
Nádor močového měchýře	Močový měchýř	Snížená
Rakovina prsu	Prsa	Zvýšená
Nádor prostaty	Prostata	Zvýšená/snížená
Hepatocelulární karcinom	Játra	Snížená

*In vitro* bylo zjištěno, že nadměrná exprese *CERS2* zvyšuje proliferaci buněk a tvorbu kolonií, zejména po přidání acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem, ale současně zvyšuje apoptózu [69].

Na obrázku č.17 jsou naznačené mechanismy související s *CerS2* a progresí nádoru. Přítomností proteinu *CerS2* si buňky udržují apoptotickou schopnost. Nerovnováha ceramidů s dlouhým řetězcem může mít za následek proliferaci buněk a jejich chemorezistenci. Nedostatek proteinu snižuje schopnost apoptózy a indukuje proliferaci prostřednictvím signalizace sfingosin-1-fosfátu. Může také vyvolat stres endoplazmatického retikula a apoptózu [32].



Obrázek 17 – Mechanismy související s delecí a nadměrnou expresí *CERS2*, převzato a upraveno z [32], SP1 – sfingosin-1-fosfát, ER stres – stres endoplazmatického retikula.

V-ATPáza je protonová pumpa, důležitý komplex regulující pH v nádorových buňkách. Zajišťuje tvorbu a udržování kyselého extracelulárního prostředí [84].

## ***Hepatocelulární karcinom***

Hepatocelulární karcinom je nejčastějším typem rakoviny jater a žlučových cest. Molekulární patogeneze je velmi komplexní. Expresa *CERS2* je u lidského hepatocelulárního karcinomu snížena na úrovni mRNA a proteinu ve srovnání s normálními játry [85,86].

## ***Nádor močového měchýře***

Karcinom močového měchýře je jeden z častých nádorů močových cest. Navzdory pokrokům zůstává vysoce smrtelnou malignitou. Úroveň exprese *CERS2* ve vzorcích karcinomů močového měchýře je významně nižší než v odpovídajících normálních tkáních. Expresa *CERS2* může souviset s vývojem a progresí lidského karcinomu močového měchýře a může tak být prognostickým ukazatelem tohoto nádoru [87]. Nejvíce maligní buňky lidského karcinomu močového měchýře exprimují nižší množství *CERS2* na úrovni mRNA i proteinu [32,88,89].

## ***Nádor prsu***

Expresa genu *CERS2* (společně s *CERS4*, *CERS6*) je u zhoubných nádorů prsu vysoká. Zvýšení CerS2 (4 a 6) v tkáni karcinomu prsu je pravděpodobně fyziologickou reakcí nádorových buněk s účelem potlačení nerovnováhy mezi ceramidy podporujícími a inhibujícími růst [69]. CerS2 se podílí na migraci a invazi buněk karcinomu prsu [70]. CerS2 má také vliv na pH. Nadměrná exprese může zvýšit extracelulární pH, zatímco snížená exprese může pH snížit. Tedy pH v nádorovém mikroprostředí se zvyšuje, protože CerS2 inhibuje aktivitu protonové pumpy V-ATPázy, která se podílí na hydrofilní cestě protonu přes membránu [90].

Alternativní sestřih *CERS2*, konkrétně forma postrádající hlavní část katalytické TLC domény, podporuje buněčnou proliferaci a migraci u buněk karcinomu prsu podtypu B [82]. Alternativní sestřihy ve sfingolipidových genech mohou totiž přispívat k vysoké koncentraci sfingolipidů v nádorových tkáních. Tato skutečnost je v rozporu s jejich antiproliferační úlohou, která již byla prokázána studiemi *in vitro* a *in vivo* [71].

### ***Nádor prostaty***

Nádor prostaty je jednou z častých příčin úmrtí na rakovinu u mužů. U metastatických prostatických buněčných linií byly hladiny exprese *CERS2* nižší než u těch, které nemetastazují. Umlčení genu *CERS2* může podporovat růst proliferaci, invazi a metastazování buněk karcinomu prostaty [64]. Vyřazení CerS2 může také zvýšit aktivitu V-ATPázy a tím zvýšit extracelulární pH, poté vedoucí k apoptóze nádorových buněk [91,92].

### 3 METODY PRO IZOLACI A ANALÝZU CERAMIDSYNTÁZY 2

Izolace a následná analýza proteinu CerS2 vyžaduje vhodný výběr metod, který závisí typu biologického materiálu, vlastnostech samotného proteinu, a především na cíli experimentu. Je zapotřebí komplexního přístupu a kombinace více analytických metod lišící se principem a účelem. Prvním a nejdůležitějším krokem je příprava vzorku, která závisí na výchozím materiálu. Zdrojem CerS2 mohou být tkáňové řezy, homogenáty, tělní tekutiny, ale i produkty biotechnologické výroby. CerS2 je protein nacházející se v membráně endoplazmatického retikula, proto je nutné danou tkáň nejdříve homogenizovat, buňky lyzovat a dále efektivně izolovat membránové frakce. Například pomocí diferenční centrifugace [93].

V rámci purifikačního procesu je také důležité průběžně sledovat účinnost jednotlivých separačních kroků pomocí metod jako je gelová elektroforéza a Western Blotting. Pomocí nich lze sledovat nejen přítomnost, ale také čistotu proteinu v jednotlivých frakcích.

Pro analýzu je potřebná izolace cílového proteinu z komplexní směsi proteinů. Samotnou izolaci lze provést pomocí imunoprecipitace využitím specifických protilátek proti CerS2 navázané na nosič, dále také pomocí afinitní chromatografie.

Metody analýzy proteinu CerS2 lze rozdělit na kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativní metody zahrnují identifikaci a verifikaci proteinu. Ke kvalitativním metodám patří především Western blotting a imunohistochemie, jež slouží k detekci a potvrzení přítomnosti daného proteinu ve vzorku a také jeho lokalizaci. Dále lze identifikovat CerS2 hmotnostní spektrometrií. Kvantitativní metody poskytují informace o množství CerS2 ve vzorku nebo jeho enzymatické aktivitě.

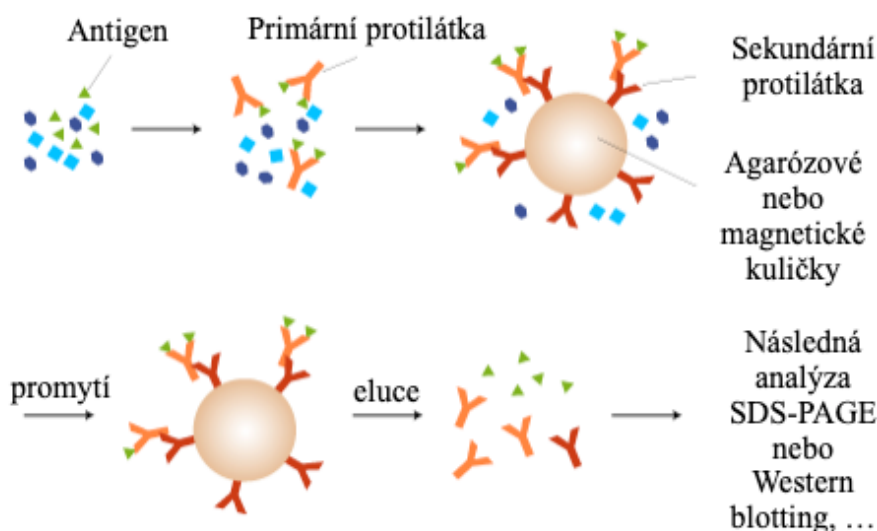
Hlavními kvantitativními metodami jsou kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce pro stanovení relativní exprese mRNA. K přímému stanovení množství ve vzorku slouží hmotnostní spektrometrie s použitím vnitřního standardu. Aktivita enzymu CerS2 může být stanovena pomocí značeného vznikajícího produktu.

## **3.2 Metody pro izolaci ceramidsyntázy 2 z buněk a tkání**

Jak již bylo zmíněno CerS2 je protein nacházející se v membráně ER. Pro extrakci membránových proteinů je třeba použít detergenty (nebo organická rozpouštědla), aby došlo k narušení fosfolipidové dvojvrstvy a protein se tak uvolnil [94]. Detergenty rozpouštějí proteiny tím, že se na jedné straně vážou na hydrofobní části proteinu a na druhé straně interagují s hydrofilními částmi. Typ detergentu a jeho koncentrace závisí na konkrétním typu biologického materiálu a samotném experimentu. Vzhledem k nestabilitě membránových proteinů je také často nezbytné použití účinných purifikačních protokolů prováděných za nízkých teplot [94,95].

### **3.2.1 Imunoprecipitace**

Jedním z možných separačních kroků v izolaci CerS2 je imunoprecipitace. Imunoprecipitace je metoda používaná k izolaci specifického proteinu ze směsi proteinů využívající interakce protilátky s antigenem. Při imunoprecipitaci se nejprve do směsi obsahující antigen přidá protilátka a inkubuje se směs, aby se vytvořily komplexy antigen-protilátka. Následně se vzniklé komplexy inkubují s imobilizovanou sekundární protilátkou proti primární protilátce nebo s kuličkami potaženými proteinem A/G, aby se komplexy adsorbovaly. Kuličky se poté důkladně promyjí a antigen se z nich eluuje kyselým roztokem nebo detergentem. Izolované antigeny (konkrétní proteiny) jsou pak dále analyzovány pomocí elektroforézy a Western blottingu [96,97]. Schéma celého postupu je znázorněno na obrázku č. 18.



Obrázek 18 – Schéma imunoprecipitace, metoda zahrnující kroky: 1. vazbu primární protilátky, tvorba komplexů antigen-protilátka, 2. vazba sekundární protilátky na komplex, 3. promytí a eluce, 4. následná analýza pomocí elektroforézy a Western blottingu. Převzato a upraveno z [97].

Pokud není k dispozici vhodná protilátka, cílová molekula se spojí se značkou a imunoprecipituje se pomocí protilátky proti značce [96,98].

V této studii [82] byly buňky lyzovány v lyzačním pufru. K imunoprecipitaci byly použity agarózové kuličky a primární protilátka proti CerS2. Celá směs byla inkubována přes noc při 4 °C. Dále byly komplexy imunoprecipitované protilátkou anti-CerS2 promyty a následně byl CerS2 eluován a separován na gelu.

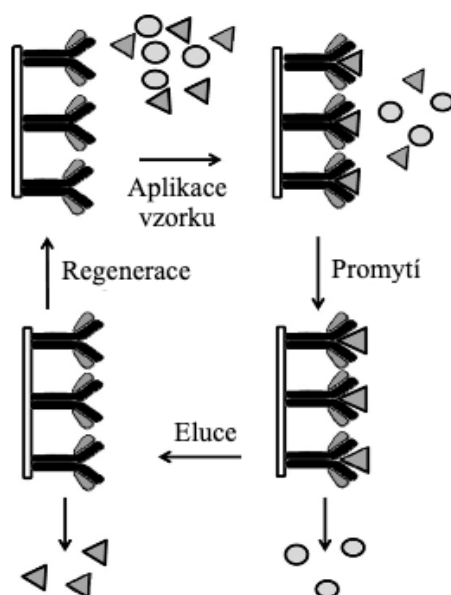
V další studii [99] byl CerS2 imunoprecipitován z myších jater. Také byly použity agarózové kuličky a primární protilátka proti CerS2.

Imunoprecipitační metody umožňují selektivně izolovat CerS2 z buněčných a tkáňových lyzátů.

### 3.2.2 Afinitní chromatografie

Další metodou pro izolaci a purifikaci biologických makromolekul jako jsou enzymy je afinitní chromatografie. Afinitní chromatografie (AC) je forma kapalinové chromatografie. Je metoda založená na specifické vazbě mezi imobilizovaným ligandem (stacionární fází) a vazebným partnerem. Tato vazba

je specifická a reverzibilní. Ligandy mohou být biospecifické, interakce je založena na biologické aktivitě bílkoviny (protilátka a antigen, enzym a substrát, hormon a receptor) nebo skupinově specifické ligandy, které interagují s určitými aminokyselinami na povrchu bílkoviny [100,101]. Tato technika tedy umožňuje purifikaci proteinu na základě jeho biologické funkce nebo individuální struktury [102]. Obecně lze afinitní chromatografii rozdělit do tří fází (viz obr.č.19).



Obrázek 19 – Schéma afinitní chromatografie, převzato a upraveno z [103], první krokem je specifická adsorpce látky z aplikovaného vzorku, dále následuje promytí a odstranění nečistot, posledním krokem je eluce vhodným roztokem.

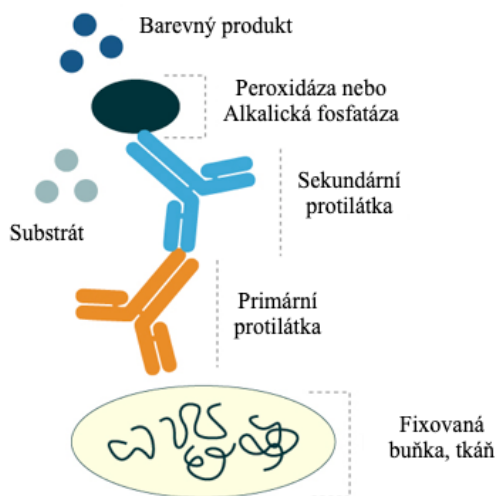
První je specifická adsorpce cílové látky. Pouze požadovaný enzym se váže silně na nosič, nečistoty se nevážou nebo slaběji a nespecificky a jsou tedy během druhé fáze promytí odstraněny. A v poslední eluční části je enzym eluován vhodným elučním roztokem [103]. Když je stacionární fází protilátka jedná se o podkategorii afinitní chromatografie, která se nazývá imunoafinitní chromatografie (IAC). Základem imunoafinitní chromatografie je selektivní vazba protilátek. Tato vazba je výsledkem velkého množství nekovalentních vazeb mezi protilátkou a antigenem [103,104].

### **3.3 Metody analýzy proteinu**

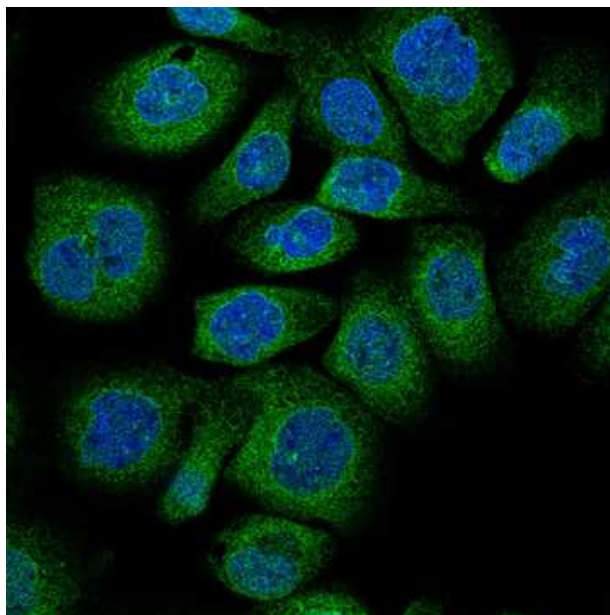
#### **3.3.1 Imunohistochemie**

Imunohistochemie je široce používaná laboratorní metoda, pomocí které lze detekovat specifické antigeny přímo v tkáních nebo buňkách. Lze ji využít i při analýze konkrétního proteinu CerS2 [105]. Umožňuje také sledovat distribuci a lokalizaci CerS2 u různých patologických stavů [105-110].

Tato metoda zahrnuje několik kroků. Prvním je příprava tenkého tkáňového řezu tak, aby byla cílová antigenní struktura přístupná k navázání primární protilátky. Podobně lze fixovat na sklíčko i suspenzi volných buněk. Dalším krokem je vlastní vazba primární protilátky na daný antigen. Pro vizualizaci interakce antigenu s protilátkou pod světelným (fluorescenčním) mikroskopem je nutné označit primární nebo sekundární protilátku. V případě označení primární protilátky (přímá metoda) se jedná o rychlejší jednokrokový proces. Při nepřímé metodě je značkou označena sekundární protilátka. To umožňuje zesílení signálu a použití s primárními protilátkami různého původu. Ke značení se používají různé značky, například fluorescenční nebo také enzymové jako je křenuvá peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. Ty po inkubaci s chromogenním substrátem poskytují barevný produkt [105], (viz obr. č. 20). Na obrázku č.21 je znázorněn CerS2 pomocí imunofluorescenčního barvení. Modře je označené jádro a zeleně CerS2. Imunofluorescenční barvení jasně poukazuje na lokalizaci CerS2 v jaderné membráně a endoplazmatickém retikulu.



Obrázek 20 – Schéma imunohistochemie, vazba primární a sekundární protilátky značené enzymem, převzato a upraveno z [111].



Obrázek 21 – Imunofluorescence. Fluorescenčně značené protilátky zobrazující jednotlivé buňky, buněčné jádro modře, sledovaný protein Cers2 zeleně, lidské buňky linie A431, zvětšení 1000x, převzato z [112].

### 3.3.2 Stanovení genové exprese a proteosyntézy

Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase je molekulárně biologická metoda, která se často používá pro kvantifikaci exprese genu nebo ke studiu genové exprese (mRNA). Funguje na principu převodu RNA na komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkriptázy po níž je cDNA amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce. Proces amplifikace je monitorován v reálném čase díky záznamu fluorescence [113,114]. Hlavní výhodou této techniky je vysoká citlivost, specifická a také nízký limit detekce [114]. Poskytuje možnost detekce a kvantifikace mRNA z malého množství vzorku.

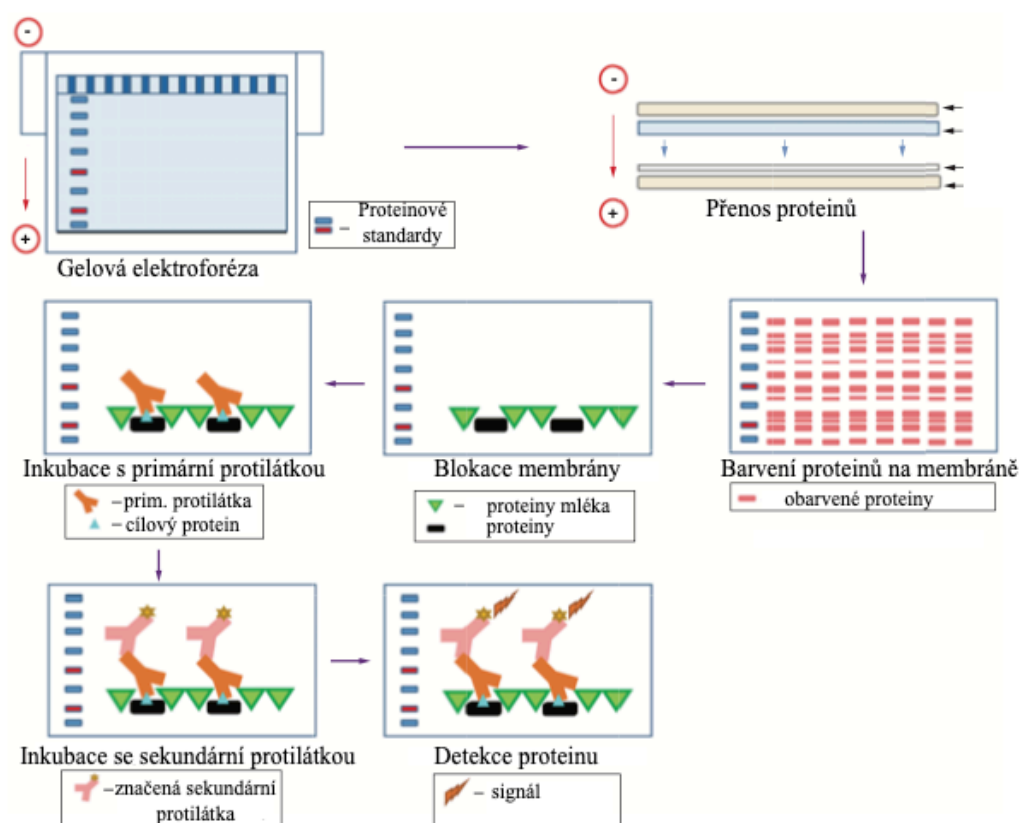
Pomocí ní lze sledovat specifické vzorce exprese genu *CERS2*, hladinu mRNA. Ve studiích [29,106,115,116] byly sledovány exprese *CerS2* u myši. Relativní hladiny exprese *CerS2* byly stanovovány ve všech tkáních. Analýzy exprese ukázaly, že mRNA je nejvíce exprimována v játrech, ledvinách, v mozkové a plicní tkáni. V další studii [117] byl sledován expresní profil *CerS2* během různých stádií vývoje u myši. Zjištění této studie naznačily dynamické změny a přísnou regulaci během vývoje. *CerS2* může tedy mít zásadní roli v postnatálním vývoji a fyziologii jater. Pomocí těchto analýz byla prokázána tkáňová specifita enzymu *CerS2*, klinický význam [118] a také regulace genu *CerS2* [33].

### 3.3.3 Stanovení proteinu

#### *Western blotting*

Western Blotting (WB), nazývaný také immunoblotting, je technika používaná k detekci konkrétního proteinu ze směsi proteinů, například buněčného či tkáňového lyzátu. WB je více krokový postup (viz obr.č.22). Zahrnuje separaci nativních nebo denaturovaných proteinů na základě jejich velikosti pomocí gelové elektroforézy. Rozdělené proteiny jsou následně přeneseny z gelu na membránu vázající proteiny, například nitrocelulózovou (NC) nebo polyvinylidenfluoridovou (PVDF) [119,120]. Tento proces se nazývá blotting – blotování neboli přenos.

Proteiny se na membránu přenesou ve stejném vzoru, v jakém byly na gelu. Membrána je následně blokována pomocí netučného mléka nebo pomocí hovězího sérového albuminu, aby se zablokovaly nespecifické proteiny. Na membráně jsou pak specifické proteiny přístupné k navázání protilátky pro samotnou detekci proteinu. Detekce signálu odráží vazbu antigenu a použité protilátky [120]. WB je oproti běžným sérologickým metodám časově i finančně náročnější, naproti tomu je ale přesnější a udává i informaci o molekulové hmotnosti.



Obrázek 22 – Schéma jednotlivých kroků Western Blottingu. Tato metoda zahrnuje rozdělení proteinů pomocí gelové elektroforézy, přenos proteinu na membránu, blokaci membrány, inkubaci s primární se sekundární protilátkou a samotnou detekci imunokomplexu. Převzato a upraveno z [120].

Stanovení CerS2 pomocí WB se využívá ke zjištění jeho exprese, regulace, ke studiu interakcí a funkce proteinu [33,63,99,121-123]. V této studii [124] byl jaterní homogenát rozdělen pomocí denaturační elektroforézy a přenesen na nitrocelulózovou membránu. Protein byl detekován pomocí polyklonální králičí

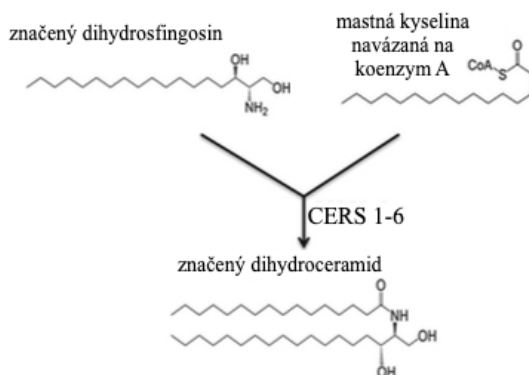
protilátky anti-CerS2. Jako sekundární protilátka byla použita křenová peroxidáza. Cílové proteiny byly detekovány pomocí elektrochemiluminiscence (ECL).

Pro separaci proteinů existují různé typy gelové elektroforézy. Jednotlivé typy se liší v závislosti na požadovaných kritériích separace. Mezi běžně používané elektroforetické metody patří denaturační elektroforéza, nativní elektroforéza a izoelektrická fokusace. Nejvíce používaná je denaturační elektroforéza. Proteiny se při ní ošetřují aniontovým detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS). Tímto procesem se zničí sekundární a terciární struktura. SDS navíc váže proteiny a tím zakrývá jejich chemické náboje, což vede ke vzniku stejně záporně nabitých proteinů. Následující separace proto probíhá výhradně podle velikosti polypeptidových řetězců v polyakrylamidovém gelu (PAGE) [125,126]

## 4 METODY STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU CERAMIDSYNTÁZA 2

Hodnocení aktivity ceramidsyntázy 2 je zásadní pro pochopení její úlohy v metabolismu sfingolipidů a souvisejících onemocnění. Aktivita CerS2 se měří především prostřednictvím její substrátové specifity pro acyl-CoA s velmi dlouhým řetězcem a její regulace pomocí SIP. Lze ji také odvodit z korelace mezi hladinami jeho mRNA a přítomností ceramidů s dlouhými acylovými řetězci ve tkáních, kde je CerS2 vysoce exprimována (viz kapitola stanovení hladiny exprese).

Pro stanovení aktivity ceramidsyntáz existuje více metod. Každá z nich má jiné výhody. Fluorescenční techniky představují efektivní možnost, zatímco hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií nabízí vysokou přesnost a citlivost. Obě jsou založené na podobném principu, na reakci značeného sfingosinu/dihydrosfingosinu (fluorescenčně či deuteriovaného) s mastnou kyselinou navázanou na koenzym A (viz obr.č.23) a následné detekci vzniklého ceramidu/dihydroceramidu [127].



Obrázek 23 – Schéma reakce pro stanovení aktivity ceramidsyntáz, převzato a upraveno z [127].

Extrakce na pevné fázi [128] a sondy na sfingoidní bázi [129] poskytují další možné metody analýzy aktivity CerS2.

## 4.2 Fluorescenční metody

Fluorescenční metody využívají sfingosin nebo dihydrosfingosin značený fluorescenčním činidlem nitrobenzofurazanem (NBD). Jako zdroje enzymu slouží buněčné nebo tkáňové homogenáty. Reakční směs obsahuje NBD značenou sfingoidní bázi a mastnou kyselinu navázanou na koenzym A. Produkty reakce závisí na použitém substrátu. Fluorescenčně značené dihydroceramidy nebo ceramidy lze následně po reakci detekovat a kvantifikovat pomocí tenkovrstvé chromatografie TLC nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC [127,130,131]. Vzniklé produkty lze také izolovat před samotným stanovením pomocí extrakce na tuhé fázi [124, 128].

V těchto studiích [127,129] byl postup následující. Jaterní homogenát byl inkubován se 100  $\mu$ M odtučněné BSA, 1 mM sfinganinu značeného NBD a 5 mM 24:1 mastného acyl-CoA v reakčním objemu 15,5  $\mu$ l. Reakce byla ukončena po 30 minutách přidáním methanolu obsahujícího 1% kyseliny mravenčí. Vzorky byly vloženy na SPE kolonu a promyty vodou obsahující 1% kyseliny mravenčí. Zbytky NBD-sfinganinu byly eluovány v poměru 30:14:6:1 methanol: voda : chloroform : kyselina mravenčí obsahující 10 mM octanu amonného. NBD-ceramid byl eluován a sbírán roztokem 30:14:6:1 methanol : chloroform : voda : kyselina mravenčí obsahující 10 mM octanu amonného. Intenzita fluorescence vzorku byla měřena při vlnových délkách  $\lambda_{\text{ex}} = 465$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 535$  nm. NBD-ceramid byl kvantifikován pomocí standardní křivky.

V této studii [106] byla stanovovaná aktivita ceramidsyntáz byla stanovována také z tkáňových homogenátů pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie (HPTLC). Po homogenizaci tkání byl homogenát inkubován s NBD sfinganinem po dobu 2 minut. Reakce byla zahájena přídatkem C24:1 CoA a ponechána inkubovat 20 min při 37 °C. Reakce byla zastavena a lipidy byly extrahovány pomocí organických rozpouštědel. Organická fáze byla vysušena pod proudem dusíku a opět resuspendována. Lipidy byly naneseny na HPTLC desku. Fluorescence byla následně detekována pomocí LED lampy s excitačním filtrem. Pro kvantifikace fluorescence byl na TLC desky nanesen standard NBD-sfinganinu v různých množstvích.

### 4.3 Stanovení aktivity pomocí hmotnostní spektrometrie

Pro stanovení aktivity CerS pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC) se nejprve připraví extrakty, ať už buněčné či tkáňové obsahující enzym CerS2. Tyto extrakty slouží jako zdroj enzymu pro reakci obsahující deuterovaný dihydrosfingosin nebo sfingosin a substrát mastné kyseliny navázaný na koenzym A. Vzniklý produkt závisí na použitých substrátech [120]. Například dihydroceramid C24:1 (ceramid d18:0/24:1) vzniká reakcí s dihydrosfingosinem (C18:0) a koenzymem A mastné kyseliny C24:1 (nervonoyl-CoA). Reakce se zastaví přidáním čtyř objemů methanolu a po odstranění nerozpustného materiálu se reakční produkty kvantifikují přímo z této reakční směsi pomocí LC-MS/MS [132]. Produkty se ale nemusí vždy analyzovat přímo z reakční směsi, ale také je možné nejprve extrahovat lipidy ze směsi a ty pak dále identifikovat a kvantifikovat [132,133].

Ve srovnání s tenkovrstvou chromatografií nabízí LC-MS/MS separaci a identifikaci blízké příbuzných, ale strukturně odlišných druhů ceramidů. Identifikace je na základě molekulové hmotnosti a elučního času vznikajícího produktu. Konkrétně v této studii [132] byla stanovována aktivita ceramidsyntázy v kultivovaných buňkách, které byly inkubovány s deuterovaným dihydrosfingosinem. Ten byl v buňkách pomocí enzymů ceramidsytáz přeměněn na dihydroceramidy a následně na ceramidy. Tyto buněčné lipidy byly extrahovány a kvantifikovány pomocí LC-MS/MS.

## CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce je zaměřena na studium enzymu CerS2. Tento enzym lipidového metabolismu se podílí na biosyntéze ceramidů, které ovlivňují strukturu a funkci buněčných membrán, signalizaci a apoptózu. CerS2 je spojována s řadou patologických stavů, včetně metabolických onemocnění a nádorových procesů. Tkáně jater a pankreatu mají významnou roli v metabolismu lipidů, a proto jsou vhodným biologickým materiálem pro studium struktury enzymu CerS2 a pro zhodnocení, do jaké míry je tento enzym zapojen do vzniku a proliferace nádorových buněk.

Cílem této práce je navrhnout a experimentálně ověřit protokol pro izolaci CerS2 z vybraných biologických materiálů pro následné strukturní analýzy. Tkáně jater a pankreatu jsou použity jako vhodný biologický materiál. Dostupnost těchto tkání je však v klinické praxi omezená. Z toho důvodu byly pro izolaci CerS2 testovány i snadněji dostupné krevní buňky, konkrétně leukocyty.

Druhým cílem práce je příprava nosiče na bázi magnetických částic, který bude použit k izolaci enzymu CerS2 z tkáňového nebo buněčného homogenátu. Kovalentně vázané specifické protilátky třídy IgG proti CerS2 umožní za optimálních podmínek zachytit molekuly enzymu na povrchu částic. Elucí enzymu z částic lze získat v několika málo krocích čistý enzym pro další studium. Získaná data a výsledky jsou vyhodnoceny pomocí recentních bioinformatických nástrojů.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Seznam laboratorního vybavení

- Aparatura pro diskontinuální elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, CA, USA)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Automatický homogenizátor Precellys Evolution Touch, Cryolysis Evolution (Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francie)
- Blotovací nitrocelulózová membrána (NC), porozita 0,2  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, CA, USA)
- Centrifuga Rotina 420 R (Hettich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen, Německo)
- Centrifugační zařízení MiniSpin Plus (Merck, Eppendorf, Darmstadt, Německo)
- Destilační zařízení pro úpravu čistoty vody (zásobník s redestilovanou vodou) Halios 40 Type 1 (Neptec, Elbtal, Německo)
- Hmotnostní spektrometr Q exactive (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Inkubovaná třepačka Thermoshaker TS 100 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Kapalinový chromatograf Ultimate 3000 (Dionex, USA)
- Kapalinový chromatograf Ultimate 3000 RSLC-nano HPLC (Dionex, USA)
- Kolonky SPE Empore® C18-SD, objem 1 ml (SUPELCO®, Bellefonte, USA)
- Krycí skla Mini-PROTEAN® Short Plates (Bio-Rad, CA, USA)
- Laboratorní třepačka multifunkční Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- Magnetický separátor DynaMag™-2 Magnet (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Mikrokolonky: FEP (fluorovaný ethylenpropylen) kapilára – FEP (1/16" x 0,25 mm ID (VICI - Valco Instruments Co. Inc., Houston, USA), Stacionární fáze Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  EVO C18 100 Å (Phenomenex, Torrance, USA), Filtr

ze skleněných vláken Grade GF/A: 1,6  $\mu\text{m}$ , Whatman (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Mikrozukmavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Minirotátor Bio RS- 24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Miniodstředivka (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- pH metr model SI analytics Lab 855 (Xylem Analytics Germany GmbH, Weilheim, Německo)
- Plynotěsná stříkačka s pevnou jehlou PAL SYSTEM syringe 25  $\mu\text{l}$  a 50  $\mu\text{l}$ , (CTC Analytics AG, Zwingen, Švýcarsko)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Rotátor RS-24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Skla Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 1,0 mm Integrated Spacers (Bio-Rad, CA, USA)
- Svářečka folií Freshie 1762 a plastové fólie (ETA, Praha, ČR)
- Špičky eppendorf GELoader (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Termostat (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, CA, USA)
- Ultrasonikátor UP200H (Hielsches, Teltow, Německo)
- Vakuová odstředivka (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Vortex mixer Wx (VELP Scientifica, Usmate, Italy)
- Zdroj napětí Power-Pac Basic (Bio-Rad, CA, USA)
- Zkumavky na homogenizaci tkání Precellys lysing kit, soft tissue CK 14, hard tissue CK28 (Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, Francie) Zobrazovací systém G:BOX Chemi XX6 (CCD kamera s GeneSys a GeneTools softwary) (Syngene, USA).

### 5.1.1. Software

- Chromeleon v.6.80
- Proteome Discoverer v.2.4
- Microsoft Excel (Office 365)

## 5.2 Seznam chemikálií

- 2x Laemmli Sample Buffer (BioRad, CA, USA)
- 4x Laemmli Sample Buffer (BioRad, CA, USA)
- Aceton (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Acetonitril (Optima LC/MS, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Amoniak vodný roztok (Penta, Chrudim, ČR)
- Bio-Safe Coomassie G-250 stain (Bio-Rad, CA, USA)
- Bromfenolová modř (Lachema, Neratovice, ČR)
- Buněčný lyzát, Ceramide synthase 2 (CERS2) Human Over-expression Lysate (LY405622, OriGene Technologies, Rockville, USA)
- Butanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Citronan sodný (LachNer, Neratovice, ČR)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg, Německo)
- Deoxycholát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Destilovaná voda, redestilovaná voda
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Dithiothreitol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodecylsírán sodný, SDS (Lachema, Neratovice, ČR)
- Dusičnan stříbrný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethylester kyseliny octové (Penta, Chrudim, ČR)
- Formaldehyd (Penta, Chrudim, ČR)
- Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycerol (Penta, Chrudim, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hexakynoželézitan tridraselný (Penta, Chrudim, ČR)
- Hovězí sérový albumin, BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)

- Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydrogenuhlíčitán amonný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydroxid amonný (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid draselný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Jodacetamid, IAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová, MES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina citronová bezvodá (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether-)etraoctová, EGTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina mravenčí, FA (Fluka, New Jersey, USA)
- Kyselina octová (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina trichloroctová TCA (International Enzyme Limited, Berkshire Spojené království)
- Kyselina trifluoroctová, TFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová, HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Magnetické částice Promag® 1 series COOH (PMC1N) Magnetic Microspheres, průměr 0,942 µm, 2,5 % (Bangs Laboratories, Indiana, USA)
- Mannitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Methanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Mravenčan amonný Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid EDAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný, Sulfo-NHS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, TEMED (Bio-Rad, CA, USA)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Odtučněné sušené mléko (Nutristar, Praha, ČR)
- Peroxodisíran amonný, APS (Penta, Chrudim, ČR)
- Protilátka anti-CERS2 (IgG, polyklonální původ králičí, HPA027262, Atlas Antibodies, Stockholm Švédsko)
- Protilátka anti LASS2 (IgG, polyklonální, původ králičí, LS-C753687/235670, LifeSpan BioSciences, Newark, USA)
- Protilátka anti-rabbit IgG (HRP, původ kozí, Jackson Immunoresearch, Ely, Spojené království)
- Sacharóza (SERVA, Heildeberg, Německo)
- Síran železnatý heptahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Standard molekulových hmotností (10–250 kDa) Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, USA)
- Substrát Clarity Western ECL (Enhanced Chemiluminescence, luminol, peroxid vodíku, Bio-Rad, CA, USA)
- Suchý led, nugetky (Linde, Praha, ČR)
- Thiosíran sodný (Sigma, St. Luis, MO, USA)
- Trypsin Sequencig Grade Modified (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 5.2.1 Seznam biologického materiálu

#### Biologicky aktivní látky

- Protilátka anti-CERS2 (IgG, polyklonální, původ králičí, HPA027262, Atlas Antibodies, Stockholm Švédsko)
- Protilátka anti-LASS2 (IgG, polyklonální, původ králičí, LS-C753687/235670, LifeSpan BioSciences, Newark, USA)
- Protilátka anti-králičí IgG (HRP, původ kozí, Jackson Immunoresearch, Ely, Spojené království)

## Vzorky

- Prasečí tkáně: játra, pankreas
- Buněčný lyzát, Ceramide synthase 2 (CERS2) Human Over-expression Lysate (LY405622, OriGene Technologies, Rockville, USA)
- Lidská krev
  - Odebrána dle SLP spolu s informovaným souhlasem dárce.
  - Standardizovaný odběr v odběrovém centru do nesrážlivého činidla K<sub>2</sub>EDTA
- Buffy coat (tenká vrstva ve vzorku centrifugované nesrážlivé krve obsahující bílé krvinky a krevní destičky)
  - Krev odebrána do citrátu sodného (3,8 %), po centrifugaci a oddělení plazmy bylo následně opatrně odebráno množství vrstvy buffy coat tak, aby nedošlo ke kontaminaci erytrocyty. Takto získaný vzorek byl před analýzou uchováván při -80 °C.
  - Množství vrstvy buffy coat 100 µl bylo získáno zhruba z celkového množství lidské krve okolo 10 ml.

## 5.3 Příprava vzorků tkáně, homogenizace, centrifugace

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, vortex, automatický homogenizátor, chlazená centrifuga, homogenizační zkumavky a kuličky pro homogenizaci tkáně, skalpel, pinzeta, Petriho miska, pipety, špičky, zkumavky

Reagencie a roztoky:

- 2% SDS, izolační pufr MIB-L (D-manitol 225 mM, D-sacharóza 75 mM, 0,5 mM EGTA pH 8, Tris-HCl 30 mM pH 6,5, 0,5% BSA), suchý led (nugetky)

Biologický materiál:

- Prasečí játra a pankreas

Pracovní postup:

- Nejprve připravit vzorek tkáně jater/pankreatu.

- Z většího kusu zmrazené tkáně ve skleněné Petriho misce umístěné na suchém ledu (-80 °C) pomocí skalpelu a pinzety odříznout menší kus a rozdělit na malé části.
- Do zkumavky na homogenizaci tkání navážit 15 mg dané tkáně.
- K 15 mg tkáně přidat 650 µl 2% SDS (nebo MIB-L) a dále také kuličky pro homogenizaci (pro pankreas 6 ks větších a pro játra zhruba 0,623 g menších). Objem 2% SDS vždy přepočítat úměrně k naváženému množství tkáně.
- Nejprve vložit do automatického homogenizátoru nugetky suchého ledu, do zásobníku na to určeného, aby se ochladil na 4 °C.
- Vzorky dále 2 minuty při 4 °C homogenizovat, za následujících podmínek:
  - Játra 5600 rpm, 15 s/ 30 s pauza/15 s a to dvakrát.
  - Pankreas 8000 rpm 20 s /30 s pauza/20 s/30 s pauza/20 s.
- Homogenáty tkání následně přenést do 1,5 ml zkumavek a centrifugovat 9000 × g 10 minut při 4 °C.
- Po centrifugaci odebrat supernatant a použít pro následující kroky analýzy.

## 5.4 Gelová elektroforéza 1D-SDS-PAGE

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, vortex, pH metr 1 mm skla, 1 mm hřebínky pro 1D-ELFO (15 jamek), aparatura pro přípravu gelů, pipety, špičky, zkumavky, folie, elektroforetická vana, zdroj napětí

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Ethanol
- Butanol
- Roztok A (30% směs akrylamidu a bisakrylamidu)
- Roztok B (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
- Roztok C (1 M Tris-HCl, pH 6,8)
- Roztok D (10% roztok SDS)
- Roztok E (10% roztok APS)

- TEMED
- 2x (4x) Laemmli Sample Buffer
- Vlastní vzorkový pufr (1x 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 mM DTT, 10% glycerol, 2% SDS, 0,01 % bromfenolová modř)
- Elektrodotový pufr (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3–8,6)
- Standard molekulových hmotností (Precision Plus Protein Dual Color Standards)

Biologický materiál:

- Homogenáty tkání, buněčný lyzát se zvýšenou expresí CerS2, krev, vzorky z afinitní chromatografie

Pracovní postup:

- Připravit roztoky potřebné k přípravě gelů (viz tab. č. 2).
- Roztok E před použitím rozmrazit a protřepat na vortexu.
- Roztok D před použitím vyndat z lednice a vložit do teplé vody.
- Oba roztoky (D a E) před použitím vytemperovat na laboratorní teplotu.

Tabulka 2 – Roztoky pro přípravu gelů pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu.

Roztok	Příprava	Uchování
A	29,2 g akrylamidu, 0,8 g bisakrylamidu do 30 ml destilované vody, nechat 30 minut rozpustit a poté doplnění vodou do 100 ml	4 °C (lednice)
B	18,15 g Tris, úprava pH pomocí 6M HCl na 8,8, doplnit destilovanou vodou na 100 ml	4 °C (lednice)
C	12,1 g Tris úprava pH pomocí 6M HCl na 6,8, doplnit destilovanou vodou na 100 ml	4 °C (lednice)
D	1 g SDS, doplnit destilovanou vodou na 10 ml	4 °C (lednice)
E	0,5 g APS, doplnit destilovanou vodou do 5 ml	-20 °C (mrazák), aliquoty po 250 µl

- Před přípravou gelů 1 mm skla důkladně umýt a očistit pomocí ethanolu od veškerých nečistot.
- Skla následně vložit do stojanu pro přípravu gelů a pevně zajistit.

- Z roztoků A až E a TEMEDU (viz tab. č. 2) následně připravit roztok pro dělicí a zaostřovací gely (viz tab.č.3)

Tabulka 3 – Objemy roztoků pro přípravu 12% dělicího gelu a zaostřovacího gelu.

	12% Dělicí gel (na 4 gely)	Zaostřovací gel (na 4 gely)
Destilovaná voda	6,72 ml	4,2 ml
A	8 ml	1 ml
B	5 ml	-
C	-	0,75 ml
D	0,2 ml	0,06 ml
E	0,2 ml	0,06 ml
TEMED	0,008 ml	0,006 ml

- Pipetovat dle pořadí v tabulce s tím rozdílem, že roztok E přidat až jako poslední.
- První připravit roztok pro 12% dělicí gel, ihned po přípravě promíchat bez přístupu vzduchu a pipetovat se mezi skla.
- Směs převrstvit butanolem a ponechat zhruba 30 minut polymerovat.
- Poté pomocí filtračního papíru odstranit veškerý butanol a následně připravit roztok pro zaostřovací gel stejným způsobem jako pro dělicí gel.
- Ihned po pipetování po horní okraj skel mezi skla vložit 1 mm hřebínek tak, aby pod ním nevznikly bubliny.
- Opět ponechat polymerovat zhruba 15 minut.
- Skla s hotovými gely opláchnout destilovanou vodou a vložit do fólie na navlhčené papírové utěrky, zabalit do papírových utěrek a plastové fólie a v uzavíratelném pytlíku vložit do lednice.
- Gely před použitím skladovat v lednici 4 °C (obvykle přes noc, maximálně 3 dny).
- Před samotnou elektroforézou připravit roztoky vzorků, které budou následně pipetované do jamek gelu.
- Vzorky pipetované do jamek gelu připravit vhodným ředěním se vzorkovým puforem (homogenát tkáně dávkovat v poměru 1:1 se vzorkovým puforem,

vzorky z přípravy nosiče pro afinitní chromatografii a eluce se 4 x koncentrovaným vzorkovým pufrům v poměru 1:4).

- Vzorek ve vzorkovém pufru následně povařit v termobloku 5 minut a před dávkováním do gelu zhomogenizovat.
- Skla s gely opláchnout destilovanou vodou a vyndat hřebínky po umístění skel do elektroforetické vany.
- Jamky v gelu 3x propláchnout elektrodočným pufrům.
- Do jednotlivých jamek gelu následně pipetovat vzorky ve vzorkovém pufru (10-20  $\mu$ l) a standard molekulových hmotností (5  $\mu$ l).
- Elektrodočný pufr doplnit v elektroforetické vaně po rysku, podle počtu gelů, elektroforetickou vanu uzavřít víkem a připojit ji ke zdroji napětí.
- Na přístroji nastavit požadované parametry – 0,03 A (na 1 gel), 180 V a čas na 60 minut (orientačně). Spustit separaci tlačítkem RUN.
- Elektroforézu ukončit až v momentě, kdy čelo doputuje na konec gelu.

## 5.5 Western Blotting

Přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy, špachtle, Petriho misky, savé filtrační papíry o větší tloušťce, nitrocelulóková membrána, nůžky, pinzeta, váleček, odměrné válce, Trans-Blot Turbo

Reagencie a roztoky:

- Transferový pufr (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol, 0,05% SDS)
- Destilovaná voda

Pracovní postup:

- Nejprve připravit transferový pufr smícháním: 3,03 g Tris, 14,4 g glycinu, 0,5 g SDS a 200 ml methanolu, roztok doplnit na 1 l destilovanou vodou.
- Dále vystříhnout nitrocelulóзовou membránu podle šablony.
- Po ukončení elektroforézy oddělit skla pomocí plastové špachtle.
- Dále odstranit zaostřovací část gelu a zbytek gelu přenést do Petriho misky s transferovým pufrům.

- Do dalších Petriho misek s transferovým pufrem namočit silné filtrační papíry a nitrocelulózové membrány.
- Na spodní část kazety Trans-Blot Turbo umístit silný filtrační papír, na něj pomocí pinzety vložit nitrocelulózovou membránu a na membránu gel.
- Na gel vložit opět silný filtrační papír.
- Před uzavřením zkontrolovat, přítomnost bublin mezi gelem a membránou, popřípadě bubliny odstranit.
- Vše přiklopit víkem a kazetu vložit do přístroje.
- Na přístroji zvolit již přednastavený program (12 V, 1,2 A, 70 min).
- Po ukončení přenosu membrány i gely přenést do Petriho misek s destilovanou vodou a promýt (3x5 min).
- Přenos proteinů z gelu na membránu zkontrolovat v následujícím kroku (barvení stříbrem).

## 5.6 Barvení proteinů na nitrocelulózové membráně

Přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy, nitrocelulózová membrána (po přenosu), Petriho misky, pinzety, G:BOX Chemi XX6, alobal

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Barvicí roztok (0,2%  $\text{AgNO}_3$ , 0,8%  $\text{FeSO}_4$ , 2% citrát sodný)
- Odbarvovací roztok (50 mM thiosíran sodný, 15 mM hexakynoželezitan draselný)

Pracovní postup:

- Krátce před barvením membrány připravit roztoky pro barvení a odbarvení membrány.
- Barvicí navážením 0,2 g  $\text{AgNO}_3$ , 0,8 g  $\text{FeSO}_4$  a 2 g citrátu sodného a doplněním destilovanou vodou na celkový objem 100 ml.
- Zkumavku s roztokem překrýt alobalem.

- Odbarvovací roztok navážením 1,24 g thiosíranu sodného a 0,494 g hexakynoželezitanu draselného, opět doplnit na celkový objem 100 ml.
- Membránu po promytí destilovanou vodou převrstvit barvicím roztokem (přibližně 25 ml na 1 membránu).
- Inkubovat membránu v barvicím roztoku zhruba 6 minut za neustálého míchání na třepačce.
- Po inkubaci membránu důkladně promýt destilovanou vodou (3 x 5 min).
- Membránu s obarvenými proteiny následně vyfotit pomocí stanice G:BOX v programu GeneSys.
- Po vyfocení membránu převrstvit odbarvovacím roztokem a ponechat chvíli odbarvovat za stálého míchání, dokud není zcela odbarvena.
- Po tomto kroku navazuje imunochemická detekce.

## 5.7 Imunochemická detekce enzymu CerS2

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, plastové misky, nitrocelulózová membrána (po přenosu), pipety, špičky, 50 ml zkumavka, pinzeta, rotátor, izolepa, nůžky, třepačka, G:BOX Chemi XX6

Reagencie a roztoky:

- PBS-T pufr (pH 7,4) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O, 0,1% Tween 20)
- M HCl
- blokovací roztok (5% odtučněné sušené mléko)
- Primární protilátka (anti-CerS2, králičí)
- Sekundární protilátka (HRP, anti-králičí)
- Chemiluminiscenční substrát Clarity Western ECL

Pracovní postup:

- Nejprve připravit PBS-T pufr a blokovací roztok.
- Na přípravu jednoho litru PBS-T pufru smíchat 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x12 H<sub>2</sub>O a 4 ml 25% Tween 20.
- Upravit pH na 7,4 pomocí 6 M HCl a roztok doplnit na požadovaný objem 1 l.

- Blokovací roztok připravit navážením 10 g sušeného mléka do 200 ml destilované vody a řádně promíchat.
- Po promytí membrán destilovanou vodou membrány 2x promýt PBS-T pufrem.
- Následně blokovat membránu – 1 h s blokovacím roztokem na třepačce.
- V průběhu blokace připravit roztok s primární protilátkou – na jednu membránu do 2ml blokovacího roztoku pipetovat primární protilátku anti-CerS2 dle vhodného ředění udávaného výrobcem.
- Po uplynutí blokace blokovacím roztokem membránu opět dvakrát promýt PBS-T pufrem.
- Po promytí vložit membránu stranou s proteiny dovnitř 50 ml plastové zkumavky a připipetovat 2 ml roztoku s primární protilátkou
- Zkontrolovat přítomnost bublin, zavřít a přilepit na rotátor ve vodorovné poloze tak aby při otáčení roztok omýval postupně celou membránu.
- Inkubovat membránu s primární protilátkou přes noc (cca 17 h) při 4 °C.
- Následující den membránu vložit do plastové misky a promýt čtyřikrát PBS-T pufrem po dobu 5 minut.
- Následně inkubovat membránu 1 h se sekundární protilátkou na třepačce, kdy na 1 membránu 10 ml blokovacího roztoku s konjugátem v doporučeném ředění výrobcem.
- Po inkubaci membránu promýt šestkrát PBS-T pufrem, po dobu 5 minut.
- Na závěr detekovat přítomnost CerS2 pomocí chemiluminiscenční detekce s ECL substrátem.
- Roztok ECL připravit smícháním luminolu a peroxidu vodíku v poměru 1:1. Na jednu membránu dávkovat celkem 3 ml.
- Membránu s ECL substrátem inkubovat v přítmí 1 minutu.
- Po uplynutí inkubace membránu zaznamenat pomocí stanice G:BOX v programu GeneSys pro ECL detekci.
- Pokud je ve vzorku přítomný enzym CerS2, vytvoří se komplex, na který se naváže konjugát, který je pak viditelný na pořízeném záznamu.

## 5.8 Barvení proteinů v gelu pomocí Coomassie Blue

Přístroje a pomůcky:

- Petriho misky, G:BOX Chemi XX6, třepačka

Reagencie a roztoky:

- Destilovaná voda
- Fixační roztok (5% kyselina octová, 50% ethanol)
- Coomassie Blue (Bio-safe Coomassie G-250 stain)

Pracovní postup:

- Gely po elektroforéze nebo po Western blottingu promýt destilovanou vodou.
- Nejprve gely fixovat fixačním roztokem po dobu 30 minut.
- Poté fixační roztok odstranit a následně rehydratovat gely v destilované vodě dalších 30 minut.
- Po rehydrataci gely převrstvit Coomassie Blue (25 ml na 1 gel) a ponechat barvit 1 hodinu.
- Po obarvení odstranit Coomassie blue a gely několikrát promýt destilovanou vodou.
- Obarvené proteiny v gelu následně vyfotit pomocí stanice G:BOX v programu GeneSys.

## 5.9 Barvení proteinů v gelu dusičnanem stříbrným

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, Petriho misky, pipety, špičky, třepačka, G:BOX Chemi XX6

Reagencie a roztoky:

- Fixační roztok (5% kyselina octová, 50% ethanol)
- 10% glutaraldehyd
- Vyvolávací roztok (0,05% kyselina citrónová, 0,04% formaldehyd)
- Ustalovací roztok (5% kyselina octová)
- 9 M Hydroxid sodný
- 26% vodný roztok amoniaku

- 20% AgNO<sub>3</sub>

Pracovní postup:

- Po elektroforéze gel promýt destilovanou vodou.
- Následně převrstvit fixačním roztokem a ponechat fixovat po dobu 30 minut.
- Následně fixační roztok odstranit a gel ponechat 30 minut rehydratovat ve vodě.
- Následně gel 30 minut inkubovat s 10% glutaraldehydem.
- Poté gel promýt destilovanou vodou 6 x 10 minut.
- Připravit barvicí roztok stříbra: 20% AgNO<sub>3</sub> postupně přidávat do roztoku 10 ml destilované vody, 700 µl amoniaku a 120 µl 9M NaOH do změny barvy a poté doplnit destilovanou vodou do 50 ml.
- Po důkladném promytí vodou gel inkubovat 12 minut s barvicím roztokem stříbra.
- Dále po inkubaci gel promýt destilovanou vodou a převrstvit vyvolávacím roztokem.
- Ve vyvolávacím roztoku gel ponechat do doby, než jsou zřetelně viditelné proteiny a dokud je pozadí gelu stále čiré.
- Ihned po zviditelnění proteinů gel převrstvit ustalovacím roztokem a pořídít jeho snímek v zařízení G:BOX Chemi XX6.

## 5.10 Redukce, alkylace a precipitace proteinů

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, pipety, špičky, termoblok, chlazená centrifuga, alobal

Reagencie a roztoky:

- 375 mM Jodacetamid (IAA)
- 100 mM Dithiotreitol (DTT)
- Aceton
- Kyselina trichloroctová (TCA)

Pracovní postup:

### *Redukce a alkylace*

- K 500  $\mu$ l homogenátu tkáně přidat 50  $\mu$ l 100 mM DTT a povařit 10 min.
- Nechat zchladnout na laboratorní teplotu.
- Přidat 15  $\mu$ l 375 mM IAA a inkubovat 30 min ve tmě při laboratorní teplotě.

### *Precipitace*

#### 1) Acetonem

- Požadovaný objem acetonu ochladit na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Do zkumavky k homogenátu tkáně po redukci a alkylaci přidat studený aceton ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ve čtyřnásobném množství precipitovaného vzorku.
- Obsah zkumavky inkubovat minimálně 60 minut při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , (nejlépe přes noc).
- Zkumavku centrifugovat 10 minut při  $8000 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ).
- Po centrifugaci byl odstranit supernatant a aceton ponechat odpařit z neuzavřené zkumavky při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
- Proteinovou peletku rozpustit ve vzorkovém pufru, vortexovat a sonifikovat 3 x 5 min.

#### 2) TCA

- K homogenátu tkáně po redukci a alkylaci přidat (1/2 objemu) 50 % (w/v) TCA ( $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
- Inkubovat na ledu při  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10-20 min.
- Centrifugace  $8000 \times g$   $4^{\circ}\text{C}$  pro peletování proteinu.
- Peletku resuspendovat ve vzorkovém pufru, vortexovat a sonifikovat 3x 5 min.
- Upravit pH před elektroforézou.

#### 3) Precipitace TCA v acetonu

- K homogenátu tkáně po redukci a alkylaci přidat 15% TCA v acetonu ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) v poměru 4:1.
- Inkubovat při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 20-60 min.
- Centrifugace  $8000 \times g$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro peletování proteinu.
- Odstranit supernatant, proteinovou peletku rozpustit ve vzorkovém pufru vortexovat a sonifikovat 3x 5 min.
- Před elektroforézou upravit pH.

#### 4) Precipitace acetonem

- Do zkumavky k homogenátu po redukcii a alkylaci přidat šestinásobek objemu vzorku studeného acetonu (-20 °C).
- Centrifugovat 10 minut při 8000 × g.
- Resuspendovat ve vzorkovém pufru a zahřát 10 min na 70 °C vortexovat a sonifikovat, 3x 5 min.

### **5.11 Izolace CerS2 z krevních buněk**

Přístroje a pomůcky:

- Zkumavky, pipety, špičky, chlazená centrifuga

Reagencie a roztoky:

- Krev, izolační pufr MIB-L (D-manitol 225 mM, D-sacharóza 75 mM, 0,5 mM EGTA pH 8, Tris-HCl 30 mM pH 6,5, 0,5% BSA), 2% SDS, PBS (7,4)

Pracovní postup:

*Z plné krve:*

- K 500 µl krve přidat 1,5 ml izolačního roztoku MIB-L nebo 2% SDS.
- Celkový objem 2 ml centrifugovat, 600 × g, 5 min, 4 °C.
- Odebrat supernatant, ponechat peletku.
- Dále centrifugace 9000 × g 10 min, 4 °C.
- Odebrat supernatant a peletky resuspendovat v 10 µl PBS (7,4).

*Z vrstvy buffy coat:*

- K množství 100 µl buffy coatu přidat 400 µl PBS.
- Přidat opět 1,5 ml izolačního roztoku MIB-L (poměr 1:3).
- Celkový objem 2 ml centrifugovat, 600 × g, 5 min, 4 °C.
- Odebrat supernatant, ponechat peletku.
- Dále centrifugace supernatantu 9000 × g 10 min, 4 °C.
- Odebrat supernatant a obě peletky resuspendovat ve 20 µl PBS (7,4).

## 5.12 Štěpení proteinů v gelu po elektroforetické separaci

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, skalpel, zkumavky, pipety, špičky, temperovaná třepačka (Thermoshaker), odparka (SpeedVac), gel po obarvení Coomassie

Reagencie a roztoky:

- 100 mM Hydrogenuhličitan amonný ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )
- 10 mM Dithiotreitol (DTT)
- 55 mM Jodacetamid (IAA)
- Acetonitril pro LC/MS analýzy (ACN)
- Kyselina mravenčí (FA)
- Kyselina trifluoroctová (TFA)
- Roztok trypsinu (10 ng/ul)
- (200  $\mu\text{l}$  roztoku: 20  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  + 20  $\mu\text{l}$  ACN + 20  $\mu\text{l}$  rozpuštěného trypsinu (zásobní roztok 100 ng/ $\mu\text{l}$ ) + 140  $\mu\text{l}$  destilované vody)
- Deionizovaná voda

Pracovní postup:

- Vybrané části se z gelu obarveného Coomassie pomocí skalpelu vyříznout a přenést do 1,5 ml zkumavek.
- Dále tyto kousky gelu pomocí špičky rozbít na menší kousky (zhruba  $1\text{mm}^3$ ).
- Pro odbarvení k částem gelu přidat 100  $\mu\text{l}$  roztoku (40% ACN v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a nechat 15 minut inkubovat.
- Poté odebrat obarvený supernatant a tento krok opakovat, dokud části gelu nejsou bezbarvé.
- Následně přidat 400  $\mu\text{l}$  ACN, části gelu zbělají, obsah zkumavky promíchat na vortexu a odstranit supernatant.
- Dále přidat 30-50  $\mu\text{l}$  10 mM DTT, promíchat na vortexu a inkubovat 30 minut při 60 °C.
- Po inkubaci odebrat supernatant a opět přidat 400  $\mu\text{l}$  ACN.
- Části gelu zbělají, obsah zkumavky promíchat na vortexu a odstranit supernatant.

- Dále přidat 30-50  $\mu\text{l}$  55 mM IAA, promíchat na vortexu a inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě.
- Opět přidat 400  $\mu\text{l}$  ACN, části gelu zbělají, obsah zkumavky promíchat na vortexu a odstranit se supernatant.
- Proti nadměrné alkylaci části gelu promýt 200  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .
- Opět je přidat 400  $\mu\text{l}$  ACN, části gelu zbělají, obsah zkumavky promíchat na vortexu a odstranit supernatant.
- Následně k částem gelu přidat 30-50  $\mu\text{l}$  roztoku trypsinu (10 ng/ $\mu\text{l}$ ) a nechat ho do částí gelů vsáknout na ledu nebo v lednici.
- Po uplynutí 30 minut zkontrolovat hladinu roztoku.
- Pokud nejsou části gelu zcela ponořené, je nutno přidat roztok trypsinu tak aby tomu tak bylo.
- Nezávisle na předchozím kroku pokračovat v inkubaci v lednici dalších 45 min.
- Po inkubaci přidat 50-100  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .
- Zkumavky se vzorky inkubovat přes noc při 37 °C v třepačce 450 rpm.
- Po inkubaci okyselit 5% TFA a nechat stát 30 min, následně odebrat supernatant do čisté zkumavky.
- Poté přidat k částem gelu 100-200  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a nechat 30 min stát.
- Po inkubaci opět okyselit 5% TFA, následně odebrat supernatant do zkumavky s již předchozím odebraným supernatantem.
- Ověřit kyselost vzorku.
- Supernatant následně vysušit v odparce.
- Takto připravené vzorky odsolit na mikrokolonkách.

### 5.13 Odsolení vzorku na mikrokolonce

Přístroje a pomůcky:

- Mikrokolonky (reverzní fáze C18), laboratorní stojan, plastový stojan pro mikrogradientovou eluci s držáky, závaží (75 g, 150 g), plynotěsná stříkačka 25  $\mu\text{l}$  a 50  $\mu\text{l}$ , pipety, špičky zkumavky

Reagencie a roztoky:

- Methanol

- Acetonitril (ACN)
- Kyselina trifluoroctová (TFA)
- Ultračistá voda

Pracovní postup:

- Nejprve připravit mobilní fáze v celkovém objemu 1 ml dle tabulky č.4.
- Vysušený vzorek rozpustit ve 20  $\mu$ l 2% ACN/0,1% TFA.
- Stříkačka promýt 25  $\mu$ l methanolu.
- Jehlu stříkačky naplněnou methanolem nasadit do širšího konce mikrokolonky (5-10 mm hluboko).
- Stříkačku umístit do držáku, poté nasadit závaží na píst stříkačky.
- Mikrokolonku promýt stejným způsobem také pomocí 25  $\mu$ l ACN.
- Po promytí mikrokolonky do mikrostríkačky nasát 25  $\mu$ l 80% ACN/0,1% TFA a opět nasadit na mikrokolonku a zatížit.
- Mikrokolonku poté před aplikací vzorku ekvilibrovat 10  $\mu$ l 2% ACN/0,1% TFA.
- Následně na kolonku aplikovat vzorek a následně 10  $\mu$ l 2% ACN/0,1% TFA.
- Před tvorbou mikrogradientu stříkačku promýt 40% ACN/0,1% TFA.
- Pro samotnou eluci vzorku pomocí postupného nasátí 4  $\mu$ l jednotlivých mobilních fází dle pořadí jaké je uvedeno v tabulce č.5 vytvořit mikrogradient ve 25  $\mu$ l stříkačce.
- Takto připravenou stříkačku opět připevnit k mikrokolonce a zatížit závažím.
- Eluát sbírat do 0,5 ml zkumavky.
- Takto přečištěné vzorky vysušit a uschovat pro další analýzy (LC-UV, LC-MS).
- Po eluci kolonku promýt 80% ACN/0,1% TFA.

Tabulka 4 – Příprava mobilních fází pro mikrogradientové přečištění peptidů.

Mobilní fáze	Složení		
	Deionizovaná voda [μl]	1% TFA [μl]	ACN [μl]
2% ACN/0,1% TFA	880	100	20
8% ACN/0,1% TFA	820	100	80
16% ACN/0,1% TFA	740	100	160
24% ACN/0,1% TFA	660	100	240
32% ACN/0,1% TFA	580	100	320
40% ACN/0,1% TFA	500	100	400
80% ACN/0,1% TFA	100	100	800

Tabulka 5 – Tvorba mikrogradientu v mikroštrikačce.

Pořadí	Mobilní fáze	Nasátý objem [μl]
1	40% ACN/0,1% TFA	4
2	32% ACN/0,1% TFA	4
3	24% ACN/0,1% TFA	4
4	16% ACN/0,1% TFA	4
5	8% ACN/0,1% TFA	4
6	2% ACN/0,1% TFA	4

## 5.14 Štěpení proteinů v roztoku

Přístroje a pomůcky:

- Předvážky, analytické váhy, zkumavky, pipety, špičky, termoblok, temperovaná třepačka (Thermoshaker), odparka (SpeedVac), centrifuga

Reagencie a roztoky:

- Aceton
- Acetonitril (ACN)
- 4% Deoxycholát sodný (DOC) ve 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- 200 mM DTT
- Ethylacetát saturovaný vodou (EA)
- Hydrogenuhličitan amonný
- 400 mM IAA

- 10% a 1% Kyselina trifluoroctová (TFA)
- Methanol
- Trypsin
- Ultra čistá voda

Pracovní postup:

*Redukce alkylace a srážení proteinů acetonem*

- Odebrat 50  $\mu$ l homogenátu tkáně (odhadované množství: asi 200  $\mu$ g proteinového materiálu) (připraveného dle postupu pro přípravu vzorku tkáně) do 1,5 ml zkumavky.
- Přidat 10  $\mu$ L 200 mM DTT (čerstvě připraveného) a vařit 10 minut v termobloku.
- Nechat vychladnout na laboratorní teplotu.
- Přidat 11  $\mu$ l 400 mM IAA (čerstvě připravené) a inkubovat 30 minut při 25 °C ve tmě (stojan se zkumavkami překrýt alobalem).
- Následně přidat 2  $\mu$ l 200 mM DTT a ponechat 10 minut při laboratorní teplotě.
- Následně přidat 6x objem předem vychlazeného acetonu na -20 °C.
- Inkubovat při -20 °C po dobu nejméně 4 hodiny, nejlépe přes noc.
- Vzorky následně centrifugovat 8000  $\times$  g, 10 minut, 4°C.
- Opatrně vyjmout aceton, aniž by se narušila bílá peletka.
- Dále přidat 6 $\times$  objemů předem vychlazeného acetonu (-20 °C) pro promytí sraženiny, jemně promíchat, opět centrifugovat, 8000  $\times$  g, 10 minut, 4 °C.
- Opatrně vyjmout aceton, aniž by se narušila bílá peletka.
- Peletku ponechat krátce zaschnout při teplotě místnosti v digestoři po dobu 10 min (odpařit aceton bez přesušení).

*Rozpuštění proteinové peletky v DOC*

- Následně přidat 200  $\mu$ l 4% DOC (0,1 g/ml) ve 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- Pro rozpuštění peletky sonifikovat 5 minut v sonikační lázni, vařit 3 minuty.
- Vzorek zředit na konečnou koncentraci 1 % DOC (přidejte 3 objemy = 600  $\mu$ l) pomocí 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .
- Následně přidat 50  $\mu$ l 200 ng/ $\mu$ l trypsinu ve 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .

- Zkontrolovat pH, mělo by být okolo 7,8, když pH je menší než 7, přidat malé množství 1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .
- Inkubovat přes noc při 37 °C.

#### *Odstranění DOC ze vzorku*

- Vzorky dát na led.
- Přidat okolo 50  $\mu\text{l}$  ledově studené 10% TFA.
- DOC se začne srážet a vytvoří se bílá sraženina.
- Zkontrolovat pH – mělo by být pod 3,5.
- Vzorky centrifugovat při  $4000 \times g$ , dobu 10 minut, při 4°C.
- Supernatanty přenést do čistých 2,0 ml zkumavek.
- Sraženinu DOC promýt 100  $\mu\text{l}$  1% TFA a opět centrifugace při  $4000 \times g$ , 10 minut, při 4°C.
- Supernatant přenést do stejných 2 ml zkumavek s dříve již odebraným supernatantem.
- K takto připraveným supernatantům přidat 750  $\mu\text{l}$  EA.
- Řádně vortexovat po dobu 30 s.
- Vzorky centrifugovat 1 minutu.
- Následně opatrně odstranit horní organickou vrstvu EA (bez odstranění spodní vodné vrstvy).
- Ethylacetát přidat a odstranit celkem pětkrát.
- Vzorky vysušit (zbývající vrstva EA) na přibližně jednu třetinu objemu pomocí vakuové centrifugy.
- Poté doředit zbývající objem na původní objem pomocí 0,1% TFA a vzorky přečistit na SPE kolonkách C18.

### **5.15 Odsolení vzorku na SPE kolonce**

Přístroje a pomůcky:

- Pipety, špičky, zkumavky, SPE kolonky, plastová stříkačka, vakuový manifold

Reagencie a roztoky:

- Acetonitril (ACN)

- 1% Kyselina trifluoroctová (TFA)
- Methanol
- Ultračistá voda

Pracovní postup:

- Nejdříve kolonky promýt 300 µl methanolu.
- Připravit eluční roztok 50% ACN/0,1% TFA a 0,1% TFA.
- Následně postupovat dle níže uvedené tabulky č. 6 po jednotlivých krocích následovně:
  - promytí 100% ACN pak 50% ACN/0,1% TFA
  - ekvilibrace 0,1% TFA
  - nanesení vzorku provést 2 x, po prvním nanesení sbírat do zkumavky a nanést znovu
  - vzorek eluovat 2 x pomocí 150 µl
- Po nadávkování roztoku či vzorku nechat roztok protéct kolonkou na vakuovém manifoldu či se protlačit přes kolonku pomocí plastové stříkačky.

Tabulka 6 – Postup přečištění peptidů na Empore SPE C18.

Kroky	Roztok	Empore SPE C18
Promytí	100% ACN	300 µl
	50% ACN/ 0,1% TFA	300 µl
<i>Ekvilibrace</i>	0,1% TFA	300 µl
<i>Nanesení vzorku (2x)</i>	vzorek	300-1000 µl
<i>Promytí</i>	0,1% TFA	2 x 150 µl
<i>Eluce</i>	50% ACN/ 0,1% TFA	2 x 150 µl

## 5.16 Bazická mikrogradientová frakcionace peptidů na reverzní fázi

Přístroje a pomůcky:

- Mikrokolonky (reverzní fáze C18), laboratorní stojan, plastový stojan pro mikrogradientovou eluci s držáky, závaží (75 g, 150 g), plynotěsná stříkačka 25 µl a 50 µl, pipety, špičky, zkumavky

Reagencie a roztoky:

- Acetonitril ACN
- 1% Kyselina trifluoroctová (TFA)
- Methanol
- 200 mM Mravenčan amonný (pH 10)
- Ultračistá voda
- Směsné vzorky ze štěpení v roztoku

Pracovní postup:

Nejprve připravit mobilní fáze v celkovém objemu 1 ml dle tabulky č. 7.

Tabulka 7 – Příprava mobilních fází pro manuální frakcionaci peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí.

	Složení		
<b>Mobilní fáze</b>	<b>Deionizovaná voda [μl]</b>	<b>1% TFA [μl]</b>	<b>ACN [μl]</b>
2% ACN/0,1% TFA	880	100	20
80% ACN/0,1% TFA	100	100	800
<b>Mobilní fáze</b>	<b>Deionizovaná voda [μl]</b>	<b>200 mM HCOONH<sub>4</sub> [μl]</b>	<b>ACN [μl]</b>
2% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	880	100	20
8% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	820	100	80
16% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	740	100	160
24% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	660	100	240
32% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	580	100	320
40% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	500	100	400

- Vysušený vzorek rozpustit ve 20 μl 2% ACN/0,1 % TFA.
- Stříkačku promýt nasátím 25 μl methanolu.
- Jehlu stříkačky naplněnou methanolem nasadit do širšího konce mikrokolonky (5-10 mm hluboko).
- Stříkačku umístit do držáku, poté nasadit závaží na píst stříkačky.
- Kolonku promýt takto také pomocí ACN a 80% ACN/0,1% TFA.
- Mikrokolonku poté před aplikací vzorku ekvilibrovat 10 μl 2% ACN/0,1% TFA.
- Následně na kolonku aplikovat vzorek a následně 10 μl 2% ACN/0,1% TFA.
- Pro ekvilibraci kolonky na bazické prostředí a zároveň eluci kyselých proteinů aplikovat 25 μl 2% ACN/200 mM HCOONH<sub>4</sub>. Sbírat jako frakci č. 1.

- Před tvorbou mikrogradientu stříkačku promýt 40% ACN/200 mM HCOONH<sub>4</sub>.
- Pro samotnou gradientovou eluci vzorku nasát po 8 µl jednotlivých mobilních fází dle pořadí, jak je uvedeno v tabulce č. 8 a vytvořit mikrogradient v 50µl stříkačce.

Tabulka 8 – Tvorba mikrogradientu v mikrostríkačce, pro manuální frakcionaci peptidů na reverzní fázi v bazickém prostředí.

Pořadí	Mobilní fáze	Nasátý objem [µl]
1	40% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	8
2	32% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	8
3	24% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	8
4	16% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	8
5	8% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	8
6	2% ACN/20 mM HCOONH <sub>4</sub>	8

- Takto připravenou stříkačku opět připevnit k mikrokolonce a zatížit závažím.
- Eluáty o objemu 3 µl postupně sbírat do 0,5ml zkumavek. Celkem odebrat 16 frakcí (č. 2-17). Vzorky vysušit a uschovat pro další analýzy (LC-UV, LC-MS).
- Po eluci kolonku promýt 80% ACN/0,1% TFA.

### 5.17 Imobilizace IgG na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (ProMag-COOH)

Přístroje a pomůcky:

- Rotátor, automatické pipety, špičky, zkumavky, vortex, ultrazvuková lázeň, analytické váhy, magnetický separátor

Reagencie a roztoky:

- 0,1 M MES pufr (pH 6)
- 0,1 M HEPES pufr (pH 7,4)
- 0,1 M TRIS pufr (pH 7)
- 0,039 M EDAC v MES pufru

- 0,0057 M Sulfo-NHS v MES pufru
- Magnetické částice Promag®1 series COOH (PMC1N) průměr 0,942  $\mu\text{m}$ , 2,5% roztok = 40  $\mu\text{l}$  roztoku magnetických částic = 1 mg částic
- Roztok s protilátkami antiCerS2 IgG

Pracovní postup:

- Odebrat jeden miligram magnetických částic Promag®1 series COOH (PMC1N) = 40  $\mu\text{l}$  pořádně resuspendovat a 3 x promýt 2 ml MES pufru (vortex, 1 minuta ultrazvuková lázeň).
- Následně částice resuspendovat v 1ml MES pufru.
- Vložit zkumavku do magnetického separátoru, odebrat supernatant a k částicím přidat 200  $\mu\text{l}$  MES pufru.
- Poté navážit 5 mg S-NHS a rozpustit ve 400  $\mu\text{l}$  MES pufru.
- Dále navážit 30 mg EDAC.
- Magnetické částice resuspendovat (vortex a ultrazvuková lázeň 2 min).
- EDAC rychle rozpustit ve 400  $\mu\text{l}$  MES pufru a ihned přidat k magnetickým částicím.
- Obsah zkumavky promíchat a přidat připravený roztok S-NHS.
- Opět obsah zkumavky promíchat na vortexu a s tímto reakčním roztokem ponechat částice inkubovat na rotátoru za pomalých otáček 30 minut při laboratorní teplotě.
- Po inkubaci odstranit supernatant a částice jsou dvakrát promýt 1 ml MES pufru (vortex a ultrazvuková lázeň 1 min).
- Po odstranění supernatantu částice resuspendovat v 500  $\mu\text{l}$  HEPES pufru.
- Dále připravit roztok s IgG protilátkou anti-CerS2.
- 5  $\mu\text{g}$  protilátky přidat do HEPES pufru a doplnit na finální objem 500  $\mu\text{l}$ .
- Roztok protilátek v HEPES pufru přidat k magnetickým částicím v HEPES pufru.
- Poté částice ponechat inkubovat na rotátoru při pomalých otáčkách přes noc v lednici (4 °C).
- Po inkubaci odebrat supernatant a ponechat ho pro další analýzu (vazebná frakce).

- Částice následně promýt 2 x 2 ml Tris, 2 x 2 ml MES a 1 x 2 ml HEPES.
- Částice poté skladovat ve 200  $\mu$ l Tris při 4 °C.

## 5.18 Izolace CerS2 částicích na ProMag-anti-CerS2 IgG

Přístroje a pomůcky:

- Rotátor, automatické pipety, špičky, vortex, ultrazvuková lázeň, analytické váhy, magnetický separátor

Reagencie a roztoky:

- Částice ProMag s imobilizovanými protilátkami proti CerS2
- PBS pufr (pH 7,4)
- PBS-T pufr (pH 7,4)
- 1% deoxycholát (DOC) v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- 0,1 M glycinový pufr (pH 2,5)
- 1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 11)
- 1 M Tris (pH 9,4)
- Buněčný lyzát, homogenát tkáně

Pracovní postup:

- Nejdříve magnetické částice s imobilizovanými protilátkami promýt PBS pufr (3-5x), vortex a ultrazvuková lázeň 1 min.
- Následně částice přenést do 200  $\mu$ l PBS, vortex a ultrazvuková lázeň 1 min.
- K částicím přidat 10 x naředěný buněčný lyzát/jaterní homogenát ve 200  $\mu$ l PBS.
- Inkubovat přes noc na rotátoru při 4 °C.
- Po ukončení inkubace odebrat supernatant a uschovat pro další analýzu.
- Částice dále 3-5x promýt studeným PBS na rotátoru 3 minuty při pomalých otáčkách.

*Kyselá eluce*

- Přidat 100  $\mu$ l glycinového pufru, vortex a 10 min třepačka (1000 rpm/ 37 °C)
- Následně odebrat supernatant a uschovat pro další analýzu.

- Eluci opakovat celkem 3-5 x.
- Pak úprava pH pomocí Tris o pH=9,4 (5 µl na 100 µl roztoku)

*Eluce DOC v NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>*

- Přidat 100 µl 1% DOC v NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- 1 min vortex, 3 min UZ, 5 min třepačka (1000 rpm, 37 °C), 1 min UZ, 5 min třepačka (1000 rpm, 37 °C), 1 min UZ
- Odebrat supernatant, uschovat pro další analýzu
- Eluci opakovat 3-5 x.

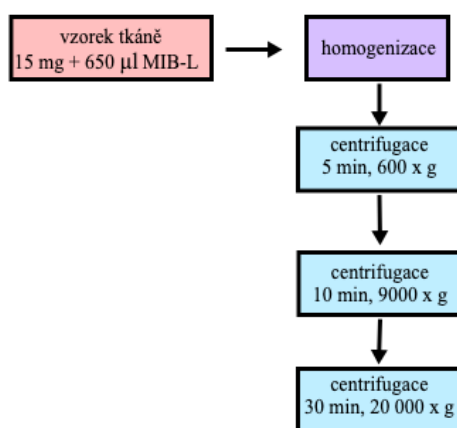
*Zásaditá eluce 1M NH<sub>4</sub>OH*

- Přidat 100 µl 1M NH<sub>4</sub>OH
- 1 min vortex, 3 min UZ, 5 min třepačka (1000 rpm, 37 °C), 3 min UZ, 10 min třepačka (1000 rpm, 37 °C), 1 min UZ
- Odebrat supernatant a uschovat pro další analýzu
- Eluci opakovat 3-5 x.

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Izolace ceramidsyntázy z tkání

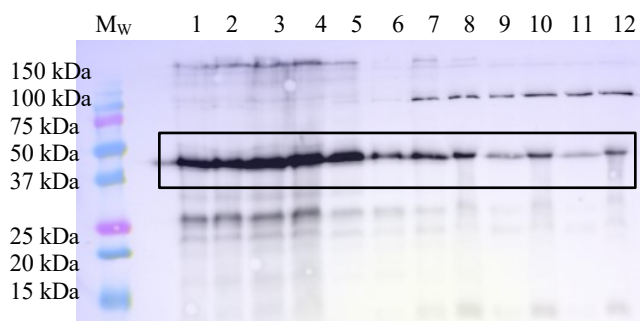
Prvním úkolem experimentální části této práce bylo zavést metodu pro izolaci CerS2 z tkání (játra, pankreas). Nejprve byly vzorky tkání homogenizovány v izolačním pufru MIB-L (Microsome isolation buffer – liver) a bylo postupováno podle postupu uvedeného ve článku [93], který popisuje izolaci endoplazmatického retikula z myších jater. Stručné schéma postupu je znázorněno na obrázku č. 24.



Obrázek 24 – Centrifugační protokol 600 g 5 min, 9000 g 10 min a 20000 g 30 min.

V prvním kroku centrifugace ( $600 \times g$ , 5 min) homogenátu tkáně, se na dně zkumavky usazují jádra, neporušené buňky a zbytky buněk. Ve druhém kroku ( $9000 \times g$ , 10 min) se oddělí ER (supernatant) od surových mitochondrií, které lze pozorovat jako peletku. Po odstředění supernatantu z předchozího kroku při  $20\,000 \times g$  po dobu 30 minut se vytvoří peleta obsahující především plazmatickou membránu a další membrány i ER.

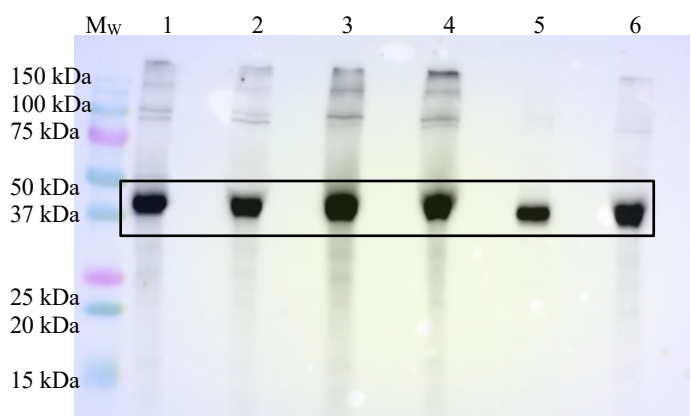
Po každém kroku centrifugace byla schována peletka a alikvot supernatantu pro další analýzy. Bylo ověřeno, jaký vliv na čistotu a stabilitu izolovaných proteinů má přidávek hovězího sérového albuminu do MIB-L pufru. Všechny dílčí kroky izolace (frakce) byly ověřovány pomocí SDS-PAGE, barvení Coomassie Blue, stříbrem a také pomocí WB s imunochemickou detekcí proteinu CerS2. Všechny frakce byly zhodnoceny na přítomnost enzymu CerS2 (protein o  $M_w$  45,47 kDa). Tato analýza byl několikrát opakována.



Obrázek 25 – Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň jater. Ve vymezeném rámečku lze pozorovat přítomnost proteinu CerS2 v jednotlivých frakcích.

$M_w$  – marker molekulových hmotností, 1 – peletka  $600 \times g$  MIB-L bez BSA, 2 – peletka  $600 \times g$  s BSA, 3 – peletka  $9000 \times g$  bez BSA, 4 – peletka  $9000 \times g$  s BSA, 5 – peletka  $20000 \times g$  bez BSA, 6 – peletka  $20000 \times g$  s BSA, 7 – supernatant  $600 \times g$  bez BSA, 8 – supernatant  $600 \times g$  s BSA, 9 – supernatant  $9000 \times g$  bez BSA, 10 – supernatant  $9000 \times g$  s BSA, 11 – supernatant  $20000 \times g$  bez BSA, 12 – supernatant  $20000 \times g$  s BSA.

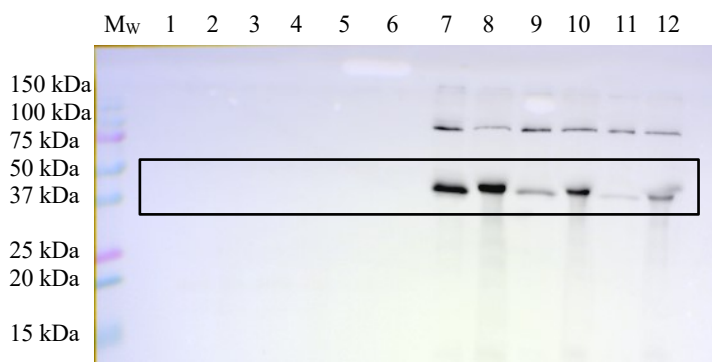
Ve vymezeném rámečku (viz obr.25) byly pozorovány proužky, odpovídající dle  $M_w$  a reaktivity se specifickou protilátkou proteinu CerS2, v jednotlivých frakcích z izolace. V oblasti očekávané molekulové hmotnosti byly nejintenzivnější proužky z frakcí 1-5 tedy z peletek. Konkrétně nejintenzivnější signál byl ve frakcích 3 a 4, v peletce  $9000 \times g$ . Ve frakcích 7-12 (supernatantech) signál odpovídající proteinu CerS2 nebyl tak intenzivní a jsou zde viditelné proužky o molekulové hmotnosti okolo 100 kDa, z toho bylo možné usoudit, že se může jednat o dimery CerS2 anebo jiné proteinové interakce s CerS2.



Obrázek 26 –Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň jater, peletky. Ve vymezeném rámečku lze pozorovat přítomnost proteinu CerS2 v jednotlivých frakcích.

Mw – standard molekulových hmotností, 1– peletka 600 × g bez BSA, 2 – peletka 600 × g s BSA, 3 –peletka 9000 × bez BSA, 4 – peletka 9000 × g s BSA, 5 – peletka 20000 × g bez BSA, 6 – peletka 20000 × g s BSA

Ve vymezeném rámečku (viz obr. č. 26) byl opět vidět proužek odpovídající dle Mw a reaktivity se specifickou protilátkou proteinu CerS2 ve všech jednotlivých frakcích z izolace. Nejintenzivnější signál poskytovaly frakce 3 a 4 tedy peletky 9000 × g. Dále bylo možné pozorovat nepatrný rozdíl mezi jednotlivými proužky ve tvaru (mezi 1 a 2, 3 a 4 a 5 a 6 frakcí). Rozdíl byl způsoben přítomností či nepřítomností BSA v izolačním pufru. Z toho bylo možné vyvodit, že homogenizace v izolačním pufru bez BSA má malý vliv na tvar proužku při elektroforéze a výsledné imunochemické detekci CerS2. Z těchto výsledků vyplývalo, že přítomnost BSA neměla zásadní vliv na výsledky a také, že jeho přítomnost v izolačním pufru pro izolaci CerS2 není nutná.

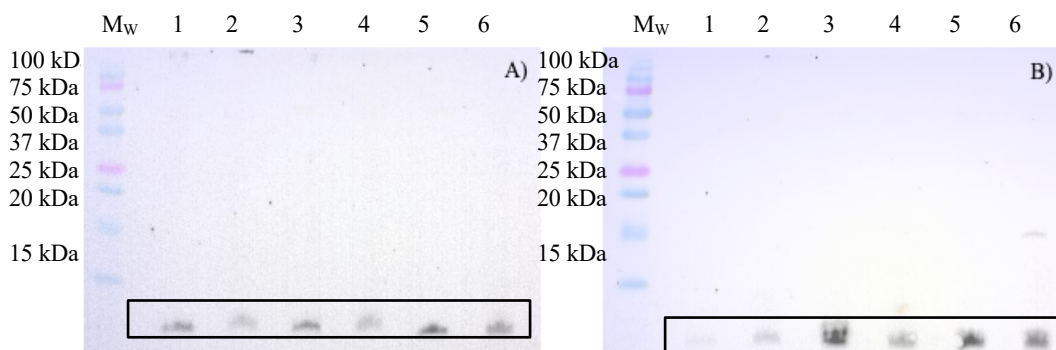


Obrázek 27 – Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň pankreatu (1-6) tkáň jater (7-8), supernatanty. Ve vymezeném rámečku lze pozorovat přítomnost proteinu CerS2 v jednotlivých frakcích.

$M_w$  – standard molekulových hmotností, 1 – supernatant  $600 \times g$  MIB-L bez BSA, 2 – supernatant  $600 \times g$  s BSA, 3 – supernatant  $9000 \times g$  bez BSA, 4 – supernatant  $9000 \times g$  s BSA, 5 – supernatant  $20000 \times g$  bez BSA, 6 – supernatant  $20000 \times g$  s BSA, 7 – supernatant  $600 \times g$  MIB-L bez BSA, 8 – supernatant  $600 \times g$  s BSA, 9 – supernatant  $9000 \times g$  bez BSA, 10 – supernatant  $9000 \times g$  s BSA, 11 – supernatant  $20000 \times g$  bez BSA, 12 supernatant  $20000 \times g$  s BSA.

Ve vyznačeném rámečku (viz. Obr. č.27) bylo možné pozorovat proužek odpovídající dle  $M_w$  a reaktivity se specifickou protilátkou proteinu CerS2. Tento proužek byl pozorován pouze ve frakcích získaných izolací z jaterní tkáně, nikoliv ve frakci získané z pankreatické tkáně. Okolo molekulové hmotnosti 100 kDa bylo možné opět pozorovat specifický signál odpovídající proteinu CerS2, jak bylo již zmíněno výše mohlo by se jednat o dimer či jinou molekulovou interakci s CerS2. Nejsilnější signál byl ve frakcích 7 a 8 což korespondovalo s výsledkem u peletek (s obr. č. 26), kde byl nejsilnější signál v peletkách  $9000 \times g$ , které vznikají centrifugací supernatantu z předchozího kroku  $600 \times g$ .

Po nezdařilém pokusu o izolaci CerS2 a z hodnocení vlivu BSA v izolačním pufru z tkáně pankreatu byl stejný postup opakován znovu pouze pro tkáň pankreatu.

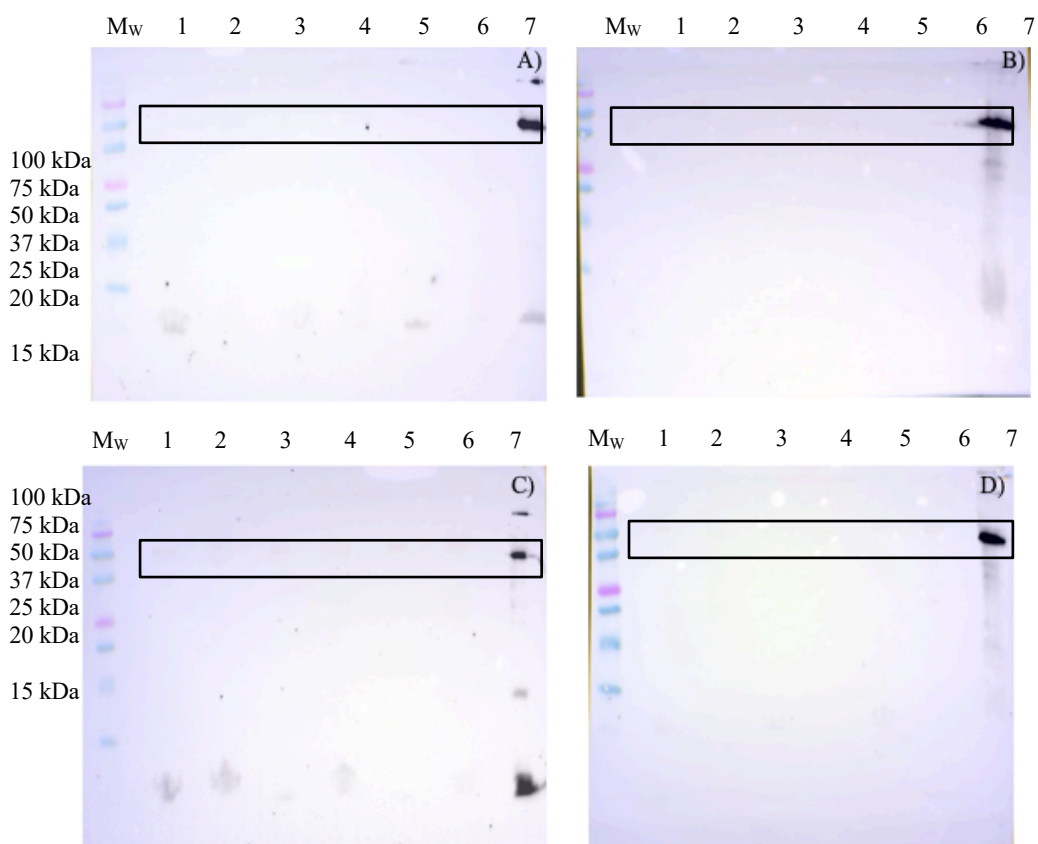


Obrázek 28 – Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň pankreatu A) supernatanty, B) peletky.

$M_w$  – standard molekulových hmotností, 1 – 600 × g MIB-L bez BSA, 2 – 600 × g s BSA, 3 – 9000 × g bez BSA, 4 – 9000 × g s BSA, 5 – 20000 × g bez BSA, 6 – 20000 × g s BSA.

V očekávaných oblastech molekulové hmotnosti mezi 37 a 50 kDa (viz obr. č. 28) nebyla zřetelná přítomnost proužku odpovídajícímu proteinu CerS2 patrná. Úplná absence specifického proužku pro CerS2 naznačovala významnou degradaci sledovaného proteinu. V oblasti menších  $M_w$  byly viditelné specifické proužky (označené rámečkem), které mohly odpovídat fragmentům degradovaného enzymu CerS2. V průběhu přípravy vzorku a izolace tedy nejspíše docházelo k degradaci analyzovaného proteinu.

Následně byl stejný postup opakován znovu se stejnými, ale čerstvě připravenými izolačními roztoky MIB-L s BSA a bez BSA (A a B) a také s jinou částí tkáně pankreatu (C a D). Pro kontrolu správného postupu všech kroků analýzy byl do poslední jamky zařazena frakce z izolace tkáně jater, peletka 9000 × g.

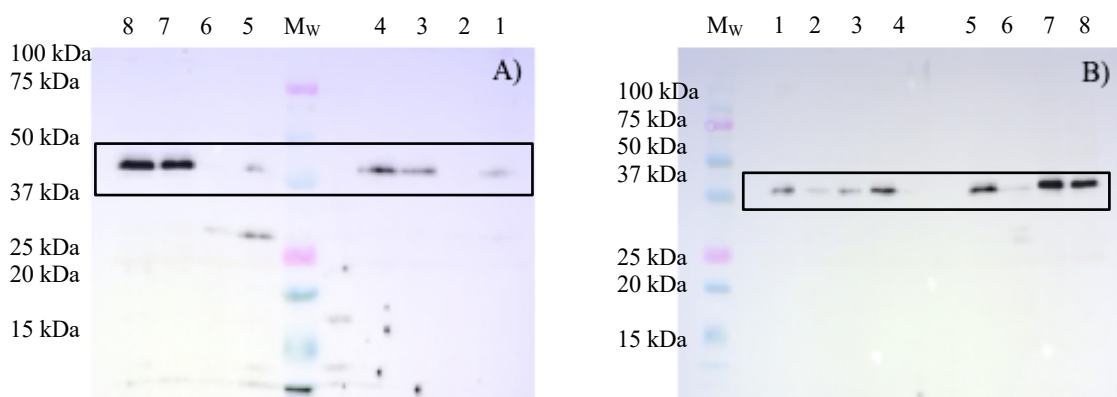


Obrázek 29 – Western blot analýza frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – zhodnocení vlivu BSA v pufru MIB-L, tkáň pankreatu A), C) supernatanty, B), D) peletky.

M<sub>w</sub> – standard molekulových hmotností, 1– 600 × g MIB-L bez BSA, 2 – 600 × g s BSA, 3 – 9000 × g bez BSA, 4 – 9000 × g s BSA, 5 – 20000 × g bez BSA, 6 – 20000 × g s BSA, 7) kontrola, tkáň jater peletka 9000 × g.

Ve vyznačených rámečcích (viz obr. č. 29) byl viditelný proužek odpovídající sledovanému proteinu CerS2 pouze v kontrolním vzorku tkáně jater. V oblasti menších M<sub>w</sub> u vzorků frakcí získaných z peletek byly opět viditelné specifické proužky. Z toho bylo možné usoudit, že by se mohlo opětovně jednat o degradační fragmenty CerS2. Z výsledků lze usuzovat, že degradační enzymy, které jsou jak v tkáni jater [134], tak hlavně v tkáni pankreatu [135] přítomny, způsobují masivní degradaci všech extrahovaných proteinů. Tato degradace byla pozorována ve všech analyzovaných frakcích.

V další sérii experimentů byly testovány další roztoky, ve kterých byla provedena homogenizace odpovídající tkáně. Dále bylo vzato v úvahu, že enzym CerS2 je membránový enzym [39] a přidavek detergentu může vést k jeho uvolnění z membránových struktur a snadnější izolaci [95]. Proto byl jako homogenizační roztok použit detergent SDS o koncentraci 0,5%, 1%, 2% a 4% (viz obrázek č. 30). Další výhodou je, že SDS jako účinný detergent [136] může velice efektivně denaturovat degradační enzymy přítomné ve vzorku. Po této změně roztoku pro homogenizaci tkáně v SDS, byl změněn také postup centrifugace. Centrifugací nevznikaly peletky, jako tomu bylo v předcházejících experimentech, ale vytvářel se zřetelný sediment. Byl proto místo třech centrifugačních kroků ponechán v postupu pouze jeden (pouze  $9000 \times g$  10 min), který v předchozích experimentech poskytoval nejintenzivnější signál. Toto vedlo ke zjednodušení a zkrácení počtu separačních kroků.



Obrázek 30 –Western blot analýza izolačních frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – Změna roztoku pro homogenizaci, různé koncentrace SDS, tkáň pankreatu, po homogenizaci a centrifugaci,  $9000 \times g$  primární protilátka A) LS-Bio, B) Atlas Antibodies. Ve vymezených rámečcích lze pozorovat přítomnost proteinu CerS2 v jednotlivých frakcích.

Mw – standard molekulových hmotnost, 1 – 0,5% SDS sediment, 2 – 1% SDS sediment, 3 – 2% SDS sediment, 4 – 4% SDS sediment, 5 – 0,5% SDS supernatant, 6 – 1% SDS supernatant, 7 – 2% SDS supernatant, 8 – 4% SDS supernatant.

Ve vyznačených rámečcích byl viditelný proužek, který dle polohy na gelu ( $M_w$ ), také reaktivity se specifickou protilátkou, odpovídající proteinu CerS2 téměř ve všech frakcích. Nejintenzivnější signál byl pozorován v obou případech ve frakcích 7 a 8, v supernatantech po homogenizaci tkáně s roztoky 2% a 4% SDS. Podle předpokladu byl specifický proužek odpovídající CerS2 více intenzivní ve frakcích supernatantu než v peletkách.

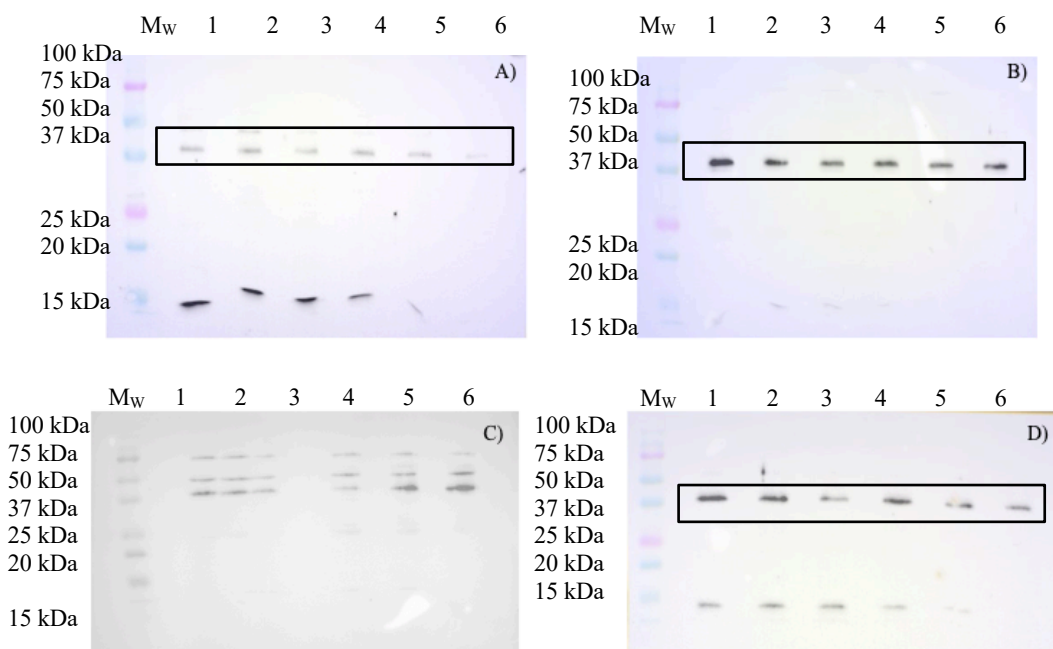
Na těchto dvou snímcích (obr.č.30) byl viditelný také rozdíl mezi dvěma použitými primárními protilátkami proti CerS2. První použitá protilátka byla proti celé sekvenci proteinu CerS2 (membrána A, výrobce LS-Bio), ta druhá použitá protilátka byla jenom proti určité části N-konce proteinu CerS2 (membrána B, výrobce Atlas antibodies). Protilátka proti celé sekvenci CerS2 reagovala i s proteiny o nižší  $M_w$  než je  $M_w$  CerS2 mohlo by se jednat o degradované proteiny CerS2. Zatímco protilátka proti pouze určité části CerS2 reagovala pouze s nedegradovanými proteiny CerS2.

Izolace CerS2 z tkáně za použití SDS jako homogenizačního roztoku byla úspěšná. Jako nejvhodnější se ukázala 2% a 4% SDS. Z obrázku č. 30 A) byla opětovně patrná přítomnost proužku odpovídající dle  $M_w$  a reaktivity se specifickou protilátkou sledovanému proteinu CerS2 více ve frakcích supernatantu než ve frakcích peletek oproti centrifugaci v MIB-L pufru.

Dalšími experimenty bylo zjišťováno minimální množství homogenátu tkáně, potřebného k úspěšné izolaci CerS2 z tkání a detekci pomocí metody WB s imunochemickou detekcí pro protein Cers2. Pomocí ředící řady byla zkoumána linearita v rozsahu 2-10  $\mu$ l objemu homogenátu tkáně aplikovaného na gel. Homogenáty tkání byly připravené stejným postupem podle předchozí úspěšné izolace homogenizace ve 2% SDS, centrifugace 9000  $\times$  g, 10 min. Vždy byly zpracovány celkem 4 vzorky tkání. Každá membrána odpovídá jednomu vzorku tkáně. Před nadávkováním vzorků do gelu byly vzorky naředěny 2% SDS dle tabulky č. 9 pak povařeny v poměru 1:1 ve vzorkovém pufru obsahujícího DTT a dávkovány do gelu.

Tabulka 9 – Ředění homogenátu tkáni.

	1	2	3	4	5	6
Homogenát (μl)	10	8	6	5	4	2
2% SDS (μl)	0	2	4	5	6	8

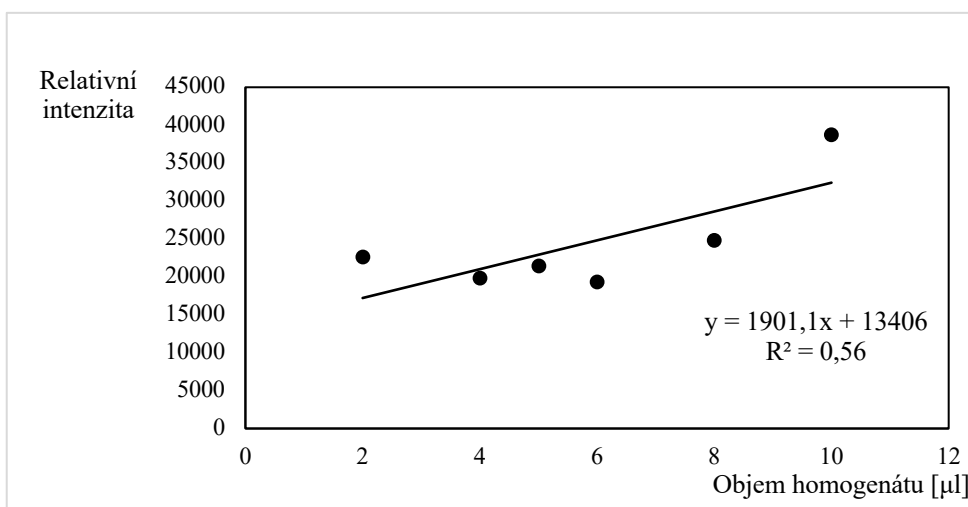


Obrázek 31 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – ředící řada, tkáň pankreatu, po homogenizaci a centrifugaci  $9000 \times g$ . Ve vymezených rámečcích lze pozorovat přítomnost proteinu CerS2 v jednotlivých frakcích. Primární protilátka LS-Bio.

Mw – standard molekulových hmotností, 1 – 10 μl homogenátu tkáně, 2 – 8 μl homogenátu tkáně, 3 – 6 μl homogenátu tkáně, 4 – 5 μl homogenátu tkáně, 5 – 4 μl homogenátu tkáně, 6 – 2 μl homogenátu tkáně.

Na membráně po reakci se specifickou protilátkou (proti celé sekvenci CerS2 – LS-Bio) byly zřetelné proužky odpovídající dle Mw proteinu CerS2. Z těchto čtyřech membrán byla vhodná ke zjištění linearity pomocí denzitometrického vyhodnocení pouze membrána B (graf č.1). Na ostatních byla patrná degradace sledovaného proteinu přítomností proužků v oblasti malých molekulových hmotností. Na membráně C byly pozorovány přítomné tři proužky blízko sebe v očekávané oblasti molekulové hmotnosti. Pravděpodobně ten nejnižší odpovídal sledovanému proteinu CerS2. Přítomnost ostatních proužků na membráně C okolo vyšších molekulových hmotností mohla vzniknout jako vedlejší produkt přípravy vzorku a elektroforézy.

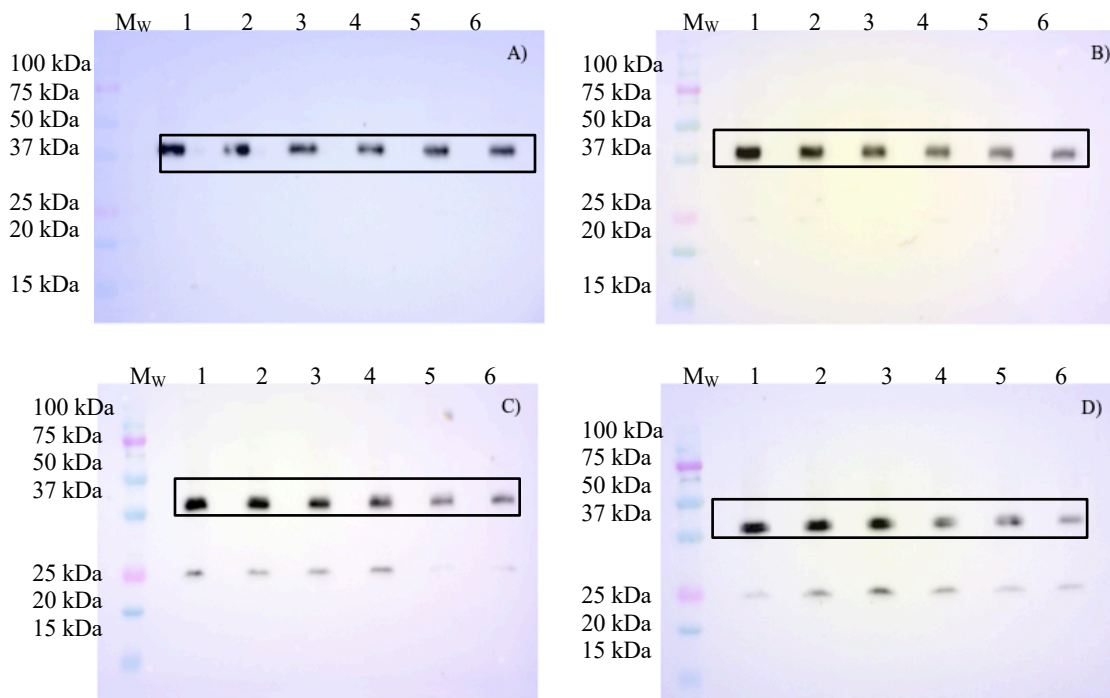
Na grafu č.1 je znázorněno denzitometrické vyhodnocení membrány B, konkrétně závislost relativní intenzity na objemu pipetovaného homogenátu.



Graf 1 – Denzitometrické vyhodnocení membrány B po Western blott analýze pro protein CerS2, tkáň pankreatu.

Relativní intenzita odpovídá hodnotě surové intenzity (raw volume) vyhodnocené v programu GeneTools (relativní hodnota intenzity získaná součtem pixelů ve vyznačeném sledovaném pásmu při denzitometrickém vyhodnocení vyfocené membrány po imunochemické detekci). Z grafu č.1 je patrné, že hodnoty mají vzestupnou tendenci, ale ze závislosti je zřejmé, že protokol poskytuje výsledky s nízkou linearitou. Příčinou nejednoznačných výsledků byla pravděpodobně různá míra degradace proteinů ve vzorku během jeho přípravy a částečně i různý původ tkáně, odebírané postupně z různých částí zmražené tkáně.

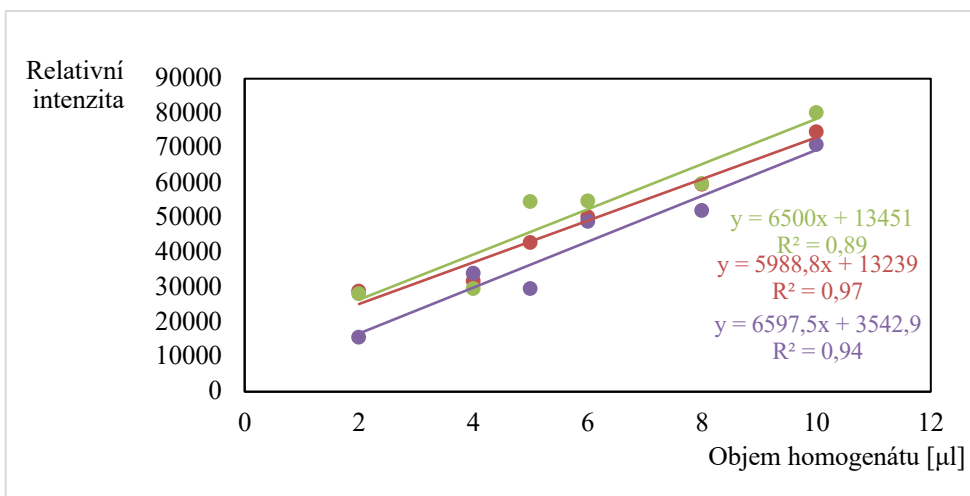
Stejný experiment byl proveden i se vzorky tkáně jater. Homogenizace tkáně byla provedena ve 2% SDS, centrifugace  $9000 \times g$ , 10 min, dále byl odebrán supernatant a následně před elektroforézou byly vzorky naředěny 2% SDS.



Obrázek 32 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – ředící řada, tkáň jater, po homogenizaci a centrifugaci  $9000 \times g$ . Ve vyznačených rámečcích lze pozorovat přítomnost proteinu CerS2 v jednotlivých frakcích. Primární protilátka LS-Bio.

Mw – standard molekulových hmotností, 1 – 10  $\mu$ l homogenátu tkáně, 2 – 8  $\mu$ l homogenátu tkáně, 3 – 6  $\mu$ l

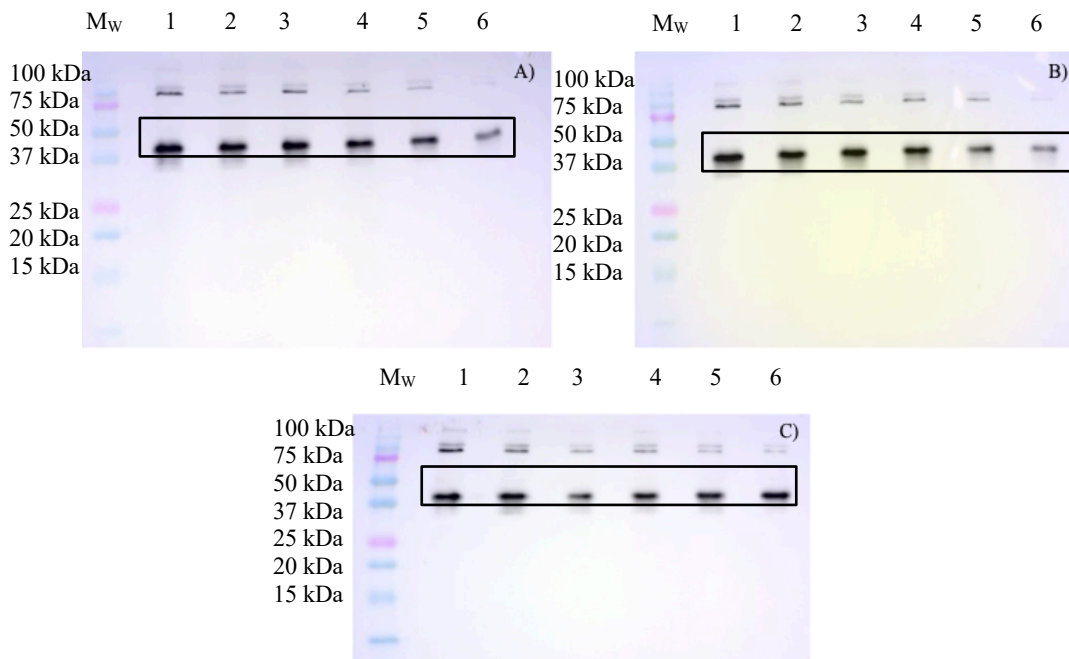
Ve vyznačených rámečcích (viz obr.č.32) byly pozorované proužky odpovídající proteinu CerS2. Sledovaný protein byl přítomný ve všech ředěních. Na membránách C a D bylo možné pozorovat specifické proužky s nižší molekulovou hmotností, mohlo se jednat o fragmenty CerS2 případně došlo ke změně separačních podmínek během elektroforézy. K denzitometrickému vyhodnocení byly použity membrány B, C, a D. Graf č. 2 znázorňuje závislost relativní intenzity proužku na objemu vzorku nanášeného do gelu.



Graf 2 – Denzitometrické vyhodnocení membrán B, C, D, po Western blot analýze pro protein CerS2, tkáň jater. Červeně membrána B zeleně membrána C a fialově membrána D.

Z grafu č.2 je patrné, že lze zaznamenat vzestupnou tendenci intenzity proužků odpovídajících CerS2. Bude-li protokol pro izolaci CerS2 prováděn za podmínek, kde nebude docházet k částečné degradaci enzymu, a bude-li prováděn opakovaně s vysokou pečlivostí, je možné semikvantitativně vyhodnotit množství enzymu nacházejícího se v alikvotu tkáně jater, popřípadě i pankreatu.

Stejný experiment byl opakován se vzory tkáně jater za použití jiné primární protilátky pouze proti části (N- konci) CerS2 – výrobce Atlas Antibodies.

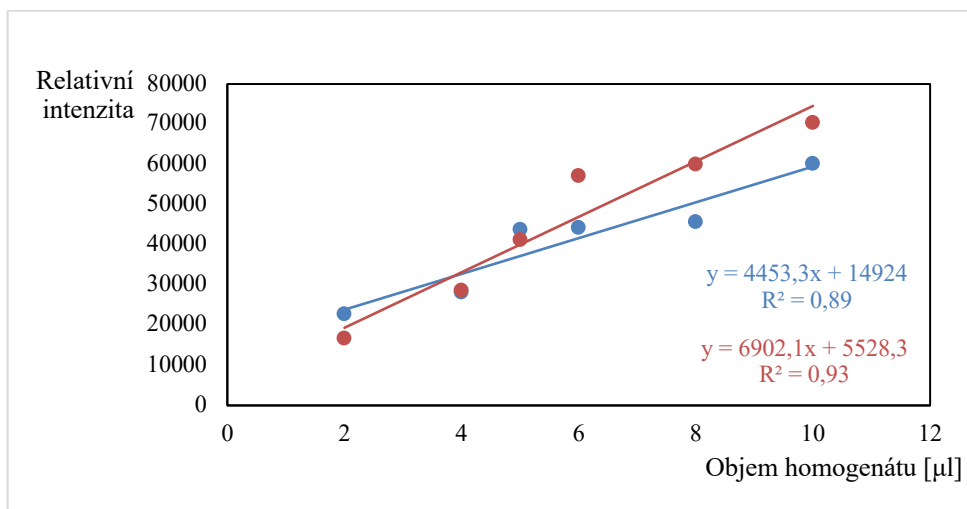


Obrázek 33 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – ředící řada, tkáň jater po homogenizaci a centrifugaci  $9000 \times g$ . Ve vymezených rámečcích lze pozorovat přítomnost proteinu CerS2 v jednotlivých frakcích. Protilátka Atlas Antibodies.

Mw – standard molekulových hmotností, 1 – 10  $\mu$ l homogenátu tkáně, 2 – 8  $\mu$ l homogenátu tkáně, 3 – 6  $\mu$ l homogenátu tkáně, 4 – 5  $\mu$ l homogenátu tkáně, 5 – 4  $\mu$ l homogenátu tkáně, 6 – 2  $\mu$ l homogenátu tkáně.

Výrazné proužky v poloze molekulových hmotností mezi 50 a 37 kDa odpovídající dle  $M_w$  a reaktivitě se specifickou protilátkou sledovanému proteinu CerS2 byly vyznačeny rámečkem. Signál specifický pro protein CerS2 byl přítomný ve všech alikvotech vzorku. Na všech membránách byly také patrné další proužky v pozici odpovídající  $M_w$  okolo 100 kDa. V případě předchozích membrán (obr. č.33) byla použita protilátka proti celé sekvenci CerS2 a byly viditelné proužky o nižší molekulové hmotnosti. Specifické proužky mohly představovat již degradované části CerS2. Při použití protilátky pouze proti N-koncové části CerS2 unikátní pouze pro CerS2 byly pozorovány proužky okolo 100 kDa. Jak bylo již zmíněno výše mohlo se jednat o nějaký proteinový komplex s CerS2 nebo dimer

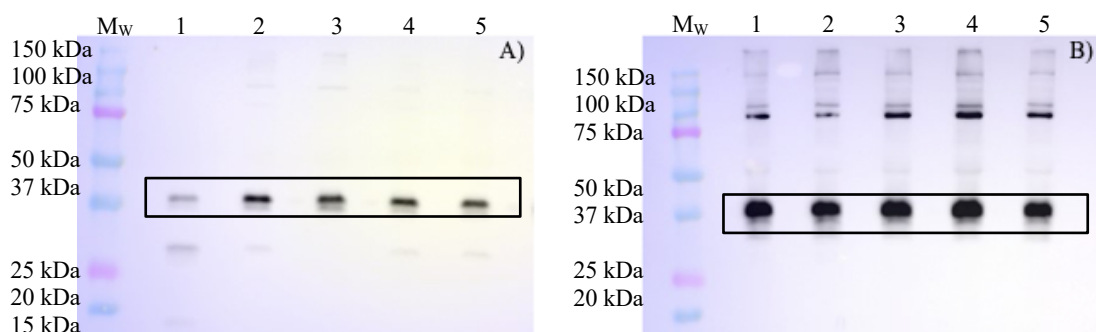
CerS2. Viditelné rozdíly lze pravděpodobně přičítat rozdílné specifitě a reaktivitě protilátek. K denzitometrickému vyhodnocení byly vybrány membrány A a B.



Graf 3 – Denzitometrické vyhodnocení membrán A a B, po Western blot analýze pro protein CerS2, tkáňě jater. Modře membrána A a červeně membrána B.

Na grafu č.3 je znázorněno denzitometrické vyhodnocení membrán A a B, konkrétně závislost relativní intenzity vyhodnocovaného proužku na objemu pipetovaného homogenátu. Z grafu č.3 je patrné, že hodnoty mají vzestupnou tendenci. Denzitometrické vyhodnocení bylo pouze orientační. Byla porovnáována závislost stupně ředění na intenzitě proužku na membráně po WB s imunochemickou detekcí pro protein CerS2.

Pro potvrzení opakovatelnosti nově optimalizovaného protokolu metody izolace CerS2, bylo stejným způsobem zpracováno a pomocí SDS-PAGE spolu s WB a imunochemickou detekcí pro protein CerS2 analyzováno 5 alikvotů tkáně jater a také pankreatu. Každý vzorek byl zpracováván stejným způsobem za stejných podmínek dle optimalizovaného protokolu. Krájení tkáně na suchém ledu, vážení, homogenizace ve 2% SDS, elektroforéza ve vzorkovém pufru obsahující DTT, přenos proteinů na nitrocelulóзовou membránu a také imunochemické detekce.

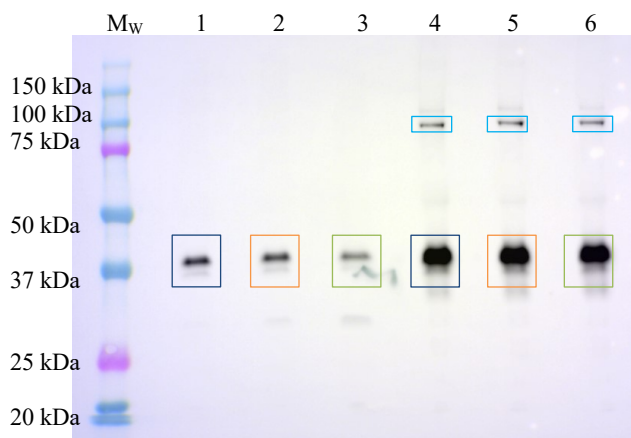


Obrázek 34 – Western blot analýza izolačních frakcí s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – homogenizace ve 2% SDS, supernatant  $9000 \times g$ , vzorky tkáně pankreatu (A), vzorky tkáně jater (B). Ve vymezených rámečcích lze pozorovat přítomnost proteinu CerS2 v jednotlivých frakcích.

1 – vzorek 1, 2 – vzorek 2, 3 – vzorek 3, 4 – vzorek 4, 5 – vzorek 5.

Ve vyznačeném rámečku na (viz obr. č. 34) v očekávané oblasti molekulové hmotnosti byla patrná přítomnost proužku odpovídající sledovanému proteinu CerS2 ve všech vzorcích tkání. U vzorků tkáně pankreatu (A) byly patrné specifické proužky o nižší molekulové hmotnosti, mohlo se jednat o již částečně degradované proteiny CerS2 nebo jinak chemicky modifikované. Ze získaných výsledků pro vzorky tkáně pankreatu bylo patrné, že na finální výsledek může mít také vliv i konkrétní část tkáně, která byla odebrána a zpracovávána ze skladované tkáně. U vzorků tkáně jater (B) bylo možné pozorovat opět proužky okolo 100 kDa. Jak již bylo zmíněno, mohlo se jednat o dimer nebo o jinou molekulovou interakci s CerS2. Homogenizací celkem pěti různých částí tkání jater i pankreatu ve 2% SDS byla ověřena opakovatelnost metody pro izolaci CerS2.

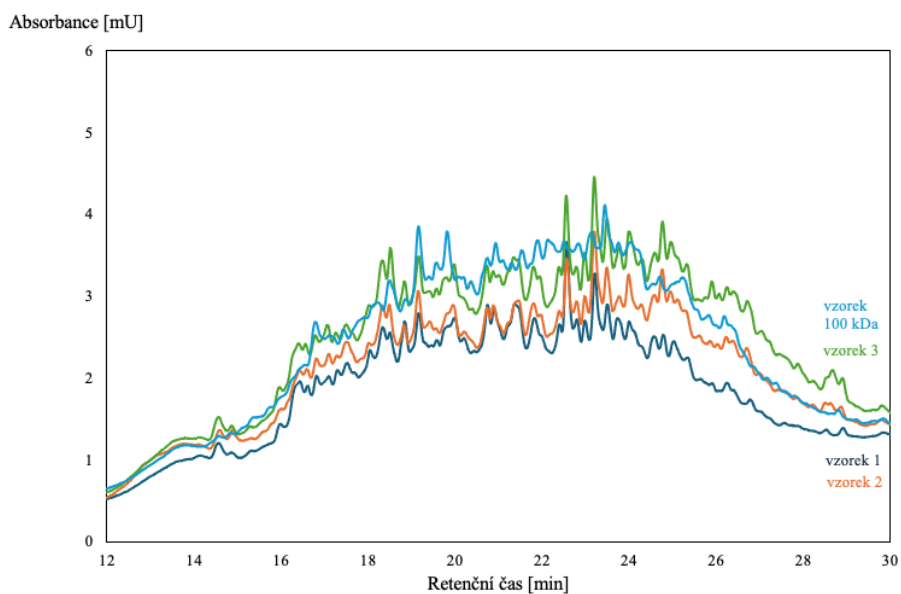
Po ověření opakovatelnosti metody pro izolaci CerS2 pomocí WB s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 z tkání byly další experimenty zaměřeny také na identifikaci CerS2 pomocí MS. K tomuto ověření a identifikaci izolovaného proteinu byly použity metody LC-UV a LC-MS. Pro identifikaci CerS2 pomocí hmotnostní spektrometrie byly připraveny dva gely. Z toho prvního byly proteiny přeneseny na nitrocelulózovou membránu a byly inkubovány se specifickou primární protilátkou – proti části N konce proteinu. Druhý gel byl po elektroforéze obarvený Coomassie a po výsledku z imunochemické detekce toho prvního z něj byly vyříznuty konkrétní části obsahující CerS2. Dále byly vyříznuté části gelu zpracovávány dle postupu (viz kap.č.5.12 štěpení v gelu). Pomocí LC-UV analýzy byla ověřována opakovatelnost daného postupu a také ověřována čistota vzorku před samotnou LC-MS analýzou.



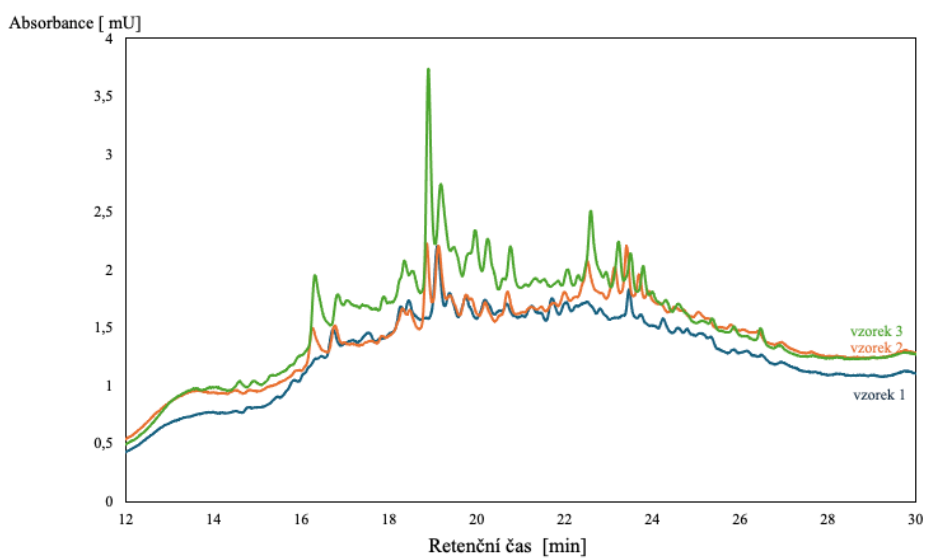
Obrázek 35 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 – vzorky tkání pankreatu a jater, homogenizace ve 2% SDS, supernatant 9000 g. Pomocí rámečků jsou vyznačena jednotlivá místa vyříznutí částí z gelu. Barva rámečku odpovídá barvě křivky v grafu z LC-UV (viz grafy č.3 a 4).

1-3 – vzorky tkáně pankreatu, 4-6 – vzorky tkáně jater

Ve všech vyznačených rámečcích (viz obr. č. 35) byla patrná přítomnost specifického proužku odpovídajícímu dle Mw a reaktivity se specifickou protilátkou sledovanému proteinu CerS2. U tkáně jater byly opět pozorovány specifické proužky okolo 100 kDa. Pro potvrzení domněnky o tvorbě dimeru CerS2 byly tyto proužky také vyříznuty a dále analyzovány.



Graf 4 — Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky tkáně jater.

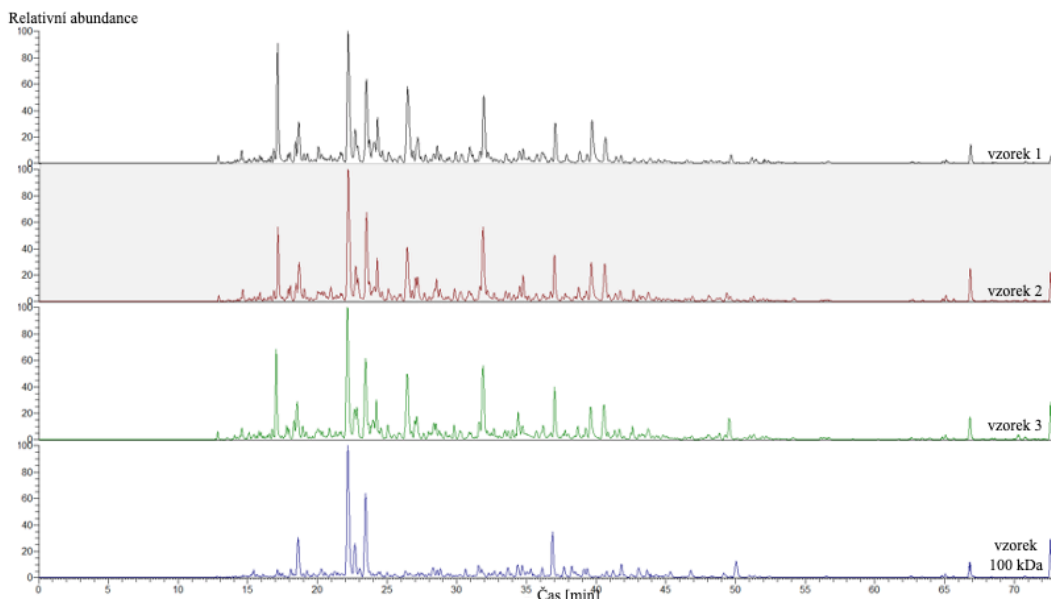


Graf 5 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky tkáně pankreatu.

Grafy č. 4 a 5 znázorňují závislost absorbance v čase. Jednotlivé křivky představují signál peptidů ve vzorku a také informaci o čistotě vzorku. Porovnáním křivek mezi sebou byla zkoumána opakovatelnost přípravy vzorků vyříznutím

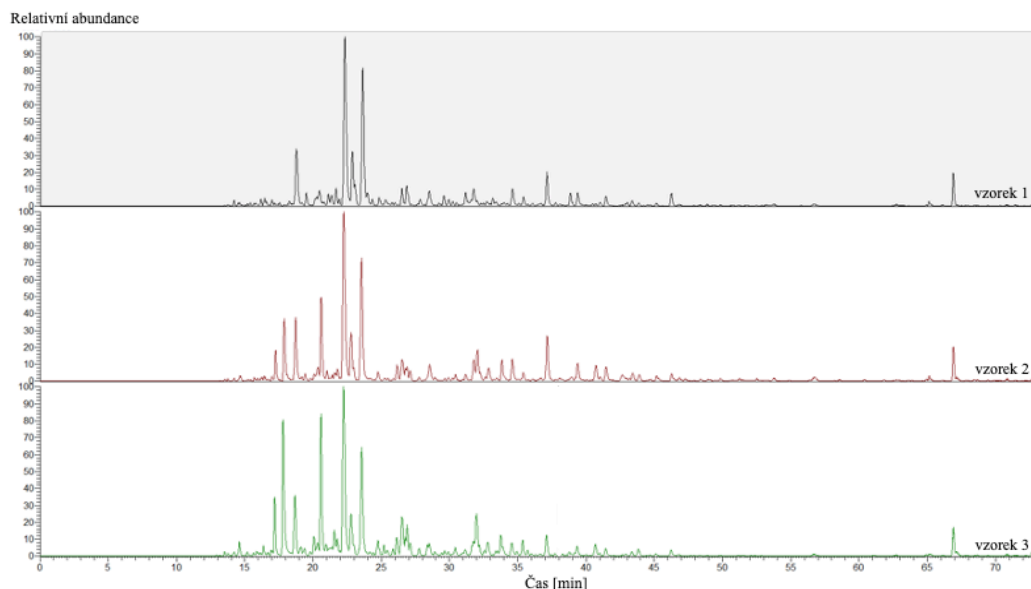
z gelu. Vzorky byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi (C18) ve spojení s UV detekcí při 215 nm. Peptidy byly separovány pomocí gradientu ACN/0,1% TFA. Grafy znázorňují chromatogramy LC-UV analýzy, kde je zaznamenána separace tryptických štěpných produktů (peptidů) pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi a s detekcí v UV při 215 nm. Porovnáním záznamů bylo možné vyhodnotit opakovatelnost přípravy vzorků vyříznutím a štěpením v gelu. Jak je viditelné z grafu č.5 vzorky tkáně pankreatu dosahovaly nižší absorbance, než je tomu u vzorků jater (graf č.4). V játrech se enzym CerS2 nachází ve větším množství než v pankreatu, v průběhu izolace nedochází k degradaci proteinů proteolytickými enzymy v takové míře jako u vzorků pankreatické tkáně. Také bylo na první pohled viditelné, že třetí vzorek se výrazně odlišuje od zbylých dvou. Dle výsledku z gelů bylo patrné, že je velmi obtížné dosáhnout opakovatelnosti metody štěpení v gelu pro další analýzy vedoucí ke kvantifikaci CerS2.

Membrána WB analýzy (obr.č.35), byla také vyhodnocena denzitometricky. Byl porovnáván rozdíl signálu přítomnosti CerS2 ve tkáních jater a pankreatu. Na obrázku č.36 je znázorněn chromatogram LC-MS analýzy se záznamem separace tryptických peptidů (přípravený ze vzorku tkáně jater), konkrétně závislost



Obrázek 36 –Záznam LC-MS analýzy vzorků tkáně jater štěpených v gelu. Reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% FA, nanoESI, Q exactive.

relativní intenzity píků v čase LC-MS analýzy. Všechny tři zpracované vzorky tkáně jater štěpených v gelu vykazují podobný profil. Modrý záznam představuje vyříznuté části gelu okolo 100 kDa a vykazuje rozdíly ve složení. Podobnost bude způsobena především přítomností enzymu trypsinu ve vzorku, který byl použit pro získání specificky naštěpených peptidů.



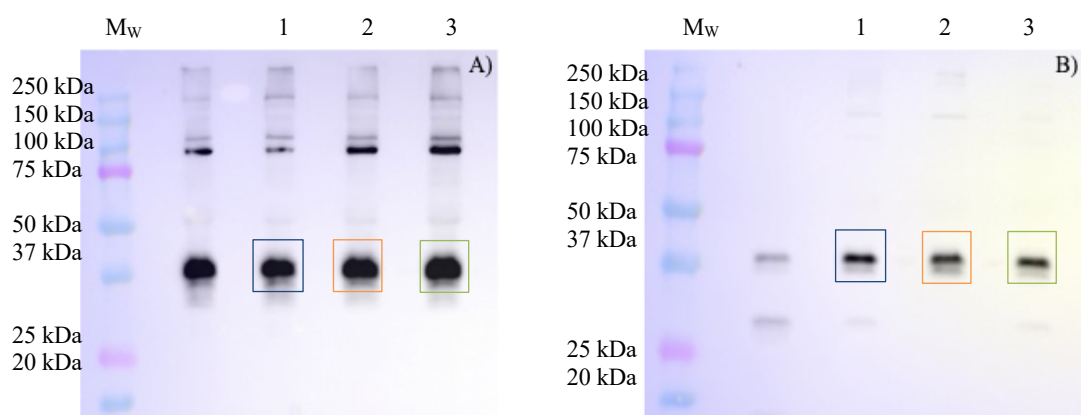
Obrázek 37 – Záznam LC-MS analýzy vzorků tkáně pankreatu štěpených v gelu, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/ 0,1% FA, nanoESI, Q exactive.

Na obrázku č.37 je znázorněn chromatogram LC-MS analýzy se záznamem separace tryptických peptidů (připravených ze vzorků tkání pankreatu). Grafy vykazují podobný profil, jsou zde ale patrné i některé rozdíly. Třetí vzorek se od dvou předešlých odlišuje výškou 16 a 17 minutou, a i některé další píky jsou podstatně vyšší. Příčinou odlišností je nejspíše rozdíl mezi jednotlivými alikvoty tkáně. Toto také koresponduje s průběhem křivky vzorku č.3 u LC-UV analýzy (viz graf č. 5).

Vzorky byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi (C18) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q-exative. Peptidy byly separovány pomocí gradientu ACN/0,1% FA (4-34%). Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru Q Exactive, který kombinuje kvadrupólový filtr

s detekcí v Orbitrap analyzátoru. Identifikace proteinů byla provedena pomocí softwaru Proteome Discoverer. LC-MS analýzou vzorků tkání jater připravených štěpením v gelu bylo celkem identifikováno 1216 proteinových skupin a přítomnost proteinu CerS2 byla potvrzena identifikací 4 specifických peptidů pro CerS2. Ve vzorcích tkáně pankreatu připravených štěpením v gelu bylo identifikováno celkem 1398 proteinových skupin a přítomnost CerS2 byla potvrzena identifikací 3 specifických peptidů pro CerS2. Pomocí štěpení v gelu a MS se podařilo ve vzorcích tkáně jater i pankreatu identifikovat CerS2 a potvrdit tím výsledky získané pomocí metody WB s imunochemickou detekcí pro protein CeS2. Stejným způsobem byl analyzován i vzorek vyříznutých částí gelů kolem 100 kDa s cílem ověřit, zda se jedná o dimer proteinu CerS2 nebo komplex CerS2 s jiným proteinem. V těchto částech byla jasně zřetelná reaktivita se specifickou protilátkou. Ve vzorku získaném štěpením v gelu částí okolo 100 kDa nebyl metodou LC-MS enzym CerS2 prokázán.

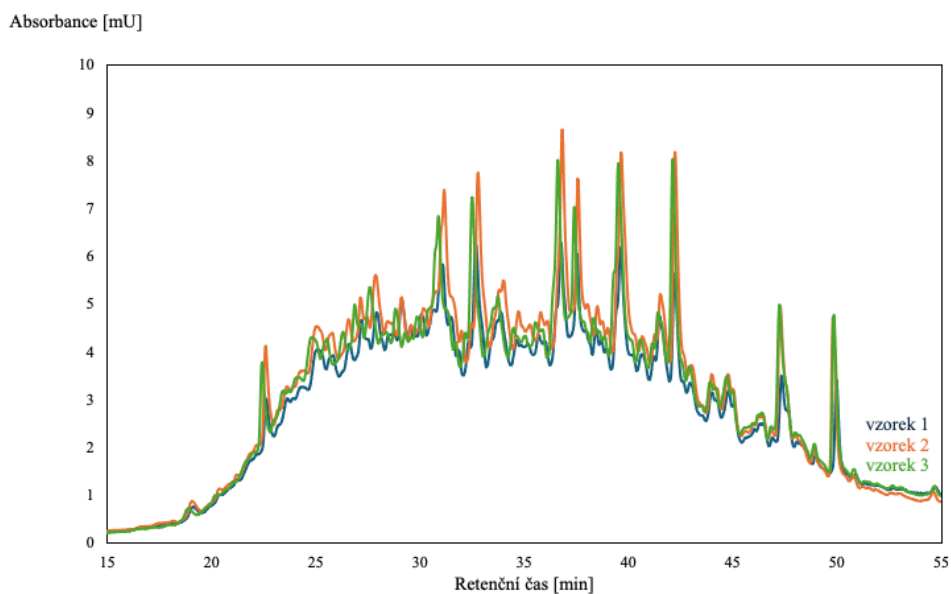
Další příprava vzorků pro průkaz CerS2 v tkáňových homogenátech byla provedena technikou „in-solution digest“, tzv. štěpení v roztoku. Důvodem bylo, že štěpení v roztoku poskytuje větší výtěžnost oproti štěpení v gelu, nedochází ke ztrátám izolovaného proteinu v průběhu elektroforetické separace. Na druhou stranu je však takový vzorek méně čistý a obsahuje mnoho jiných proteinů ztěžující MS analýzu. Jako vzorky pro štěpení v roztoku byly zvolené již ověřené vzorky tkání, ve kterých byla pomocí WB s imunochemickou detekcí prokázána přítomnost enzymu CerS2.



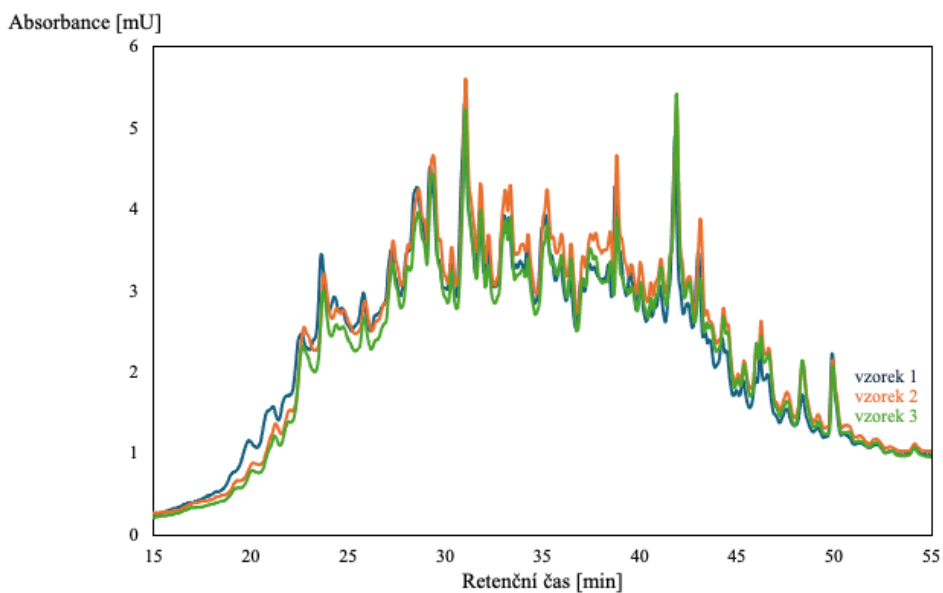
Obrázek 38 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Výsledky imunodetekce CerS2 pro vzorky použité pro štěpení v roztoku. A) tkáň jater, B) tkáň pankreatu. Barvy rámečků odpovídají barvám křivek grafů z LC-UV analýz (viz grafy č.6 a 7).

M<sub>w</sub> – standart molekulových hmotností, 1 – vzorek č.1, 2 – vzorek č.2, 3 – vzorek č.3.

V jednotlivých rámečcích (viz obr. č. 38) jsou označené proužky odpovídající dle M<sub>w</sub> a reaktivitou specifické protilátky proteinu CerS2. Jedná se o výsledky imunochemické detekce pro protein CerS2 ve vzorcích použitých na štěpení v roztoku. Jednotlivé barevné označení rámečku odpovídá barvě záznamu chromatogramu v grafu LC-UV (grafy č.6 a 7).

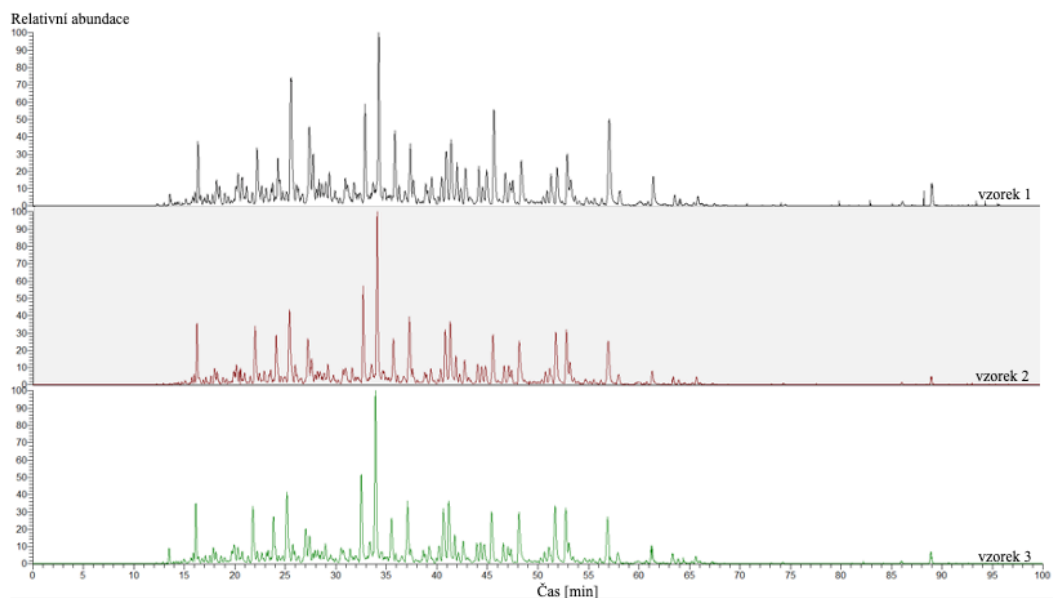


Graf 6 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky tkáni jater po štěpení v roztoku.

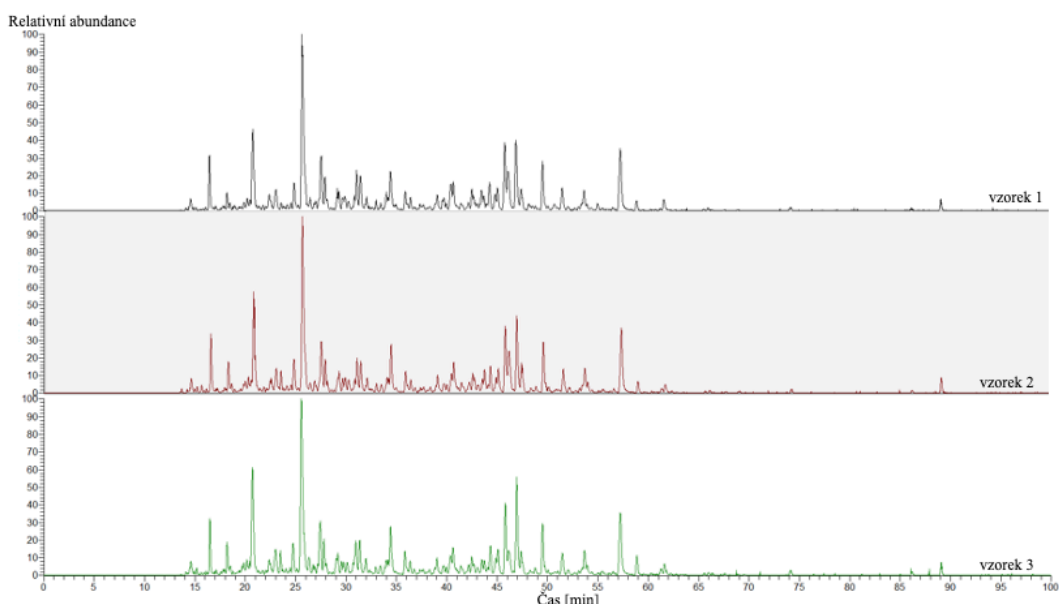


Graf 7 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky tkáni pankreatu po štěpení v roztoku

Na záznamech LC-UV analýz (grafy č. 6 a 7) je pro oba typy naštěpené tkáně viditelné, že jednotlivé chromatografické záznamy jsou si velmi podobné. Štěpením v roztoku bylo dosaženo lepší opakovatelnosti než štěpením v gelu.



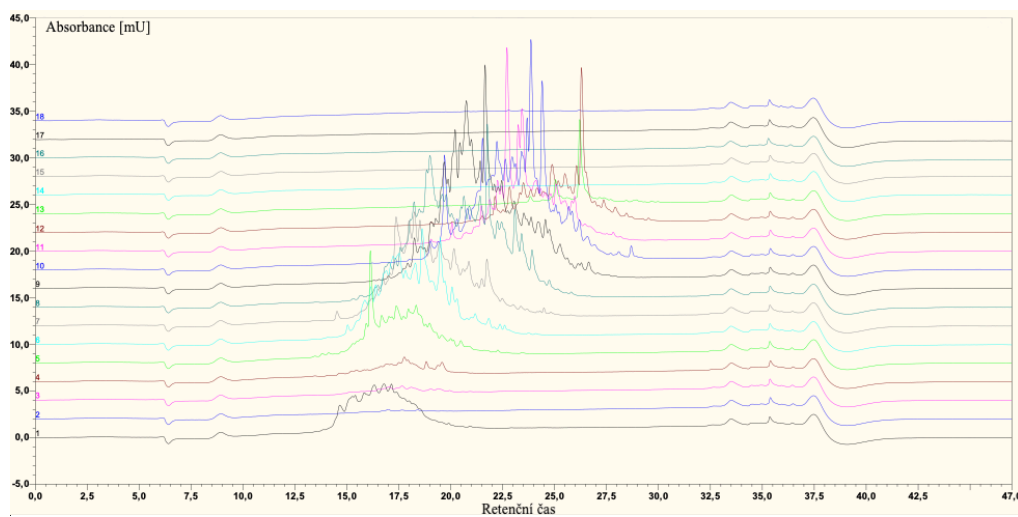
Obrázek 39 – Záznam LC-MS analýzy vzorků tkáni jater v roztoku, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% FA, nanoESI, Q exactive.



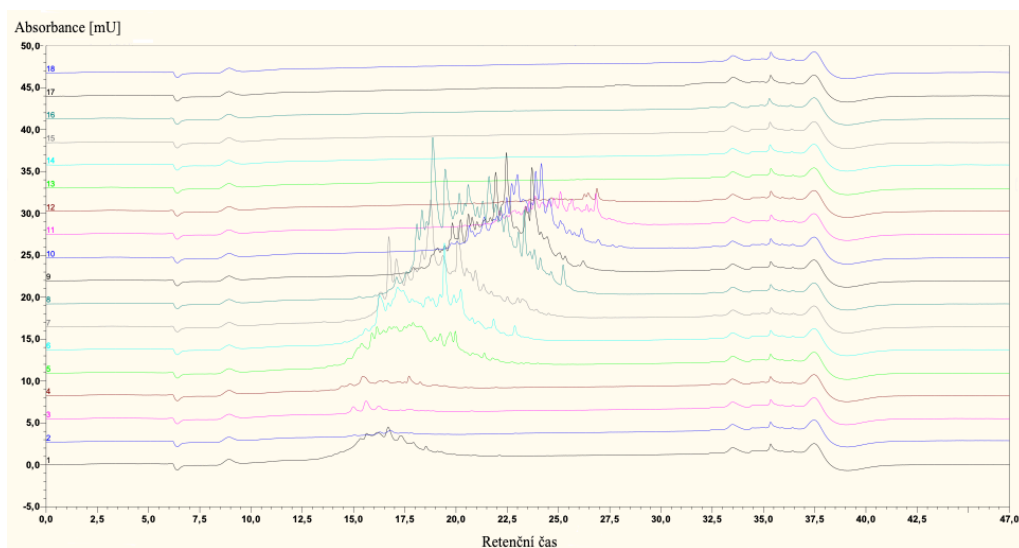
Obrázek 40 – Záznam LC-MS analýzy vzorků tkání pankreatu v roztoku, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% FA, nanoESI, Q exactive.

Na těchto dvou obrázcích č.39 a č.40 jsou chromatogramy se záznamem separace peptidů, konkrétně intenzita píků v čase LC-MS analýzy. Vzorky obou zkoumaných tkání vykazovaly na záznamu LC-MS analýzy velmi podobné profily jedné vybrané tkáně.

Dle předchozích výsledků na základě nízkého počtu identifikovaných peptidů metodou štěpení v roztoku byla po štěpení v roztoku zařazena bazická frakcionace s cílem snížit komplexitu vzorku a tím zlepšit detekci a identifikaci v následné MS analýze. Ze vzorků po štěpení v roztoku byly připravené směsné vzorky, jeden pro tkáň jater a druhý pro tkáň pankreatu. Frakcionace tryptických peptidů byla provedena manuálně v mikrokolonci s reverzní fází (C18) za použití eluce pomocí gradientu acetonitrilu (2-40%) s 20 mM mravenčanem amonným (pH 10). Před LC-MS analýzou bylo rozdělení peptidů ověřeno pomocí LC-UV analýzy (obr. č. 41 a 42). Tento krok pomohl ověřit úspěšnou přípravu frakcí a případnou detekci kontaminantů.



Obrázek 41 – Záznam LC-UV analýzy vzorků frakcí připravených manuální bazickou mikrogradientovou frakcionací peptidů směsného vzorku tkáně jater po štěpení v roztoku. jednotlivé frakce jsou odlišeny barevně (1-17).



Obrázek 42 – Záznam LC-UV analýzy vzorků frakcí připravených manuální bazickou mikrogradientovou frakcionací peptidů směsného vzorku tkáně pankreatu po štěpení v roztoku. jednotlivé frakce jsou odlišeny barevně (1-17).

Výsledné chromatogramy jednotlivých frakcí (viz obr. č. 41 a 42) poukazují na úspěšnou frakcionaci komplexních směsí peptidů. Bylo připraveno celkem 17 frakcí, nejvyšší intenzita byla zaznamenána ve frakcích 5-13 u vzorku tkáně jater

a 5-11 u tkáně pankreatu. Rozložení signálu svědčí o dobré separaci vhodné pro následnou LC-MS analýzu.

Vzorky byly dále analyzovány pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi (C18) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q-exactive. Peptidy byly separovány pomocí gradientu ACN/0,1% FA (4-34%). Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru Q Exactive, který kombinuje kvadrupólový filtr s detekcí v Orbitrap analyzátoru. Identifikace proteinů byla provedena pomocí softwaru Proteome Discoverer. LC-MS analýzou vzorků tkání jater připravených štěpením v roztoku bylo identifikováno celkem 2152 proteinových skupin a přítomnost sledovaného proteinu CerS2 byla prokázána identifikací 2 specifických peptidů. Ve vzorcích tkáně pankreatu připravených štěpením v roztoku bylo pomocí LC-MS analýzy identifikováno celkem 2217 proteinových skupin a přítomnost sledovaného proteinu CerS2 nebyla prokázána. Pomocí bazické frakcionace vzorků připravených štěpením v roztoku bylo identifikováno u tkáně jater celkem 4993 proteinových skupin, přítomnost sledovaného proteinu CerS2 byla potvrzena identifikací 4 specifických peptidů pro CerS2. U vzorků tkáně pankreatu po štěpení v roztoku a bazické frakcionaci bylo identifikováno celkem 4683 proteinových skupin, a přítomnost sledovaného proteinu CerS2 byla prokázána identifikací 2 specifických peptidů pro CerS2.

Tabulka 10 – Identifikované peptidy po štěpení v gelu, roztoku a bazické frakcionaci, vyhodnoceno v Proteome Discoverer.

Identifikované peptidy	Štěpení v gelu		Štěpení v roztoku		Bazická frakcionace	
	Játra	Pankreas	Játra	Pankreas	Játra	Pankreas
ASPNTLEHFYLTSGK	✓	✓	✓		✓	✓
QVEVELLSR	✓	✓	✓		✓	
ASPNTLEHFYLTSGKQPK	✓	✓				
LRASPNTLEHFYLTSGKQPK	✓					
NQDRPSLLK					✓	✓
AGTLIMALHDSSDYLLES AK					✓	

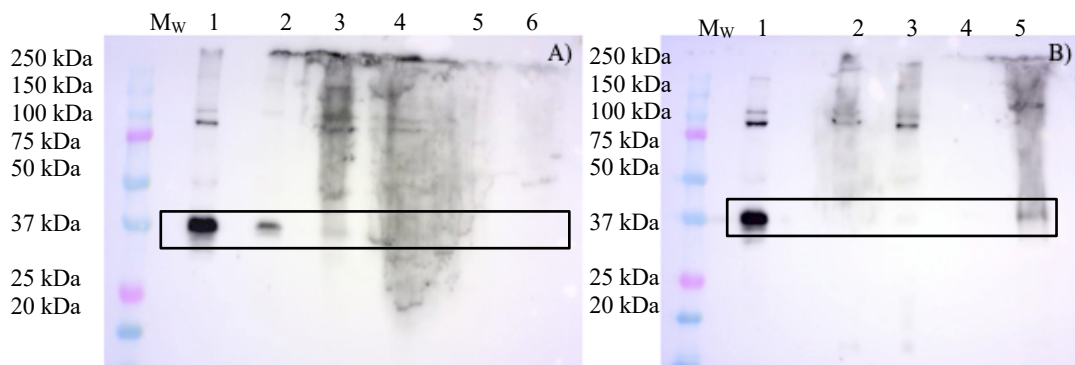
Tabulka č. 10 znázorňuje identifikované peptidy, specifické pro CerS2, pomocí odlišných metod přípravy vzorků tkání jater a pankreatu. Pro identifikaci CerS2 bylo lepší štěpení v gelu v porovnání se štěpením v roztoku, protože již pomocí elektroforézy a vyříznutí pouze určité části gelu došlo k částečné separaci CerS2 ze složité a komplexní směsi proteinů přítomných v homogenátech tkání. Pomocí bazické frakcionace vzorků připravených pomocí štěpení v roztoku bylo dosaženo většího počtu identifikovaných peptidů. Pro opakovatelnost a případnou kvantifikaci bylo vyhodnoceno, že je pravděpodobněji vhodnější postup s přípravou vzorku se štěpením v roztoku a následnou bazickou frakcionací vzorku.

Jednotlivé identifikované peptidy z prasečích tkání jater a pankreatu jsou znázorněné v sekvenci prasečí CerS2 (A0A287A843). Fragmenty označeny barvou odpovídají identifikovaným peptidům specifických pro CerS2, pomocí LC-MS analýz vzorků připravených pomocí štěpení v gelu, roztoku a také štěpením v roztoku s následnou manuální bazickou mikrogradientovou frakcionací.

#### CerS2 (A0A287A843)

10	20	30	40	50	60
MEDRMLQTLY	DYFWWERLWL	PVNLTWADLE	DRDGRVYAKA	SDLYITLPLA	LVFLIIRYFF
70	80	90	100	110	120
ELYVATPLAA	LLNVKEKTRL	RASPNPTLEH	FYLTSQKQPK	QVEVELLSRQ	SGLSARQVER
130	140	150	160	170	180
WFRRRRNQDR	PSLLKKFREA	SWRFTFYLIA	FIAGMAVIDD	KPWFYDMRKV	WEGYPIQSTI
190	200	210	220	230	240
PSQYWYIMIE	LSFYWSLLFS	IASDVKRKDF	KEQIIHHVAT	IILISFSWFA	NYVRAGTLIM
250	260	270	280	290	300
ALHDSSDYLL	ESAKMFNYAG	WKNTCNNIFI	VFAIVFIITR	LVILPFWILH	CTLVYPLELY
310	320	330	340	350	360
PAFFGYFFN	FMMGVLQLLH	IFWAYLILRM	AHKFITGKLV	EDERSDREET	ESSEGEEAAA
370	380				
GGGAKSRPLA	NGHPILSNNH	RKND			

Dalšími experimenty bylo ověřit, zda by kroky redukce, alkylace a precipitace před elektroforetickou separací zvýšily výtěžnost sledovaného proteinu CerS2. Hlavním cílem tohoto kroku bylo zakoncentrování vzorku a odstranění SDS ze vzorku před LC-UV a LC-MS analýzami. SDS mění hydrofobicitu a náboj proteinů, tím ovlivňuje retenci a rozlišení, může také potlačit ionizaci analytu a v neposlední řadě může kontaminovat přístroje.

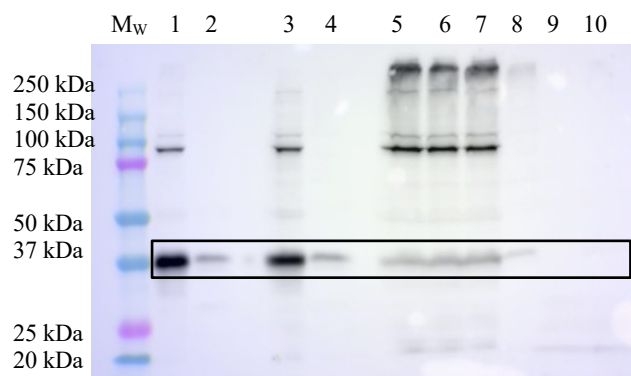


Obrázek 43 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Zavedení redukce, alkylace a precipitace do protokolu (A). Různé metody precipitace (B).

- A) 1 – jaterní homogenát, 2 – pankreatický homogenát, 3 a 4 játra redukcí, alkylací a po precipitaci acetonem, 5 a 6 pankreat po redukcí, alkylací a po precipitaci acetonem
- B) 1 – jaterní homogenát, 2 – precipitace TCA, 3 – precipitace acetonem 4x objemy, 4 – precipitace TCA v acetonu 5 – precipitace 6 objemů vzorku a 10 min povařeno ve vzorkovém pufru

Z vyznačených rámečků (viz obr. 43) bylo patrné, že provedení redukce, alkylace a precipitace proteinu s následnou identifikací CerS2 nemá očekávaný efekt. V pozici 1 a 2 na membráně A) a také v pozici 1 na membráně B) byly viditelné proužky odpovídající CerS2 v homogenátech tkání před krokem redukce, alkylace a precipitace. Poté však specifické proužky pro CerS2 zřetelné nebyly. Po precipitaci 500  $\mu$ l tkáňových homogenátů vznikaly velké proteinové peletky, které se nepodařilo zcela rozpustit v menším objemu vzorkového roztoku. Změna precipitační metody tento problém také nevyřešila.

Pro další experiment bylo sníženo množství výchozího homogenátu tkáně z 500  $\mu$ l na 50  $\mu$ l a postupováno podle postupu alkylace, redukce a precipitace, který byl úspěšně proveden u štěpení v roztoku.



Obrázek 44 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Redukce, alkylace a precipitace proteinů acetonem.

1 – jaterní homogenát, 2 – pankreatický homogenát, 3 a 4 homogenáty po redukci, alkylaci a precipitaci, peletka rozpuštěná ve 2% SDS (3 játra, 4 pankreat), 5-7 jaterní homogenáty po redukci, alkylaci a precipitaci acetonem, peletka rozpuštěná ve vzorkovém pufru 8-10 pankreatické homogenáty po redukci, alkylaci a precipitaci acetonem, peletka rozpuštěná ve vzorkovém pufru.

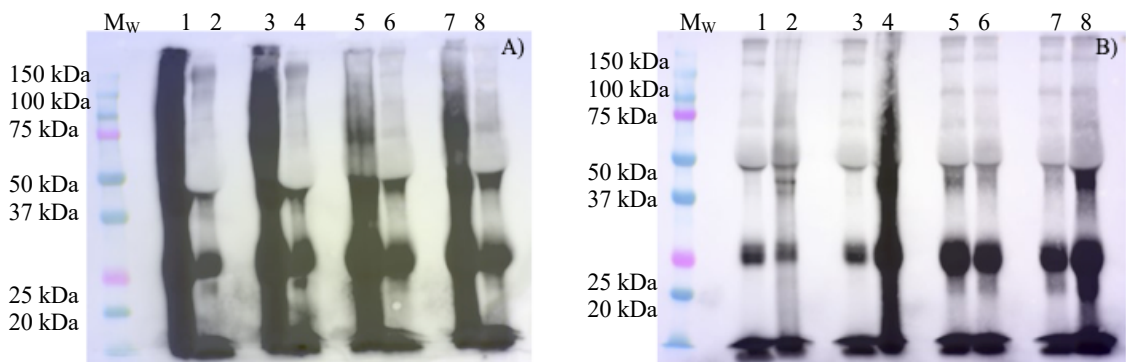
Ve vyznačeném rámečku (viz obr. 44) v oblasti očekávané molekulové hmotnosti okolo 45 kDa, byl patrný náznak proužku odpovídající také reaktivitou se specifitou protilátkou proteinu CerS2. Konkrétně ve frakcích 3 a 4, tedy po rozpuštění peletky, po redukci, alkylaci a precipitaci, ve 2% SDS. Ve frakcích 5-7 byl nepatrný náznak přítomnosti specifického proužku pro CerS2 nicméně ve frakcích 8-9 už nikoliv. Po rozpuštění peletek ve vzorkovém pufru nebyl pozorován stejně intenzivní proužek specifický pro CerS2. To může naznačovat, že po odstranění SDS na sledovaný enzym působily různé vlivy vedoucí k jeho degradaci. Jedním z faktorů mohlo být působení proteáz přítomných ve tkáni pankreatu, dále také vliv sonifikace a vortexování při snaze rozpustit peletu. Tyto výsledky vzorků tkáně pankreatu po precipitaci jen potvrdily předchozí neúspěšné pokusy izolovat CerS2 z tkáně pankreatu po homogenizaci v izolačním pufru MIB-L. Jasně se potvrdilo, že homogenizace tkáně přímo do 2% roztoku SDS výrazně omezí degradaci CerS2 a umožní průkaz a následnou identifikaci enzymu ve vzorku pomocí MS. Zahrnutí kroku redukce, alkylace a precipitace proteinů s následným rozpuštěním peletky ve vzorkovém pufru před elektroforetickou separací do protokolu se neukázalo jako úplně správnou cestou pro izolaci CerS2 z tkání jater a pankreatu.

## 6.2 Izolace ceramidsyntázy 2 z krevních buněk

Vzorek plné krve byl použit jako další biologický materiál, ve kterém se dle literatury [28] nachází membránově vázaný enzym CerS2, konkrétně v membráně leukocytů. Odběr krve představuje téměř neinvazivní odběr biologického materiálu a byl by vhodný pro screening případných odchylek v množství nebo struktuře membránově vázaného enzymu CerS2.

### *Izolace z plné krve*

Postup izolace byl obdobný jako při práci s jaterní a pankreatickou tkání. K 500  $\mu$ l nesrážlivé lidské krve bylo přidáno 1,5 ml izolačního pufru MIB-L nebo 2% SDS. Obsah zkumavky byl centrifugován  $600 \times g$  5 min,  $4^\circ C$ , erythrocyty by se měly po prvním kroku nacházet na dně zkumavky. Následně byl odebrán supernatant a ten dále centrifugován  $9000 \times g$  10 min. Po separačních krocích byla provedena SDS-PAGE a také WB s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Izolace CerS2 však nebyla úspěšná. Důvodem mohla být masivní hemolýza erythrocytů v důsledku zamražení plné krve hned po odběru ( $-20^\circ C$ ), kde došlo ke kontaminaci vzorků proteiny lyzovaných erythrocytů, hlavně hemoglobinu. Membrána byla po transferu také lehce, ale viditelně obarvena krví lehce do růžova.



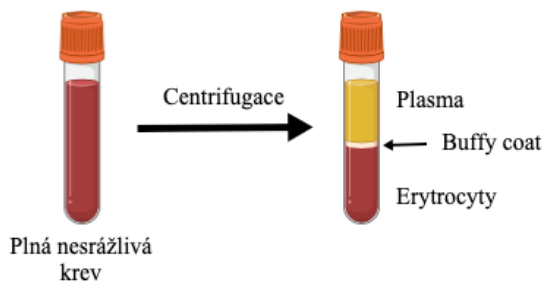
Obrázek 45 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Výsledek izolace CerS2 z plné krve, nespecifická reakce chemiluminiscenčního činidla a hemoglobinu.

$M_w$  – standard molekulových hmotností, 1 – supernatant  $9000 \times g$  MIB-L, 2 – peletka  $9000 \times g$  MIB-L, 3 – supernatant  $9000 \times g$  MIB-L, 4 – peletka  $9000 \times g$  MIB-L, 5 – supernatant  $9000 \times g$  2% SDS, 6 – sediment  $9000 \times g$  2% SDS, 7 – supernatant  $9000 \times g$  2% SDS, 8 – sediment  $9000 \times g$  2% SDS.

Na vyhodnocených membránách (viz obr. 45) byla vidět reakce chemiluminiscenčního činidla s hemoglobinem na membráně nikoliv s CerS2. Chemiluminiscenční činidlo je totiž směsí luminolu a peroxidu vodíku [137]. Skupina hem nacházející se v hemoglobinu má pseudoperoxidázovou aktivitu [138], tedy i ve velmi malém množství reaguje s tímto činidlem a výsledkem je velmi viditelná nespecifická reakce. Izolace CerS2 z plné krve pomocí centrifugačních kroků a WB s imunochemickou detekcí pro protein CerS2 nebyly proto tou nejlepší volbou pro stanovení CerS2 z krevních buněk. Hemolýza zde byla hlavní překážkou. Proto bylo hledáno jiné řešení, jak izolovat CerS2 z krevních buněk, tak aby nebyly přítomné erythrocyty. Jelikož se CerS2 nachází hlavně v membránách bílých krvinek další experimenty byly zaměřené na izolaci CerS2 pouze z bílých krvinek.

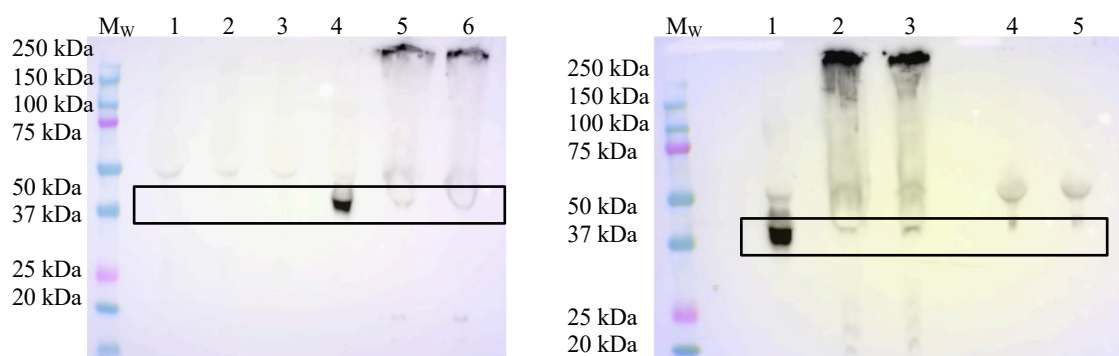
#### *Izolace z bílých krvinek (buffy coatu) s MIB-L*

V literatuře byl již CerS2 izolován z myších buněk kostní dřeně [108,122], ve které bílé krvinky vznikají. Pro dostupnost biologického materiálu byl pro izolaci CerS2 z bílých krvinek použit buffy coat. Buffy coat obsahuje především bílé krvinky a krevní destičky. Získává se centrifugací nesrážlivé krve. Ve zkumavce s plnou krví se mezi plazmou a erythrocyty vytvoří tenká šedobílá vrstva buffy coat, leukocyty a krevní destičky mají menší hustotu než erythrocyty (viz obr. č.46). Buffy coat tvoří asi méně než 1 % celkového objemu krve odebrané ve zkumavce.



Obrázek 46 – Příprava buffy coatu, vytvořeno pomocí BioRender.com.

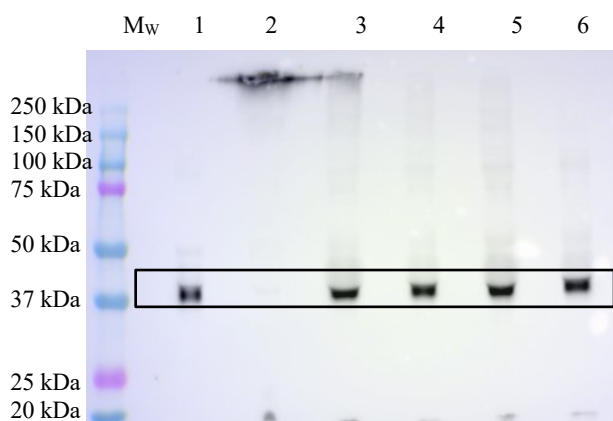
Ke 100  $\mu$ l buffy coatu bylo přidáno 400  $\mu$ l PBS (7,4). Následně bylo přidáno 1,5 ml izolačního pufru MIB-L a postupováno podle stejného centrifugačního protokolu jako u izolace z plné krve (viz kap.5.11). Postupná centrifugace: nejdříve 600  $\times$  g 5 min a poté 9000  $\times$  g 10 min. Z každého kroku izolace byla odebrána část pro následující analýzy pomocí WB s imunochemickou detekcí pro protein CerS2.



Obrázek 47 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Izolace CerS2 z vrstvy buffy coat.

- A) 1 – supernatant 600  $\times$  g, 2 – supernatant 9000  $\times$  g, 3 – supernatant 9000  $\times$  g, 4 – peletka 600  $\times$  g, 5 a 6 – peletky 9000  $\times$  g  
 B) 1 – peletka 600  $\times$  g, 2 a 3 – peletky 9000  $\times$  g, 4 a 5 – supernatanty 9000  $\times$  g.

Z prvních výsledků bylo patrné, že je CerS2 přítomný ve frakcích z peletek. Ve vyznačených rámečcích na obrázku č. 47 byl specifický proužek odpovídající  $M_w$  a reaktivitou se specifickou protilátkou odpovídající sledovanému proteinu CerS2 viditelný pouze v peletce 600  $\times$  g (obr. č.47 A) frakce 4 a B) frakce 1). Frakce peletek 9000  $\times$  g (proužky v horní části membrány) také vykazovaly reaktivitu se specifickou protilátkou odpovídající proteinu CerS2 (obr.č.47 A) frakce 5 a 6, B) frakce 2 a 3). Tyto proužky byly nejspíše agregáty, ve kterých je součástí i sledovaný enzym CerS2. Příčinou byly nejspíše nezdařená resuspendace peletky a díky tomu došlo k agregaci proteinů, které bylo obtížné rozpustit. V supernatantech se CerS2 nenacházel (obr. č 47 A) frakce 1-3, B) frakce 4 a 5).



Obrázek 48 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Analýza frakcí izolace CerS2 z vrstvy buffy coat.

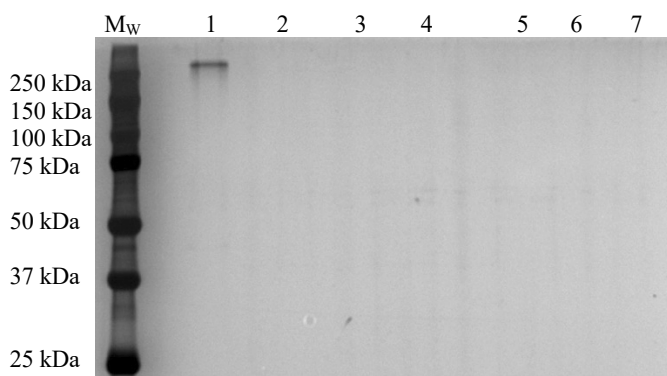
1 – peletka 600 × g, 2 – peletka 9000 × g neředěná, 3 – peletka 9000 × g ředění 1:1 PBS, 4 – peletka 9000 × g ředění 1:3 PBS, 5 – peletka 9000 × g ředění 1:1 2% SDS, 6 – peletka 9000 × g ředění 1:3 2% SDS.

Ve vyznačeném rámečku (viz obr. č.48) byl viditelný specifický proužek odpovídající sledovanému proteinu CerS2 především u naředěných frakcích peletky 9000 × g (frakce 3-6). Ve frakci 2 je viditelný agregát v oblasti vysokých molekulových hmotností. Při přípravě vzorků bylo zjištěno, že je zapotřebí použití většího objemu roztoku, ve kterém je peletka resuspendována. Na výsledek neměl vliv použitý roztok na ředění: PBS (7,4) nebo 2% SDS. ani poměr ředění.

### 6.3 Izolace ceramidsyntázy 2 metodou afinitní chromatografie

Dalším úkolem bylo zavést a optimalizovat podmínky a izolace enzymu CerS2 metodou afinitní chromatografie. Tento úkol zahrnoval dva dílčí kroky. Prvním krokem izolace CerS2 pomocí afinitní chromatografie byla příprava imunosorbentu, magnetických částice s kovalentně navázanou protilátkou proti CerS2. Pro výrobu nosiče byly použity magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (COOH). Druhým krokem byla vlastní izolace CerS2 z vybraných vzorků pomocí připraveného nosiče.

Na magnetické částice byly imobilizovány specifické protilátky proti CerS2. Specifické protilátky IgG byly na magnetické částice vázány pomocí tvorby peptidové vazby mezi karboxylovou skupinou na magnetických částicích a aminoskupinou protilátky. Jednalo se o neorientovanou imobilizaci protilátek. Pro vazbu specifické protilátky proti CerS2 bylo použito 0,5 mg částic a 2,5  $\mu$ g protilátek. Účinnost vazby protilátky na karboxylované magnetické částice byla ověřena pomocí gelové elektroforézy a následným obarvením gelu stříbrem. Do gelu byla dávkována protilátka ve stejné koncentraci jako byla v roztoku při vazbě na částice, dále roztok po vazbě a také jednotlivé promývací kroky. Tento postup byl opakován celkem 3x a vždy se stejným výsledkem viz obarvený gel stříbrem (viz obr. č. 49)

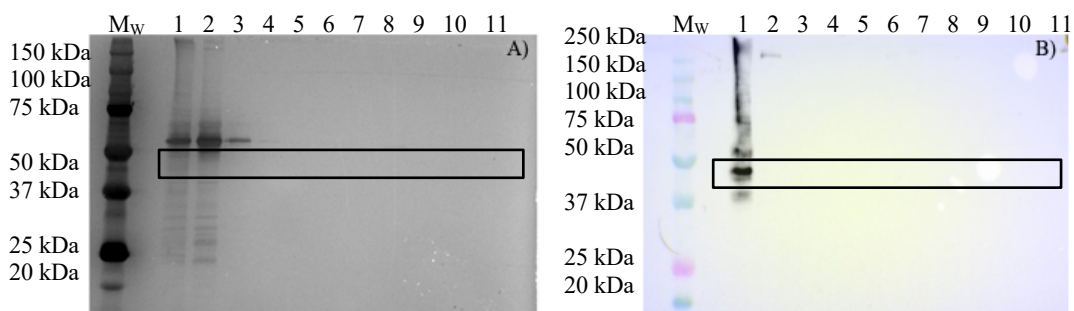


Obrázek 49 – Gel obarvený stříbrem. Analýza úspěšnosti přípravy nosiče, ověření účinnosti vazby IgG na magnetické částice ProMag COOH.

M<sub>w</sub> – standard molekulových hmotností, 1 – roztok protilátky (před vazbou), 2 – vazebná frakce (po vazbě), 3 – promývací krok 1, 4 – promývací krok 2, 5 – promývací krok 3, 6 – promývací krok 4, 7 – promývací krok 5.

V první frakci byl viditelný proužek odpovídající přítomnosti IgG protilátky proti CerS2. Ve frakci 2 byl výrazný úbytek molekul IgG po vazbě na magnetické částice. Ve frakcích promývacích kroků nebyl viditelný žádný proužek značící případné vymývání IgG molekuly s magnetických částic. Výsledky z tohoto gelu potvrdily úspěšnou vazbu protilátky proti CerS2 na magnetické částice. Na takto připravený nosič byl nejprve vázán CerS2 z buněčného lyzátu se zvýšenou expresí CerS2 pro vyzkoušení podmínek sorpce a eluce. Jako první byla zvolená kyselá eluce. Eluce byla provedena pomocí glycinového pufru o pH 2,5, který narušuje interakci mezi protilátkou a navázaným proteinem snížením pH.

Částice byly nejprve promyty PBS pufrem, dále byl k magnetickým přidán 10 x naředěný buněčný lyzát. Vzorek byl ponechán inkubovat s připraveným nosičem přes noc na rotátoru v lednici. Po ukončení inkubace byl od částic odebrán supernatant (vazebná frakce). Následně byly částice promyty 5 x studeným PBS (promývací kroky) a následně byla 5 x provedena eluce glycinovým pufrem. Vazebná frakce, jednotlivé promývací a eluční kroky byly dále analyzovány pomocí elektroforézy s následným obarvením gelu stříbrem a také pomocí WB s imunochemickou detekcí pro protein CerS2.



Obrázek 50 – Analýza vazebné frakce, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z buněčného overexpression CerS2 lyzátu a eluci glycinovým pufrem. A – gel obarvený stříbrem, B – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2.

M<sub>w</sub> – standard molekulových hmotností, 1–10 x naředěný buněčný lyzát, 2 – vazebná frakce (po vazbě), 3 – promývací krok 1, 4 – promývací krok 2, 5 – promývací krok 3, 6 – promývací krok 4, 7 – kyselá eluce 1, 8 – kyselá eluce 2, 9 – eluce 3, 10 eluce 4, 11– eluce 5.

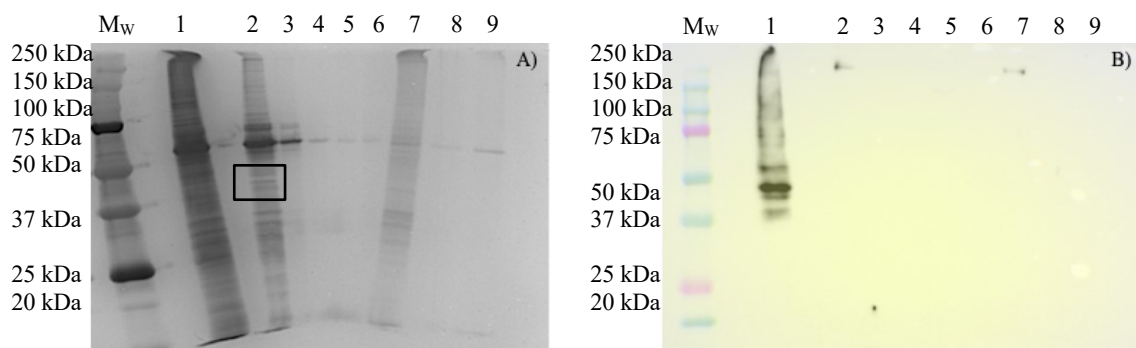
Ve vyznačeném rámečku nebyl na obrázku č. 50 A) v očekávané oblasti molekulové hmotnosti v rozmezí 37 a 45 kDa mezi prvními dvěma frakcemi 1 a 2

patrný úbytek intenzity proužku, který by značil navázání CerS2. Nicméně v dalších promývacích a elučních frakcích nebyl v této oblasti žádný proužek, který by znamenal uvolnění CerS2 při promývacích krocích či při jednotlivých krocích kyselé eluce.

Ve vyznačeném rámečku byla na obrázku č. 50 B) patrná přítomnost specifického proužku pro sledovaný protein CerS2 pouze v buněčném lyzátu před vazbou, Nicméně v dalších promývacích a elučních frakcích nebyl v této oblasti žádný proužek, který by znamenal uvolnění CerS2 při promývacích krocích či při jednotlivých krocích kyselé eluce.

Tento výsledek lze vysvětlit tak, že sice došlo k navázání enzymu CerS2 na imunosorbent, ale že se nepodařilo kyselou elucí protein uvolnit. Nepatrný náznak specifické reakce s protilátkou byl ve vazebné frakci 2, kde se nejspíše jednalo o zbylý nenavázaný CerS2 z roztoku.

Po předchozí neúspěšné kyselé eluci, byla na tom stejném nosiči provedena dodatečná eluce 1% deoxycholátem (DOC) v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Deoxycholát je mírný detergent a narušuje hydrofobní interakce a současně umožňuje zachovat proteiny v solubilní formě.



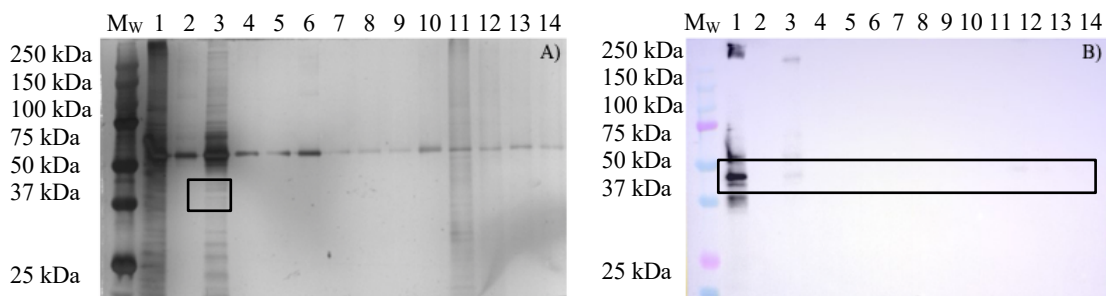
Obrázek 51 – Analýza vazebné frakce, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z buněčného overexpression CerS2 lyzátu a eluci 1% deoxycholátu v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . A – gel obarvený stříbrem, B – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2.

$M_w$  – standard molekulových hmotností, 1 – 10 x naředěný buněčný lyzát, 2 – vazebná frakce (po vazbě), 3 – promývací krok 1, 4 – promývací krok 2, 5 – promývací krok 3, 6 – roztok ve kterém byly uchováván nosič, 7 – eluce deoxycholátem 1, 8 – eluce deoxycholátem 2, 9 – eluce deoxycholátem 3.

Na obrázku č. 51 A) byl ve frakci 2 pozorován nepatrný náznak projasnění (označen rámečkem), který mohl značit úspěšné navázání CerS2. Ve frakci 7 bylo patrné, že se nějaké proteiny eluují z nosiče. Proto byly stejné frakce analyzovány i pomocí WB s imunochemickou detekcí pro protein CerS2.

Ve vyznačeném rámečku na obr. č. 51 B) byl signál odpovídající molekulovou hmotností a reaktivitou se specifickou protilátkou proteinu CerS2 patrný opět pouze ve frakci před vazbou – buněčném lyzátu. Nicméně v dalších promývacích a elučních frakcích nebyl v této oblasti žádný proužek, který by znamenal uvolnění CerS2 při promývacích krocích či při jednotlivých krocích kyselé eluce i eluce deoxycholátem. Ve frakcích 2 a 7 byl nepatrný náznak proužku okolo 250 kDa. Ve frakci 2 mohl tento proužek odpovídat proteinu CerS2, který zůstal v roztoku po vazbě a nenavázal se. Ve frakci 7 se mohlo o uvolněný protein CerS2 po eluci, nicméně tyto proužky byly v oblasti velmi vysoké molekulové hmotnosti. Na základě elektroforetických analýz dílčích frakcí bylo zjištěno, že byl-li protein CerS2 navázaný na nosiči, tak se ho pomocí kyselé eluce a eluce deoxycholátem nepodařilo uvolnit.

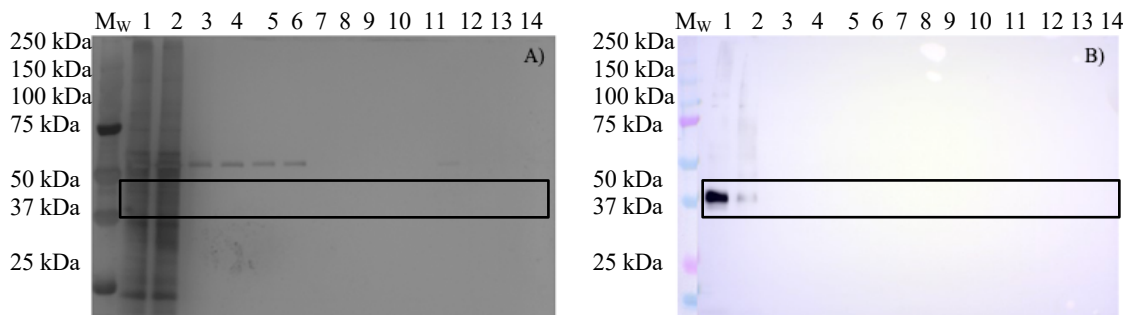
Dále byly připraveny dva další nosiče stejným postupem popsaných výše. Na 0,5 mg karboxylovaných částic bylo imobilizováno 2,5 µg specifické protilátky proti proteinu CerS2. CerS2 byl na těchto dvou nosičích vázán z buněčného lyzátu se zvýšenou expresí CerS2 a také z homogenátu jaterní tkáně. Byly zařazeny tři typy elucí: kyselá eluce, eluce deoxycholátem a následně dodatečná zásaditá eluce.



Obrázek 52 – Analýza vazebné frakce, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z buněčného overexpression CerS2 lyzátu a eluci glycinovým pufrům a 1% deoxycholátem v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . A – Gel obarvený stříbrem. B – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2.

$M_w$  – standard molekulových hmotností, 1 – 10 x naředěný buněčný lyzáát, 2 – vazebná frakce (po vazbě), 3 – promývací krok 1, 4 – promývací krok 2, 5 – promývací krok 3, 6 – promývací krok 4, 7 – kyselá eluce 1, 8 – kyselá eluce 2, 9 – kyselá eluce 3, 10 – kyselá eluce 4, 11 – eluce DOC 1, 12 – eluce DOC 2, 13 – eluce DOC 3, 14 – eluce DOC 4

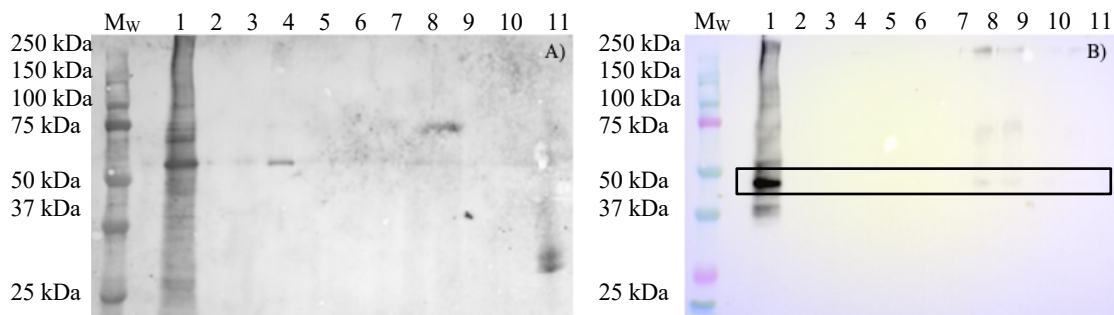
Na obrázku č. 52 ve výsledku z obarveného gelu stříbrem (A) byl mezi 1 a 2 frakcí viditelný rozdíl. Na nosič se navázalo téměř vše nejen pouze CerS2. Ve frakci 3 promývacím kroku bylo viditelné, že se většina nečistot uvolnila. Bylo pozorováno nepatrné projasnění ve vyznačeném rámečku ve frakci 3 okolo 45 kDa to naznačuje, že zůstal navázaný pouze CerS2. Ve frakci 11, tedy ve vzorku po eluci deoxycholátem jsou opět vidět proteiny uvolňující se z nosiče, nikoliv pouze uvolnění samostatného CerS2. Tyto frakce byly také analyzovány pomocí imunochemické detekce (B). V rámci uvedeného experimentu vyplývá, že pravděpodobně došlo znovu ke specifické sorpci izolované CerS2 na nosič se specifickou protilátkou, ale nepodařilo se ani tentokrát protein uvolnit. Tento výsledek byl obdobný i v případě nosiče, na který byl vázán CerS2 z homogenátu jaterní tkáně. Výsledky byly obdobné (viz obr.č.53)



Obrázek 53 – Analýza vazebné frakce, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z jaterního homogennátu. Eluce glycinovým pufrem a 1% deoxycholátem v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . A – gel obarvený stříbrem, B – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2.

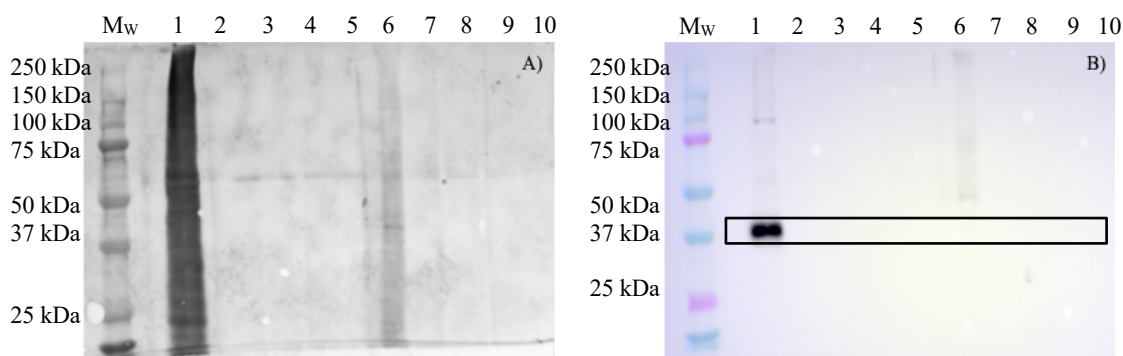
M<sub>w</sub> – standard molekulových hmotností, 1 – 10 x jaterní homogennát, 2 – vazebná frakce (po vazbě), 3 – promývací krok 1, 4 – promývací krok 2, 5 – promývací krok 3, 6 – promývací krok 4, 7 – kyselá eluce 1, 8 – kyselá eluce 2, 9 – kyselá eluce 3, 10 – kyselá eluce 4, 11 – eluce DOC 1, 12 – eluce DOC 2, 13 – eluce DOC 3, 14 – eluce DOC 4.

Na základě předchozích neúspěšných pokusů o eluci CerS2 a výsledků naznačujících jeho setrvání na nosiči, byl zařazen dodateční eluční krok pomocí zásaditých podmínek 1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  který zvýšením pH narušuje elektrostatické interakce mezi protilátkou a navázaným proteinem.



Obrázek 54 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. A – Membrána obarvená stříbrem, B – Imunochemická detekce pro protein CerS2. Analýza, promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z buněčného lyzátu. Zásaditá eluce.

M<sub>w</sub> – standard molekulových hmotností, 1 – 10 x naředěný buněčný lyzát, 2 – promývací krok 1, 3 – promývací krok 2, 4 – promývací krok 3, 5 a 6 – roztok ve kterém byly částice uchovávány, 7 – zásaditá eluce 1, 8 – zásaditá eluce 2, 9 – zásaditá eluce 3, 10 – zásaditá eluce 4, 11 – zásaditá eluce 5.



Obrázek 55 – Western blot analýza s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. A – Membrána obarvená stříbrem, B – Imunochemická detekce pro protein CerS2. Analýza promývacích kroků a elučních frakcí po vazbě CerS2 z jaterního homogenátu. Zásaditá eluce.

M<sub>w</sub> – standard molekulových hmotností, 1 – 10 x naředěný jaterní homogenát, 2 – promývací krok 1, 3 – promývací krok 2, 4 – promývací krok 3, 5 – roztok ve kterém byly částice uchovávány, 6 – zásaditá eluce 1, 7 – zásaditá eluce 2, 8 – zásaditá eluce 3, 9 – zásaditá eluce 4, 10 – zásaditá eluce 5.

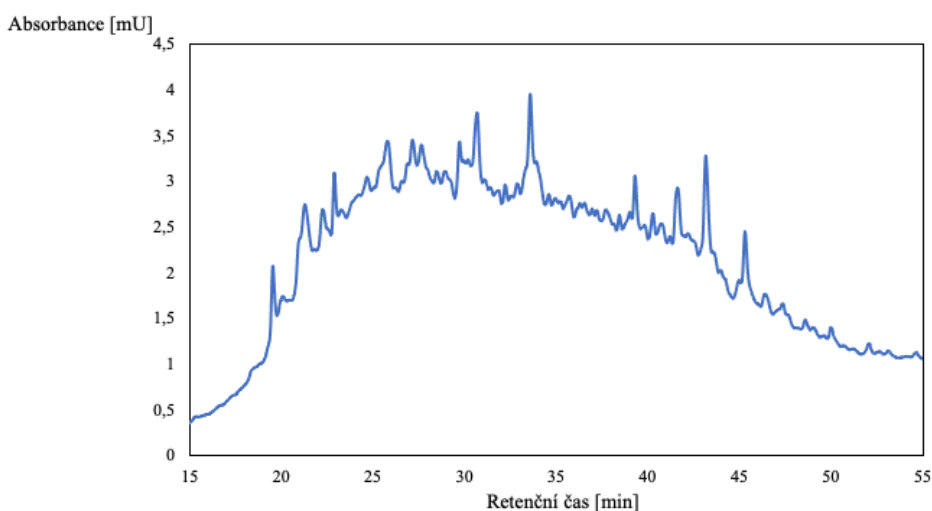
Po přenosu proteinů na membránu a jejím obarvením stříbrem byla přítomnost proteinů zaznamenána pouze v kontrolním vzorku buněčného lyzátu (viz obr. č. 54 A). Nepatrně také v promývacím kroku 3 (frakce 4), v ostatních nikoliv.

Ve vyznačeném rámečku na membráně po imunochemické detekci pro protein CerS2 (obr.č. 54 A) byly přítomnost specifického proužku pro CerS2 detekována pouze ve frakci před vazbou, ve frakcích 7 a 8 (v prvních dvou elučních krocích) jsou nepatrné náznaky reakce. Protein CerS2 se v elučních frakcích a ani v promývacích nepodařilo prokázat. Po přenosu proteinů na membránu a jejím obarvením stříbrem (A) (viz obr.č.55) byla přítomnost proteinů patrná ve frakci 1 kontrolním vzorku homogenátu tkáně jater a ve frakci 6, prvním kroku zásadité eluce.

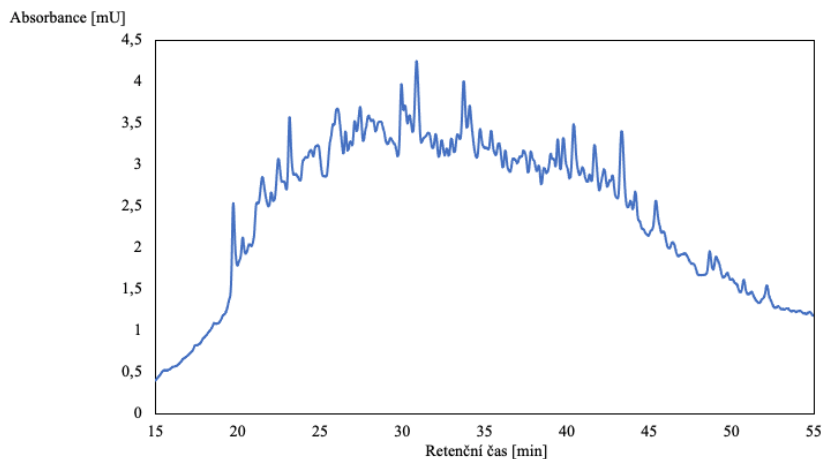
Pomocí imunochemické detekce byla ve vyznačeném rámečku na membráně (B) detekována přítomnost proužku odpovídající sledovanému proteinu CerS2 pouze ve vzorku homogenátu jaterní tkáně (kontrolním vzorku). Nicméně v dalších promývacích a elučních frakcích nebyl v této oblasti žádný proužek, který by znamenal uvolnění CerS2 při promývacích krocích či při jednotlivých krocích. K úspěšné eluci proteinu CerS2 z nosiče ani v tomto případě (za těchto podmínek) nedošlo.

Proto byl navržen další postup, jak přítomnost CerS2 na povrchu nosiče prokázat. Po promytí imunosorbentu 5 x  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  byl k částicím přidán trypsin v hmotnostním poměru 1:20 v celkovém objemu 50  $\mu\text{l}$ . Záměrem tohoto kroku bylo pomocí LC-MS analýzy identifikovat CerS2 ve směsi tryptických peptidů získaných štěpením proteinů navázaných na magnetické částice a potvrdit tím navázání CerS2 na nosič.

Enzymatické štěpení trypsinem probíhalo přes noc při 37 °C. Po uplynutí inkubace byl od magnetických částic odebrán supernatant, okyselen 5% TFA a vysušen. Následně byly vzorky přečištěny na mikrokolonkách, dle již použitého postupu při přípravě vzorků štěpení v gelu. Takto připravené vzorky byly uchovány pro další analýzy pomocí LC-UV a LC-MS. LC-UV metodou poskytnuté výsledky značí přítomnost peptidů a také částečně čistotu daného vzorku. LC-MS analýza byla použita k identifikaci CerS2 ve směsi peptidů.

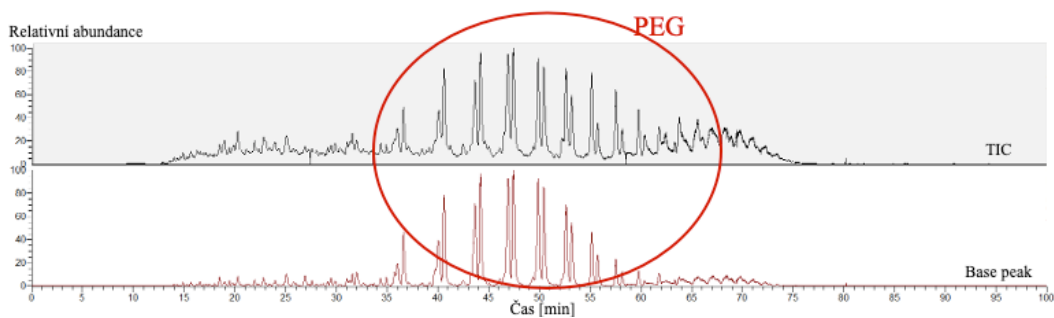


*Graf 8 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky po naštěpení nosiče s vazbou z jater.*

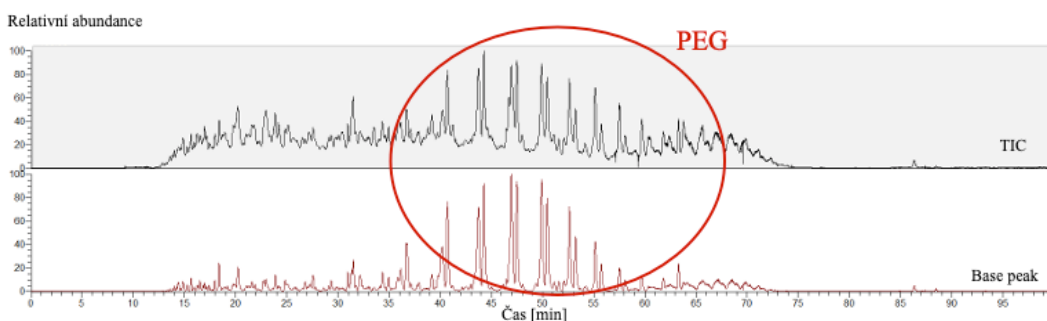


Graf 9 – Záznam chromatogramu z kapalinového chromatografu s UV detekcí při 215 nm, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% TFA, vzorky po naštěpení nosiče s vazbou z buněčného lyzátu.

V obou případech analýzy vzorků peptidických směsí vzorků po na štěpení bylo pomocí LC-UV analýz detekováno velké množství peptidického materiálu (viz grafy č. 8 a 9).



Obrázek 57 – Záznam LC-MS analýzy vzorků po štěpení nosiče s vazbou z jaterního homogenátu, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% FA, nanoESI, Q exactive



Obrázek 56 — Záznam LC-MS analýzy vzorků po štěpení nosiče s vazbou z buněčného lyzátu, reverzní fáze C18, mobilní fáze gradient ACN/0,1% FA, nanoESI, Q exactive

V záznamu LC-MS analýz (viz obr. č.56 A 57) byla v obou případech patrná přítomnost polyethylenglykolu (PEG) vyznačené červeným oválem. Ten mohl ovlivňovat samotnou analýzu. Pravděpodobně stál i za intenzivním signálem z LC-UV.

Vzorky byly opět analyzovány pomocí kapalinové chromatografie na reverzní fázi (C18) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q-exactive. Peptidy byly separovány pomocí gradientu ACN/0,1% FA (4-34%). Analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru Q Exactive, který kombinuje kvadrupólový filtr s detekcí v Orbitrap analyzátoru. Identifikace proteinů byla provedena pomocí softwaru Proteome Discoverer.

I přes kontaminaci vzorků PEG se pomocí LC-MS podařilo identifikovat CerS2 v obou vzorcích naštěpených nosičů. U vzorku získaného štěpením nosiče s vazbou z prasečí jaterní tkáně bylo identifikováno celkem 1942 proteinových skupin, přítomnost CerS2 byla potvrzena identifikací 4 specifických peptidů pro CerS2. U vzorku získaného štěpením nosiče s vazbou z buněčného lyzátu (HEK buněk) s nadměrnou expresí CerS2 bylo identifikováno celkem 2516 proteinových skupin a přítomnost CerS2 byla potvrzena identifikací 8 specifických peptidů pro CerS2. Pomocí MS analýz se potvrdilo, že CerS2 zůstal navázaný na obou nosičích. Použitá protilátka nebyla nejlepší volbou pro afinitní chromatografii, protože se na ni CerS2 navázal opravdu pevně, když ho nebylo možné několika různými typy elucí z nosiče eluovat. V tabulce č. 11 jsou znázorněné jednotlivé identifikované peptidy po inkubaci obou nosičů s trypsinem.

Tabulka 11 – Identifikované peptidy po naštěpení nosičů, vyhodnoceno v Proteome Discoverer.

Identifikované peptidy	Štěpení nosičů	
	Prasečí játra	HEK buňky (lidské)
ASPNPTLEHFYLTSGK	✓	
APPNATLEHFYLTSGK		✓
QVEVELLSR	✓	✓
ASPNPTLEHFYLTSGKQPK	✓	
APPNATLEHFYLTSGKQPK		✓
LRAPPNATLEHFYLTSGK		✓
LRASPNPTLEHFYLTSGKQPK		
NQDRPSLLK	✓	
AGTLIMALHDSSDYLLSAK	✓	✓
SRPLANGHPILNNHR		✓
SDREETESSEGEAAAAGGGAK		✓
LVEDERSDREETESSEGEAAAAGGGAK		✓

Ve vzorcích získaných štěpením nosičů bylo pomocí LC-MS identifikováno celkem 11 peptidů specifických pro sledovaný protein Cers2. Jeden peptid (QVEVELLSR) byl identifikován v obou případech a má stejnou sekvenci jak u prasečí CerS2, tak i u lidské Cers2. Dále byl také v obou případech identifikován peptid, který se liší mezi lidskou a prasečí CerS2 složením pouze dvěma aminokyselinami (ASPNPTLEHFYLTSGK a APPNATLEHFYLTSGK). Bylo identifikováno několik dalších peptidových fragmentů s vynechaným místem štěpení (tzv. missed cleavage).

V jednotlivých sekvencích (prasečí i lidské) proteinu CerS2 jsou vyznačené jednotlivé identifikované peptidy po štěpení nosičů po vazbě z jaterního homogenátu a buněčného lyzátu lidských buněk s nadměrnou expresí proteinu CerS2.

- Sekvence prasečí CerS2 (A0A287A843)

10	20	30	40	50	60
MEDRMLQTLY	DYFWWERLWL	PVNLTWADLE	DRDGRVYAKA	SDLYITLPLA	LVFLIIRYFF
70	80	90	100	110	120
ELYVATPLAA	LLNVKEKTRL	<b>RASPNTLEH</b>	<b>FYLTSQKQPK</b>	<b>QVEVELLSRQ</b>	SGLSARQVER
130	140	150	160	170	180
WFRRRRNQDR	<b>PSLLK</b> KFREAA	SWRFTFYLIA	FIAGMAVIVD	KPWFYDMRKV	WEGYPIQSTI
190	200	210	220	230	240
PSQYWYIMIE	LSFYWSLLFS	IASDVKRKDF	KEQIIHHVAT	IILISFSWFA	NYVR <b>AGTLIM</b>
250	260	270	280	290	300
<b>ALHDSSDYLL</b>	<b>ESAK</b> MFNYAG	WKNTCNNIFI	VFAIVFIITR	LVILPFWILH	CTLVYPLELY
310	320	330	340	350	360
PAFFGYFFN	FMMGVLQLLH	IFWAYLILRM	AHKFITGKLV	EDERSDREET	ESSEGEEAAA
370	380				
GGGAKSRPLA	NGHPILSNNH	RKND			

- Sekvence lidské CerS2 (Q96G23)

10	20	30	40	50	60
MLQTLYDYFW	WERLWLPVNL	TWADLEDRDG	RVYAKASDLY	ITLPLALLFL	IVRYFFELYV
70	80	90	100	110	120
ATPLAALLNI	KEKTRLR <b>APP</b>	<b>NATLEHFYLT</b>	<b>SGKQPKQVEV</b>	<b>ELLSRQ</b> SGLS	GRQVERWFRR
130	140	150	160	170	180
<b>RRNQDRPSLL</b>	<b>KK</b> FREASWRF	TFYLIAFIAG	MAVIVDKPWF	YDMKKWEGY	PIQSTIPSQY
190	200	210	220	230	240
WYIMIELSFY	WSLLFSIASD	VKRKDFKEQI	IHHVATIILI	SFSWFANYIR	<b>AGTLIMALHD</b>
250	260	270	280	290	300
<b>SSDYLL</b> <b>ESAK</b>	MFNYAGWKNT	CNNIFIVFAI	VFIITRLVIL	PFWILHCTLV	YPLELYPAFF
310	320	330	340	350	360
GYFFNSMMG	VLQLLHIFWA	YLILRMAHKE	ITGK <b>LVEDER</b>	<b>SDREETESSE</b>	<b>GEEAAAGGGA</b>
370	380				
<b>KSRPLANGHP</b>	<b>ILNNNHR</b> KND				

## DISKUSE

V rámci experimentální části této diplomové práce byla zavedena a optimalizována metoda pro izolaci enzymu CerS2 z prasečí tkáně jater a pankreatu. Cílem bylo ověřit možnosti detekce a následné identifikace CerS2 pomocí imunochemických a hmotnostně spektrometrických metod. Pro izolaci membránových frakcí obsahujících CerS2 byl použit izolační pufr MIB-L doporučený v literatuře [93] pro izolaci endoplazmatického retikula z jaterní tkáně. Tento pufr byl vhodný pouze pro homogenizaci jaterní tkáně. V případě pankreatické tkáně docházelo k významné degradaci proteinu. Výsledky naznačují nevhodnost tohoto pufru pro pankreatickou tkáň, pravděpodobně kvůli vyšší proteolytické aktivitě tkáně pankreatu oproti jaterní. Dalším významným faktorem ovlivňujícím kvalitu izolovaného proteinu se ukázala část dané tkáně, ze které byl daný vzorek odebrán. Pro analýzu CerS2 je vhodné odebrat vzorek z centrální části orgánu, nikoliv z periferních konců. Protein CerS2 mohl být v důsledku uchování části tkáně v - 80 °C v okrajových částech již degradovaný.

Alternativní izolační postup využívající 2% SDS, jako roztok pro homogenizaci tkáně a samotnou izolaci, umožnil efektivní izolaci CerS2 z tkáně jater i pankreatu. Jako neoptimálnější se ukázala 2% koncentrace SDS. Tyto získané poznatky korespondují se článkem [134], kde pro identifikace membránových proteinů pomocí metody WB a LC-MS analýzy byly tkáně myšího mozku homogenizovány ve 2% SDS obsahujícího 100 mM DTT a 100 mM Tris. V budoucích experimentech by bylo možné vyzkoušet i jiné typy izolačních roztoků a také přídavek inhibitorů proteáz, které by mohly minimalizovat proteolýzu CerS2 ve tkáni pankreatu a který je zmiňován při izolaci CerS2 [115].

Dalším přínosem této práce bylo zavedení a ověření izolačního protokolu CerS2 z prasečí tkáně jater a pankreatu. Pomocí hmotnostní spektrometrie se podařilo úspěšně identifikovat celkem 6 specifických peptidů pro CerS2, a to ve vzorcích připravených různými postupy. Pro LC-MS analýzu a identifikaci CerS2 byly vzorky připravené pomocí štěpení v gelu, štěpení v roztoku a také pomocí štěpení v roztoku s následnou manuální bazickou frakcionací. V následující tabulce č. 12

jsou shrnuté počty identifikovaných peptidů v rámci jednotlivých protokolů přípravy vzorků pro MS analýzy.

Tabulka 12 – Přehled počtu identifikovaných peptidů specifických pro protein CerS2.

Protokol	Tkáň jater	Tkáň pankreatu
Štěpení v gelu	4	3
Štěpení v roztoku	2	0
Štěpení v roztoku s následnou bazickou frakcionací	4	2

Štěpení v gelu a bazická frakcionace vedly k identifikaci vyššího počtu peptidů oproti samotnému štěpení v roztoku. To bylo pravděpodobně způsobeno efektivnějším rozdělením směsi při elektroforéze a frakcionaci, které je potřebné k identifikaci vyššího počtu peptidů.

Ve studii [135], která analyzovala proteom perfuzního roztoku (tekutiny obsahující intracelulární proteiny uvolněné z orgánů) a porovnávala výtěžnost metod štěpení v roztoku a v gelu, vedlo štěpení v roztoku k vyššímu počtu identifikovaných proteinů než štěpení v gelu. V této práci zaměřené na analýzu komplexních homogenátů jaterní a pankreatické tkáně bylo naopak vyššího počtu identifikovaných peptidů specifických pro CerS2 dosaženo metodou štěpení v gelu. Tento rozdíl odráží vyšší komplexitu analyzovaných tkáňových homogenátů ve srovnání perfuzními roztoky.

Identifikované peptidy specifické pro CerS2 z prasečí tkáně jater a pankreatu se vyskytovaly opakovaně napříč měřeními, konkrétně nejčastěji byly zastoupeny tyto dva: ASPNPTLEHFYLTSGK a QVEVELLSR.

Získaná data by mohla v budoucnu sloužit jako základ pro cílené metody hmotnostně spektrofotometrickém kvantifikace proteinu CerS2. Získaná LC-MS data tak potvrzují nejen úspěšnost izolačního postupu, ale zároveň také poskytují výchozí bod pro případný další vývoj metodiky směrem k přesnějšímu sledování CerS2 v různých biologických materiálech.

Izolace CerS2 z lidské krve byla doprovázena několika technickými problémy. V plné nesrážlivé krvi došlo k hemolýze a interferenci mezi hemem a detekčním

chemiluminiscenčním činidlem, což znemožnilo specifickou detekci enzymu CerS2. Úspěšné izolace CerS2 byly dosaženo z vrstvy buffy coat, a tím byla potvrzena skutečnost, že je CerS2 přítomný v membráně bílých krvinek. Přítomnost CerS2 v membránách bílých krvinek byla potvrzena pouze imunochemickou detekcí. V dalších experimentech by bylo vhodné identifikovat CerS2 i pomocí hmotnostní spektrometrie jako tomu bylo v případě vzorků připravených z tkání. Pro budoucí experimenty by bylo také vhodné vyzkoušet izolaci CerS2 z buffy coatu s využitím jiných izolačních pufrů, například MIB-C, který je v literatuře popsán [93] pro izolaci ER z buněk a mohl by představovat šetrnější variantu než použitý MIB-L. Tento pufr MIB-C se od něj liší tím, že neobsahuje BSA a EGTA, čímž by mohl minimalizovat interferenci při následných analýzách. Dále je možné testovat i izolaci pomocí 2% SDS, která se osvědčila u tkání a může poskytnout dostatečný výtěžek i z krevních buněk.

Pokusy o afinitní purifikaci CerS2, z jaterního homogenátu a buněčného lyzátu buněk s nadměrnou expresí CerS2, pomocí imobilizovaných protilátek na magnetických částicích dávaly nejednoznačné výsledky. Dle výsledků gelové elektroforézy se lze domnívat, že se sice enzym CerS2 se na nosič navázal, ale nebylo ho možné standardními metodami úspěšně eluovat. To bylo pravděpodobně způsobeno vysokou afinitou zvolených protilátek imobilizovaných na magnetické částice. Pro ověření této hypotézy byl imunosorbent inkubován s trypsinem. Předpoklad byl, že jsou-li na sorbentu zachycené molekuly CerS2, podaří se je trypsinem postupně naštěpit a vzniklé fragmenty postupně z nosiče uvolnit. Tyto peptidy by měly být poté prokázány pomocí LC-MS. Pomocí LC-MS analýz se skutečně potvrdila přítomnost CerS2 a zároveň také to, že na nosič se společně navázalo spoustu jiných proteinů. Tyto výsledky jasně určují směr dalšího výzkumu. Bude nutné potlačit při izolaci vysokou míru nespecifické sorpce, např. volnou jiného materiálu magnetických částic. Vhodné by bylo zkusit jak hydrofilní, tak i hydrofobní materiál. Ideální by bylo najít podmínky, kdy by se preferenčně na nosič vázal enzym CerS2 a všechny další membránové i cytosolové proteiny by byly odmyty. Cílem je tedy nejen izolovat enzym pomocí

specifické protilátky, ale zajistit, aby tento protein nebyl kontaminován dalšími proteiny, které výrazně omezují potenciál MS analýzy.

## ZÁVĚR

Studium enzymu ceramidsyntáza 2 vychází z rostoucího zájmu o pochopení změn lipidového metabolismu u nádorových onemocnění. Nádorové buňky vykazují změny nejen v množství lipidů, ale také v aktivitě enzymů, které se podílejí na jejich syntéze. CerS2 je jedním z enzymů, který může hrát důležitou roli v patogenezi některých typů rakoviny. Detailnější studium CerS2 by mohlo v budoucnu přispět lepší diagnostice nádorových onemocnění.

Diplomová práce se zabývala studiem a sledováním enzymu ceramidsyntáza 2 v prasečích tkáni jater a pankreatu, dále také jeho izolací z lidských krve. Cílem bylo navrhnout a optimalizovat izolační protokol, pro několik typů vzorků, který by umožnil spolehlivou detekci proteinu CerS2. Pro ověření těchto protokolů bylo využito několik analytických metod včetně hmotnostní spektrometrie. I přes některé překážky se podařilo zavést metodu pro izolaci CerS2 z tkáně jater a pankreatu, která může být využitelná jako podklad pro další experimenty vedoucí ke kvantifikaci enzymu, sledování jeho aktivity nebo jeho změn při patologických procesech. Pomocí hmotnostní spektrometrie se podařilo identifikovat CerS2 v tkáni jater i pankreatu. Získaná data mohou být využita při cílené analýze CerS2.

Izolace z lidské krve byla úspěšná pouze z vrstvy buffy coat a byla potvrzena pomocí analýzy Western blot s imunochemickou detekcí pro protein CerS2. Tím byla potvrzena přítomnost CerS2 v membráně bílých krvinek.

Dalším cílem této práce bylo optimalizovat podmínky sorpce a eluce CerS2 z tkání jater metodou afinitní chromatografie. Afinitní chromatografie s použitou protilátkou proti CerS2 imobilizovanou na magnetických částicích poskytla nejednoznačné výsledky. Na nosiči se spolu se sledovaným proteinem pomocí MS bylo identifikováno mnoho dalších proteinů. Vhodné by bylo otestovat i jiné afinitní ligandy.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. LUO, Xiangjian; CHENG, Can; TAN, Zheqiong; LI, Namei; TANG, Min et al. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. Online. *Molecular Cancer*. 2017, roč. 16, č. 1. doi: 10.1186/s12943-017-0646-3.
2. CUI, Meng-Ying; YI, Xing; ZHU, Dan-Xia a WU, Jun. The Role of Lipid Metabolism in Gastric Cancer. Online. *Frontiers in Oncology*. 2022, roč. 12. doi: 10.3389/fonc.2022.916661.
3. KRAUSS, Dana; FARI, Ourania a SIBILIA, Maria. Lipid Metabolism Interplay in CRC—An Update. Online. *Metabolites*. 2022, roč. 12, č. 3, doi: 10.3390/metabo12030213.
4. VASSEUR, Sophie a GUILLAUMOND, Fabienne. Lipids in cancer: a global view of the contribution of lipid pathways to metastatic formation and treatment resistance. Online. *Oncogenesis*. 2022, roč. 11, č. 1. doi: 10.1038/s41389-022-00420-8.
5. MUNIR, Rimsha; LISEC, Jan; SWINNEN, Johannes V. a ZAIDI, Nousheen. Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. Online. *British Journal of Cancer*. 2019, roč. 120, č. 12, s. 1090-1098. doi: 10.1038/s41416-019-0451-4.
6. YIN, Xinpeng; XU, Ruiyuan; SONG, Jianlu; RUZE, Rexiati; CHEN, Yuan et al. Lipid metabolism in pancreatic cancer: emerging roles and potential targets. Online. *Cancer Communications*. 2022, roč. 42, č. 12, s. 1234-1256. doi: 10.1002/cac2.12360.
7. SUNAMI, Yoshiaki; REBELO, Artur a KLEEFF, Jörg. Lipid Metabolism and Lipid Droplets in Pancreatic Cancer and Stellate Cells. Online. *Cancers*. 2018, roč. 10, č. 1. doi: 10.3390/cancers10010003.
8. LI, Biao; MI, Jing a YUAN, Qi. Fatty acid metabolism-related enzymes in colorectal cancer metastasis: from biological function to molecular mechanism. Online. *Cell Death Discovery*. 2024, roč. 10, č. 1. doi: 10.1038/s41420-024-02126-9.
9. ZAYTSEVA, Yekaterina. Lipid Metabolism as a Targetable Metabolic Vulnerability in Colorectal Cancer. Online. *Cancers*. 2021, roč. 13, č. 2. doi: 10.3390/cancers13020301.
10. LI, Ying; NICHOLSON, Rebekah J. a SUMMERS, Scott A. Ceramide signaling in the gut. Online. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2022, roč. 544. doi: 10.1016/j.mce.2022.111554.
11. VANAUBERG, Dimitri; SCHULZ, Céline a LEFEBVRE, Tony. Involvement of the pro-oncogenic enzyme fatty acid synthase in the hallmarks of cancer: a promising target in anti-cancer therapies. Online. *Oncogenesis*. 2023, roč. 12, č. 1. doi: 10.1038/s41389-023-00460-8.
12. HUNT, Elizabeth G.; HURST, Katie E.; RIESENBERG, Brian P.; KENNEDY, Andrew S.; GANDY, Evelyn J. et al. Acetyl-CoA carboxylase obstructs CD8+ T cell lipid utilization in the tumor microenvironment. Online. *Cell Metabolism*. 2024, roč. 36, č. 5, s. 969-983.e10. doi: 10.1016/j.cmet.2024.02.009.

13. PICCININ, Elena; CARIELLO, Marica a MOSCHETTA, Antonio. Lipid metabolism in colon cancer: Role of Liver X Receptor (LXR) and Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1). Online. *Molecular Aspects of Medicine*. 2021, roč. 78. doi: 10.1016/j.mam.2020.100933.
14. GU, Qiuying; WANG, Yuan; YI, Ping a CHENG, Chunming. Theoretical framework and emerging challenges of lipid metabolism in cancer. Online. *Seminars in Cancer Biology*. 2025, roč. 108, s. 48-70. doi: 10.1016/j.semcancer.2024.12.002.
15. PARK, Joo-Won; PARK, Woo-Jae a FUTERMAN, Anthony H. Ceramide synthases as potential targets for therapeutic intervention in human diseases. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014, roč. 1841, č. 5, s. 671-681. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.08.019.
16. ZHANG, Qian; WANG, Jin-yan; YAN, Wei; WANG, Dan-dan; YANG, Su-jin et al. Clinical and pathological significance of Homo sapiens ceramide synthase 2 (CerS-2) in diverse human cancers. Online. *Bioscience Reports*. 2019, roč. 39, č. 5. doi:10.1042/BSR20181743.
17. CHENG, Xiaolin a SMITH, Jeremy C. Biological Membrane Organization and Cellular Signaling. Online. *Chemical Reviews*. 2019, roč. 119, č. 9, s. 5849-5880. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00439.
18. WATSON, Helen. Biological membranes. Online. *Essays in Biochemistry*. 2015, roč. 59, s. 43-69. doi: 10.1042/bse0590043.
19. SIMONS, K. a SAMPAIO, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011, roč. 3, č. 10, s. a004697-a004697. doi: 10.1101/cshperspect.a004697.
20. VAN MEER, Gerrit; VOELKER, Dennis R. a FEIGENSON, Gerald W. Membrane lipids: where they are and how they behave. Online. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008, roč. 9, č. 2, s. 112-124. doi: 10.1038/nrm2330.
21. WILLIAM (BILL) W. CHRISTIE. Sphingolipids: Chemistry and Biochemistry An Introduction. Online. An introduction. Dostupné z: [https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb\\_html/lipids/sphingo/introsph/index.htm](https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/sphingo/introsph/index.htm).
22. GRÖSCH, Sabine; SCHIFFMANN, Susanne a GEISLINGER, Gerd. Chain length-specific properties of ceramides. Online. *Progress in Lipid Research*. 2012, roč. 51, č. 1, s. 50-62. doi: 10.1016/j.plipres.2011.11.001.
23. STITH, Jeffrey L.; VELAZQUEZ, Fabiola N. a OBEID, Lina M. Advances in determining signaling mechanisms of ceramide and role in disease. Online. *Journal of Lipid Research*. 2019, roč. 60, č. 5, s. 913-918. doi.org/10.1194/jlr.S092874.
24. OGRETMEN, Besim a HANNUN, Yusuf A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. Online. *Nature Reviews Cancer*. 2004, roč. 4, č. 8, s. 604-616. doi: 10.1038/nrc1411.
25. STIBAN, Johnny; CAPUTO, Laura a COLOMBINI, Marco. Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. Online. *Journal of Lipid Research*. 2008, roč. 49, č. 3, s. 625-634. doi: 10.1194/jlr.M700480-JLR200.

26. ZHANG, Mengmeng; LI, Zhangyun; LIU, Yuwei; DING, Xiao; WANG, Yanyan et al. The ceramide synthase (CERS/LASS) family: Functions involved in cancer progression. Online. *Cellular Oncology*. 2023, roč. 46, č. 4, s. 825-845. doi: 10.1007/s13402-023-00798-6.
27. OHNO, Yusuke; SUTO, Shota; YAMANAKA, Masao; MIZUTANI, Yukiko; MITSUTAKE, Susumu et al. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, roč. 107, č. 43, s. 18439-18444. doi: 10.1073/pnas.1005572107.
28. LEVY, Michal a FUTERMAN, Anthony H. Mammalian ceramide synthases. Online. *IUBMB Life*. 2010, roč. 62, č. 5, s. 347-356. doi: 10.1002/iub.319.
29. LAVIAD, Elad L.; ALBEE, Lee; PANKOVA-KHOLMYANSKY, Irene; EPSTEIN, Sharon; PARK, Hyejung et al. Characterization of Ceramide Synthase 2. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, roč. 283, č. 9, s. 5677-5684. doi: 10.1074/jbc.M707386200.
30. ALIZADEH, Javad; DA SILVA ROSA, Simone C.; WENG, Xiaohui; JACOBS, Joadi; LORZADEH, Shahrokh et al. Ceramides and ceramide synthases in cancer: Focus on apoptosis and autophagy. Online. *European Journal of Cell Biology*. 2023, roč. 102, č. 3. doi: 10.1016/j.ejcb.2023.151337.
31. DING, Song; LI, Guorui; FU, Tinglv; ZHANG, Tianyu; LU, Xiao et al. Ceramides and mitochondrial homeostasis. Online. *Cellular Signalling*. 2024, roč. 117. doi:10.1016/j.cellsig.2024.111099.
32. NGANGA, Rose; OLEINIK, Natalia a OGRETMEN, Besim. Mechanisms of Ceramide-Dependent Cancer Cell Death. Online. In: *Sphingolipids in Cancer*. *Advances in Cancer Research*. Elsevier, 2018, s. 1-25. ISBN 9780128142233. doi:10.1016/bs.acr.2018.04.007.
33. SPASSIEVA, Stefka D.; MULLEN, Thomas D.; TOWNSEND, Danyelle M. a OBEID, Lina M. Disruption of ceramide synthesis by CERS2 down-regulation leads to autophagy and the unfolded protein response. Online. *Biochemical Journal*. 2009, roč. 424, č. 2, s. 273-283. doi:10.1042/BJ20090699.
34. ZELNIK, Iris D.; MESTRE, Beatriz; WEINSTEIN, Jonathan J.; DINGJAN, Tamir; IZRAILOV, Stav et al. Computational design and molecular dynamics simulations suggest the mode of substrate binding in ceramide synthases. Online. *Nature Communications*. 2023, roč. 14, č. 1. doi: 10.1038/s41467-023-38047-x.
35. TIDHAR, Rotem; ZELNIK, Iris D.; VOLPERT, Giora; BEN-DOR, Shifra; KELLY, Samuel et al. Eleven residues determine the acyl chain specificity of ceramide synthases. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2018, roč. 293, č. 25, s. 9912-9921. doi: 10.1074/jbc.RA118.001936.
36. TURPIN-NOLAN, Sarah M. a BRÜNING, Jens C. The role of ceramides in metabolic disorders: when size and localization matters. Online. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020, roč. 16, č. 4, s. 224-233. doi: 10.1038/s41574-020-0320-5.
37. CERS1 protein expression summary. Online. *The Human Protein Atlas*. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000223802-CERS1>.

38. P27544 · CERS1\_HUMAN. Online. UniProt. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P27544/entry>.
39. CERS2 protein expression summary. Online. The Human Protein Atlas. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143418-CERS2>.
40. Q96G23. CERS2\_HUMAN. Online. UniProt. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q96G23/entry#sequences>.
41. CERS3 protein expression summary. Online. The Human Protein Atlas. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000154227-CERS3>.
42. Q8IU89 · CERS3\_HUMAN. Online. UniProt. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8IU89/entry>.
43. CERS4 protein expression summary. Online. The Human Protein Atlas. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000090661-CERS4>.
44. Q9HA82 · CERS4\_HUMAN. Online. UniProt. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9HA82/entry>.
45. CERS5 protein expression summary. Online. The Human Protein Atlas. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139624-CERS5>.
46. Q8N5B7 · CERS5\_HUMAN. Online. UniProt. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8N5B7/entry>.
47. CERS6 protein expression summary. Online. The Human Protein Atlas. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172292-CERS6>.
48. Q6ZMG9 · CERS6\_HUMAN. Online. UniProt. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6ZMG9/entry>.
49. RAICHUR, Suryaprakash. Ceramide Synthases Are Attractive Drug Targets for Treating Metabolic Diseases. Online. PubMed. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849276/>.
50. KIHARA, Akio. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. Online. Progress in Lipid Research. 2016, roč. 63, s. 50-69. doi: 10.1016/j.plipres.2016.04.001.
51. RAICHUR, Suryaprakash; BRUNNER, Bodo; BIELOHUBY, Maximilian; HANSEN, Gitte; PFENNINGER, Anja et al. The role of C16: 0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes: CerS6 inhibition as a novel therapeutic approach. Online. Molecular Metabolism. 2019, roč. 21, s. 36-50. doi: 10.1016/j.molmet.2018.12.008.
52. PAN, Hui; QIN, Wen-Xin; HUO, Ke-Ke; WAN, Da-Fang; YU, Yao et al. Cloning, Mapping, and Characterization of a Human Homologue of the Yeast Longevity Assurance Gene LAG1. Online. Genomics. 2001, roč. 77, č. 1-2, s. 58-64. doi: 10.1006/geno.2001.6614.
53. XIE, Tian; FANG, Qi; ZHANG, Zike; WANG, Yanfei; DONG, Feitong et al. Structure and mechanism of a eukaryotic ceramide synthase complex. Online. The EMBO Journal. 2023, roč. 42, č. 24. doi: [org/10.15252/embj.2023114889](https://doi.org/10.15252/embj.2023114889).
54. TIDHAR, Rotem; BEN-DOR, Shifra; WANG, Elaine; KELLY, Samuel; MERRILL, Alfred H. et al. Acyl Chain Specificity of Ceramide Synthases Is Determined within a Region of 150 Residues in the Tram-Lag-CLN8 (TLC) Domain. Online. Journal of Biological Chemistry. 2012, roč. 287, č. 5, s. 3197-3206. doi: 10.1074/jbc.M111.280271.

55. CINGOLANI, Francesca; FUTERMAN, Anthony H. a CASAS, Josefina. Ceramide synthases in biomedical research. Online. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2016, roč. 197, s. 25-32. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2015.07.026.
56. WEGNER, Marthe-Susanna; SCHIFFMANN, Susanne; PARNHAM, Michael John; GEISSLINGER, Gerd a GRÖSCH, Sabine. The enigma of ceramide synthase regulation in mammalian cells. Online. *Progress in Lipid Research*. 2016, roč. 63, s. 93-119. doi:10.1016/j.plipres.2016.03.006.
57. GARCIA-VALLICROSA, Clara; FALCON-PEREZ, Juan M. a ROYO, Felix. The Role of Longevity Assurance Homolog 2/Ceramide Synthase 2 in Bladder Cancer. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 21. doi:10.3390/ijms242115668.
58. SASSA, Takayuki; HIRAYAMA, Taisuke a KIHARA, Akio. Enzyme Activities of the Ceramide Synthases CERS2–6 Are Regulated by Phosphorylation in the C-terminal Region. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, roč. 291, č. 14, s. 7477-7487. doi: 10.1074/jbc.M115.695858.
59. BORGIO, Christian; D'AMORE, Claudio; SARNO, Stefania; SALVI, Mauro a RUZZENE, Maria. Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases. Online. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021, roč. 6, č. 1. doi: 10.1038/s41392-021-00567-7.
60. NOVGORODOV, Sergei A.; RILEY, Christopher L.; KEFFLER, Jarryd A.; YU, Jin; KINDY, Mark S. et al. SIRT3 Deacetylates Ceramide Synthases. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, roč. 291, č. 4, s. 1957-1973. doi: 10.1074/jbc.M115.668228.
61. HUANG, Jing-Yi; HIRSCHHEY, Matthew D.; SHIMAZU, Tadahiro; HO, Linh a VERDIN, Eric. Mitochondrial sirtuins. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010, roč. 1804, č. 8, s. 1645-1651. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.12.021.
62. KIM, Jiyeon L.; BEN-DOR, Shifra; ROSENFELD-GUR, Eden a FUTERMAN, Anthony H. A novel C-terminal DxRSDxE motif in ceramide synthases involved in dimer formation. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2022, roč. 298, č. 2. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101517.
63. LAVIAD, Elad L.; KELLY, Samuel; MERRILL, Alfred H. a FUTERMAN, Anthony H. Modulation of Ceramide Synthase Activity via Dimerization. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, roč. 287, č. 25, s. 21025-21033. doi: 10.1074/jbc.M112.363580.
64. FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI ILIO, C. a DE LAURENZI, V. Role of Apoptosis in disease. Online. *Aging*. 2012, roč. 4, č. 5, s. 330-349. doi: 10.18632/aging.100459.
65. COSTIGAN A, Hollville E; YAGAMI T, Yamamoto Y; CHENG KT, Piwnicka-Worms D.; TONG X, Tang R a ZHANG C, Liu N. Apoptosis. Online. *NCBI Bookshelf*. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499821/>.
66. ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Online. *Toxicologic Pathology*. 2007, roč. 35, č. 4, s. 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
67. COLOMBINI, Marco. Membrane Channels Formed by Ceramide. Online. In: GULBINS, Erich a PETRACHE, Irina (ed.). *Sphingolipids: Basic Science and*

- Drug Development. Handbook of Experimental Pharmacology. Vienna: Springer Vienna, 2013, s. 109-126. ISBN 978-3-7091-1367-7. doi: 10.1007/978-3-7091-1368-4\_6.
68. STIBAN, Johnny a PERERA, Meenu. Very long chain ceramides interfere with C16-ceramide-induced channel formation: A plausible mechanism for regulating the initiation of intrinsic apoptosis. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2015, roč. 1848, č. 2, s. 561-567. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.11.018.
  69. GANGOITI, Patricia; CAMACHO, Luz; ARANA, Lide; OURO, Alberto; GRANADO, Maria H. et al. Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. Online. *Progress in Lipid Research*. 2010, roč. 49, č. 4, s. 316-334. doi: 10.1016/j.plipres.2010.02.004.
  70. HARTMANN, Daniela; LUCKS, Jessica; FUCHS, Sina; SCHIFFMANN, Susanne; SCHREIBER, Yannick et al. Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. Online. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012, roč. 44, č. 4, s. 620-628. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.019.
  71. SCHIFFMANN, Susanne; SANDNER, Jessica; BIROD, Kerstin; WOBST, Ivonne; ANGIONI, Carlo et al. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. Online. *Carcinogenesis*. 2009, roč. 30, č. 5, s. 745-752. doi: 10.1093/carcin/bgp061.
  72. GU, Dishui; JIN, Haojie; JIN, Guangzhi; WANG, Cun; WANG, Ning et al. The asialoglycoprotein receptor suppresses the metastasis of hepatocellular carcinoma via LASS2-mediated inhibition of V-ATPase activity. Online. *Cancer Letters*. 2016, roč. 379, č. 1, s. 107-116. doi: 10.1016/j.canlet.2016.05.030.
  73. WANG, Haifeng; WANG, Jiansong; ZUO, Yigang; DING, Mingxia; YAN, Ruping et al. Expression and prognostic significance of a new tumor metastasis suppressor gene LASS2 in human bladder carcinoma. Online. *Medical Oncology*. 2012, roč. 29, č. 3, s. 1921-1927. doi: 10.1007/s12032-011-0026-6.
  74. XU, Xiaoyan; YOU, Jiangfeng a PEI, Fei. Silencing of a novel tumor metastasis suppressor gene LASS2/TMSG1 promotes invasion of prostate cancer cell in vitro through increase of vacuolar ATPase activity. Online. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012, roč. 113, č. 7, s. 2356-2363. doi: 10.1002/jcb.24106.
  75. XU, Xiaoyan; LIU, Beiyang; ZOU, Pengcheng; ZHANG, Yan; YOU, Jiangfeng et al. Silencing of LASS2/TMSG1 enhances invasion and metastasis capacity of prostate cancer cell. Online. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2014, roč. 115, č. 4, s. 731-743. doi: 10.1002/jcb.24716.
  76. OGRETMEN, Besim. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. Online. *Nature Reviews Cancer*. 2018, roč. 18, č. 1, s. 33-50. doi: 10.1038/nrc.2017.96.
  77. HARWOOD, John; LLOYD-EVANS, Emyr; GOMEZ-LARRAURI, Ana; PRESA, Natalia; DOMINGUEZ-HERRERA, Asier et al. Role of bioactive sphingolipids in physiology and pathology. Online. *Essays in Biochemistry*. 2020, roč. 64, č. 3, s. 579-589. doi: 10.1042/EBC20190091.

78. GOMEZ-LARRAURI, Ana; DAS ADHIKARI, Upasana; ARAMBURU-NUÑEZ, Marta; CUSTODIA, Antía a OURO, Alberto. Ceramide Metabolism Enzymes—Therapeutic Targets against Cancer. Online. *Medicina*. 2021, roč. 57, č. 7. doi: 10.3390/medicina57070729.
79. SHERIDAN, Megan a OGRETMEN, Besim. The Role of Ceramide Metabolism and Signaling in the Regulation of Mitophagy and Cancer Therapy. Online. *Cancers*. 2021, roč. 13, č. 10. doi: 10.3390/cancers13102475.
80. ZIGDON, Hila; KOGOT-LEVIN, Aviram; PARK, Joo-Won; GOLDSCHMIDT, Ruth; KELLY, Samuel et al. Ablation of Ceramide Synthase 2 Causes Chronic Oxidative Stress Due to Disruption of the Mitochondrial Respiratory Chain. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2013, roč. 288, č. 7, s. 4947-4956. doi: 10.1074/jbc.M112.402719.
81. BICKERT, Andreas; KERN, Paul; VAN UELFT, Martina; HERRESTHAL, Stefanie; ULAS, Thomas et al. Inactivation of ceramide synthase 2 catalytic activity in mice affects transcription of genes involved in lipid metabolism and cell division. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2018, roč. 1863, č. 7, s. 734-749. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.04.006.
82. PANI, Trishna; RAJPUT, Kajal; KAR, Animesh; SHARMA, Harsh; BASAK, Rituparna et al. Alternative splicing of ceramide synthase 2 alters levels of specific ceramides and modulates cancer cell proliferation and migration in Luminal B breast cancer subtype. Online. *Cell Death & Disease*. 2021, roč. 12, č. 2. doi:10.1038/s41419-021-03436-x.
83. WAJAPYEYEE, Narendra; BEAMON, Teresa Chiyanne a GUPTA, Romi. Roles and therapeutic targeting of ceramide metabolism in cancer. Online. *Molecular Metabolism*. 2024, roč. 83. doi: 10.1016/j.molmet.2024.101936.
84. SENNOUNE, Souad R.; BAKUNTS, Karina; MARTÍNEZ, Gloria M.; CHUA-TUAN, Jenny L.; KEBIR, Yamina et al. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. Online. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004, roč. 286, č. 6, s. C1443-C1452. doi: 10.1152/ajpcell.00407.2003.
85. IMGRUND, Silke; HARTMANN, Dieter; FARWANAH, Hany; ECKHARDT, Matthias; SANDHOFF, Roger et al. Adult Ceramide Synthase 2 (CERS2)-deficient Mice Exhibit Myelin Sheath Defects, Cerebellar Degeneration, and Hepatocarcinomas. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, roč. 284, č. 48, s. 33549-33560. doi: 10.1074/jbc.M109.031971.
86. ZHAO, Qingqing; HE, Wei; LIU, Zhouheng; HUANG, Liangliang; YANG, Xiaoli et al. LASS2 enhances p53 protein stability and nuclear import to suppress liver cancer progression through interaction with MDM2/MDMX. Online. *Cell Death Discovery*. 2023, roč. 9, č. 1. doi: 10.1038/s41420-023-01709-2.
87. WANG, Haifeng; WANG, Jiansong; ZUO, Yigang; DING, Mingxia; YAN, Ruping et al. Expression and prognostic significance of a new tumor metastasis suppressor gene LASS2 in human bladder carcinoma. Online. *Medical Oncology*. 2012, roč. 29, č. 3, s. 1921-1927. doi: 10.1007/s12032-011-0026-6.

88. ZHAO, QINGHUA; WANG, HAIFENG; YANG, MINGYING; YANG, DELIN; ZUO, YIGANG et al. Expression of a tumor-associated gene, LASS2, in the human bladder carcinoma cell lines BIU-87, T24, EJ and EJ-M3. Online. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013, roč. 5, č. 3, s. 942-946. doi: 10.3892/etm.2013.892.
89. ALDOGHACHI, Ahmed Faris; BAHARUDIN, Aminuddin; AHMAD, Umar; CHAN, Soon Choy; ONG, Teng Aik et al. Evaluation of CERS2 Gene as a Potential Biomarker for Bladder Cancer. Online. *Disease Markers*. 2019, roč. 2019, s. 1-8. doi: 10.1155/2019/3875147.
90. FAN, Shao-hua; WANG, Yan-yan; LU, Jun; ZHENG, Yuan-lin; WU, Dongmei et al. CERS2 Suppresses Tumor Cell Invasion and is Associated with Decreased V-ATPase and MMP-2/MMP-9 Activities in Breast Cancer. Online. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2015, roč. 116, č. 4, s. 502-513. doi: 10.1002/jcb.24978.
91. YU, Wenjuan; WANG, Leiming; WANG, Yuewei; XU, Xiaoyan; ZOU, Pengcheng et al. A novel tumor metastasis suppressor gene LASS2/TMSG1 interacts with vacuolar ATPase through its homeodomain. Online. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013, roč. 114, č. 3, s. 570-583. doi:10.1002/jcb.24400.
92. GONG, Miaozi; YU, Wenjuan; PEI, Fei; YOU, Jiangfeng; CUI, Xianglin et al. KLF6/Spl initiates transcription of the tmsg -1 gene in human prostate carcinoma cells: An exon involved mechanism. Online. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012, roč. 113, č. 1, s. 329-339. doi: 10.1002/jcb.23359.
93. LEIRO, Marc; VENTURA, Raúl; ROJO-QUEROL, Nil a HERNÁNDEZ-ALVAREZ, María. Endoplasmic Reticulum Isolation: An Optimized Approach into Cells and Mouse Liver Fractionation. Online. *BIO-PROTOCOL*. 2023, roč. 13, č. 17. doi: 10.21769/BioProtoc.4803.
94. Protein Purification. Online. Dostupné z: <https://biocev.lf1.cuni.cz/file/282/protein-purification-handbook.pdf>.
95. SMITH, Sinéad M. Strategies for the Purification of Membrane Proteins. Online. In: WALLS, Dermot a LOUGHRAN, Sinéad T. (ed.). *Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2017, s. 389-400. ISBN 978-1-4939-6410-9. doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3\_21.
96. DECAPRIO, James a KOHL, Thomas O. Immunoprecipitation. Online. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2020, roč. 2020, č. 11. doi: org/10.1101/pdb.top098509.
97. The principle and method of immunoprecipitation (IP). Online. *MBL Life Science -JAPAN-*. Dostupné z: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/immunoprecipitation.html>.
98. STEWART, Adele a FISHER, Rory A. Co-Immunoprecipitation. Online. In: *Laboratory Methods in Cell Biology. Methods in Cell Biology*. Elsevier, 2012, s. 33-54. ISBN 9780124059146. doi: 10.1016/B978-0-12-405914-6.00002-0.
99. KIM, Jiyeon L.; MESTRE, Beatriz; MALITSKY, Sergey; ITKIN, Maxim; KUPERVASER, Meital et al. Fatty acid transport protein 2 interacts with ceramide synthase 2 to promote ceramide synthesis. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2022, roč. 298, č. 4. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101735.

100. RODRIGUEZ, Elliott L.; PODDAR, Saumen; IFTEKHAR, Sazia; SUH, Kyungah; WOOLFORK, Ashley G. et al. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. Online. *Journal of Chromatography B*. 2020, roč. 1157. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.122332.
101. ZATLOUKALOVÁ, Eva. Afinitní chromatografie na imobilizovaných kobaltnatých iontech a její použití. Online. 2004. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_05\\_04.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_05_04.pdf).
102. GE Healthcare Handbook, Affinity Chromatography Principles and Methodes. Online. Dostupné z: [https://b3p.it.helsinki.fi/download/GE\\_Protein\\_Purification\\_Handbooks/Affinity\\_Chromatography\\_Handbook.pdf](https://b3p.it.helsinki.fi/download/GE_Protein_Purification_Handbooks/Affinity_Chromatography_Handbook.pdf).
103. BI, Cong; LI, Rong; MATSUDA, Ryan; PAPASTAVROS, Efthimia; PFAUNMILLER, Erika et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. Online. PubMed. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22305083/>.
104. MOSER, Annette C a HAGE, David S. Immunoaffinity Chromatography: An Introduction to Applications and Recent Developments. Online. *Bioanalysis*. 2010, roč. 2, č. 4, s. 769-790. doi: 10.4155/bio.10.31.
105. MAGAKI, Shino; HOJAT, Seyed A.; WEI, Bowen; SO, Alexandra a YONG, William H. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. Online. In: YONG, William H. (ed.). *Biobanking. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2019, s. 289-298. ISBN 978-1-4939-8933-1. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_25.
106. KREMSER, Christiane; KLEMM, Anna-Lena; UELFT, Martina; IMGRUND, Silke; GINKEL, Christina et al. Cell-type-specific expression pattern of ceramide synthase 2 protein in mouse tissues. Online. *Histochemistry and Cell Biology*. 2013, roč. 140, č. 5, s. 533-547. doi: 10.1007/s00418-013-1091-z.
107. KE, Rong-Hu; WANG, Yin; MAO, Yin; ZHANG, Jun a XIONG, Ji. Decreased expression of LASS2 is associated with worse prognosis in meningiomas. Online. *Journal of Neuro-Oncology*. 2014, roč. 118, č. 2, s. 369-376. doi: 10.1007/s11060-014-1441-2.
108. BARTHELMES, Julia; DE BAZO, Anika Männer; PEWZNER-JUNG, Yael; SCHMITZ, Katja; MAYER, Christoph A. et al. Lack of ceramide synthase 2 suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing the migratory capacity of neutrophils. Online. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015, roč. 46, s. 280-292. doi: 10.1016/j.bbi.2015.02.010.
109. SHIN, Sun-Hye; CHO, Kyung-Ah; YOON, Hee-Soo; KIM, So-Yeon; KIM, Hee-Yeon et al. Ceramide Synthase 2 Null Mice Are Protected from Ovalbumin-Induced Asthma with Higher T Cell Receptor Signal Strength in CD4+ T Cells. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 5. doi: 10.3390/ijms22052713.
110. RUAN, Haoyu; WANG, Ting; YANG, Chen; JIN, Guangzhi; GU, Dishui et al. Co-expression of LASS2 and TGF- $\beta$ 1 predicts poor prognosis in

- hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports*. 2016, roč. 6, č. 1. doi: 10.1038/srep32421.
111. Immunohistochemistry (IHC) Principle. Online. Bosterbio. Dostupné také z: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/immunohistochemistry-ihc-principle>.
  112. Subcellular Cers2. Online. The Human Protein Atlas. 2025. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143418-CERS2/subcellular>.
  113. HARSHITHA, Ravikumar a ARUNRAJ, Duraipandian Rex. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. Online. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2021, roč. 49, č. 5, s. 800-812. doi: 10.1002/bmb.21552.
  114. ADEOLA, Fowotade. Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes. Online. *Ethiopian Journal of Health Sciences*. 2019, roč. 28, č. 6. doi: 10.4314/ejhs.v28i6.9.
  115. SCHIFFMANN, Susanne; BIROD, Kerstin; MÄNNICH, Julia; EBERLE, Max; WEGNER, Marthe-Susanna et al. Ceramide metabolism in mouse tissue. Online. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013, roč. 45, č. 8, s. 1886-1894. doi: 10.1016/j.biocel.2013.06.004.
  116. MULLEN, Thomas D.; HANNUN, Yusuf A. a OBEID, Lina M. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. Online. *Biochemical Journal*. 2012, roč. 441, č. 3, s. 789-802. doi.org/10.1042/BJ20111626.
  117. PEWZNER-JUNG, Yael; PARK, Hyejung; LAVIAD, Elad L.; SILVA, Liana C.; LAHIRI, Sujoy et al. A Critical Role for Ceramide Synthase 2 in Liver Homeostasis. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, roč. 285, č. 14, s. 10902-10910. doi: 10.1074/jbc.M109.077594.
  118. MOSBECH, Mai-Britt; OLSEN, Anne S. B.; NEESS, Ditte; BEN-DAVID, Oshrit; KLITTEN, Laura L. et al. Reduced ceramide synthase 2 activity causes progressive myoclonic epilepsy. Online. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2014, roč. 1, č. 2, s. 88-98. doi: 10.1002/acn3.28.
  119. DAVID KITZ KRAMER, Western Blotting (Immunoblot): Gel Electrophoresis for Proteins. Online. Dostupné z: <https://www.antibodies-online.com/resources/17/1224/western-blotting-immunoblot-gel-electrophoresis-for-proteins/>.
  120. SULE, Rasheed; RIVERA, Gabriela a GOMES, Aldrin V. Western Blotting (immunoblotting): History, Theory, Uses, Protocol and Problems. Online. *BioTechniques*. 2023, roč. 75, č. 3, s. 99-114. doi.org/10.2144/btn-2022-0034.
  121. MESICEK, Judith; LEE, Hyunmi; FELDMAN, Taya; JIANG, Xuejun; SKOBELEVA, Anastasia et al. Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells. Online. *Cellular Signalling*. 2010, roč. 22, č. 9, s. 1300-1307. doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.04.006.
  122. KURZ, Jennifer; BARTHELMES, Julia; BLUM, Leonard; ULSHÖFER, Thomas; WEGNER, Marthe-Susanna et al. Role of ceramide synthase 2 in G-CSF signaling and G-CSF-R translocation into detergent-resistant membranes.

- Online. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. doi: 10.1038/s41598-018-37342-8.
123. CASADOMÉ-PERALES, Álvaro; NAYA, Sara; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Elisa; MILLE, Bea G.; GUERRERO-VALERO, Marta et al. Neuronal Prosurvival Role of Ceramide Synthase 2 by Oligodendrocyte-to-Neuron Extracellular Vesicle Transfer. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 6. doi: 10.3390/ijms24065986.
  124. NICHOLSON, Rebekah J; POSS, Annelise M; MASCHEK, J Alan; COX, James E; HOPKINS, Paul N et al. Characterizing a Common CERS2 Polymorphism in a Mouse Model of Metabolic Disease and in Subjects from the Utah CAD Study. Online. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2021, roč. 106, č. 8, s. e3098-e3109. doi: 10.1210/clinem/dgab155.
  125. What Is Protein Gel Electrophoresis? Definition. Online. Dostupné z: <https://www.excedr.com/resources/protein-gel-electrophoresis>.
  126. GARCA-DESCALZO, Laura; GARCA-LPEZ, Eva; ALCZAR, Alberto; BAQUERO, Fernando a CI, Cristina. Gel Electrophoresis of Proteins. Online. In: MAGDELDIN, Sameh (ed.). *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0458-2. doi: 10.5772/37514.
  127. COUTTAS, Timothy A. a DON, Anthony S. Fluorescent Assays for Ceramide Synthase Activity. Online. In: WAUGH, Mark G. (ed.). *Lipid Signaling Protocols. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016, s. 23-33. ISBN 978-1-4939-3169-9. doi: 10.1007/978-1-4939-3170-5\_3.
  128. TIDHAR, Rotem; SIMS, Kacee; ROSENFELD-GUR, Eden; SHAW, Walter a FUTERMAN, Anthony H. A rapid ceramide synthase activity using NBD-sphinganine and solid phase extraction. Online. *Journal of Lipid Research*. 2015, roč. 56, č. 1, s. 193-199. doi: 10.1194/jlr.D052001.
  129. ABAD, José Luis; NIEVES, Ingrid; RAYO, Pedro; CASAS, Josefina; FABRIÀS, Gemma et al. Straightforward Access to Spisulosine and 4,5-Dehydrospisulosine Stereoisomers: Probes for Profiling Ceramide Synthase Activities in Intact Cells. Online. *The Journal of Organic Chemistry*. 2013, roč. 78, č. 12, s. 5858-5866. doi: 10.1021/jo400440z.
  130. KIM, Hyun Joon; QIAO, Qiao; TOOP, Hamish D.; MORRIS, Jonathan C. a DON, Anthony S. A fluorescent assay for ceramide synthase activity. Online. *Journal of Lipid Research*. 2012, roč. 53, č. 8, s. 1701-1707. doi: 10.1194/jlr.D025627.
  131. BICKERT, Andreas; KERN, Paul; VAN UELFT, Martina; HERRESTHAL, Stefanie; ULAS, Thomas et al. Inactivation of ceramide synthase 2 catalytic activity in mice affects transcription of genes involved in lipid metabolism and cell division. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2018, roč. 1863, č. 7, s. 734-749. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.04.006.
  132. LIM, Xin Ying; PICKFORD, Russell a DON, Anthony S. Assaying Ceramide Synthase Activity In Vitro and in Living Cells Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Online. In: WAUGH, Mark G. (ed.).

- Lipid Signaling Protocols. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016, s. 11-22. ISBN 978-1-4939-3169-9. doi: 10.1007/978-1-4939-3170-5\_2.
133. LUTTGEHARM, Kyle D.; CAHOON, Edgar B. a MARKHAM, Jennifer E. A mass spectrometry-based method for the assay of ceramide synthase substrate specificity. Online. *Analytical Biochemistry*. 2015, roč. 478, s. 96-101. doi: 10.1016/j.ab.2015.02.016.
  134. TREFTS, Elijah; GANNON, Maureen a WASSERMAN, David H. The liver. Online. *Current Biology*. 2017, roč. 27, č. 21, s. R1147-R1151. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
  135. KARPÍŇSKA, Monika a CZAUDERNA, Marian. Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. Online. *Frontiers in Physiology*. 2022, roč. 13. doi: 10.3389/fphys.2022.807632.
  136. ZHOU, Yanting; GAO, Jing; ZHU, Hongwen; XU, Jingjing; HE, Han et al. Enhancing Membrane Protein Identification Using a Simplified Centrifugation and Detergent-Based Membrane Extraction Approach. Online. *Analytical Chemistry*. 2018, roč. 90, č. 4, s. 2434-2439. doi: 10.1021/acs.analchem.7b03710.
  137. Clarity Western ECL Substrate, 500 ml. Online. Bio-Rad Laboratories. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/sku/1705061-clarity-western-ecl-substrate-500-ml?ID=1705061>.
  138. ALAYASH, Abdu I. a WILSON, Michael T. Hemoglobin can Act as a (Pseudo)-Peroxidase in Vivo. What is the Evidence? Online. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022, roč. 9. doi: 10.3389/fmolb.2022.910795.
  139. SNASHALL, Corinna M.; SUTTON, Chris W.; FARO, Letizia Lo; CERESA, Carlo; PLOEG, Rutger et al. Comparison of in-gel and in-solution proteolysis in the proteome profiling of organ perfusion solutions. Online. *Clinical Proteomics*. 2023, roč. 20, č. 1. doi:10.1186/s12014-023-09440-x.

## PŘÍLOHY

Příloha A – Identifikované peptidy ve vzorcích jaterní tkáně připravených metodou štěpení v gelu.. .....	144
Příloha B – Identifikované peptidy ve vzorcích pankreatické tkáně připravených metodou štěpení v gelu.. .....	145
Příloha C – Identifikované peptidy ve vzorcích jaterní tkáně připravených metodou štěpení v roztoku.....	146
Příloha D – – Identifikované peptidy ve vzorcích pankreatické tkáně připravených metodou štěpení v roztoku.....	147
Příloha E – Identifikované peptidy ve vzorku jaterní tkáně připraveného metodou štěpení v roztoku, s následnou bazickou frakcionací.....	148
Příloha F – Identifikované peptidy ve vzorku pankreatické tkáně připraveného metodou štěpení v roztoku, s následnou bazickou frakcionací.....	149
Příloha G – Identifikované peptidy ve vzorku nosiče inkubovaného s trypsinem, vazba z jaterní tkáně. ....	150
Příloha H – Identifikované peptidy ve vzorku nosiče inkubovaného s trypsinem, vazba z buněčného lyzátu s nadměrnou expresí CerS2.....	151

Příloha A – Identifikované peptidy ve vzorcích jaterní tkáně připravených metodou štěpení v gelu, vyhodnoceno v Proteome Discoverer. Prvních 10 identifikovaných peptidů, dva před a dva za sledovaným proteinem a poslední tři peptidy.

	Databázový kód	Název proteinu	Unikátní peptidy	Pokrytí [%]	M <sub>w</sub> [kDa]	Vypočtené pI
1	Q6QAAQ1	Aktin, cytoplazmatický 1	2	81	41,7	5,48
2	I3LVD5	Aktin gama 1	1	81	41,8	5,48
3	A0A286ZZC9	Fruktóza-bisfosfátaldoláza	40	70	40	8,09
4	D0G0B3	3-ketoacyl-CoA thioláza, mitochondriální	41	72	41,9	8,4
5	A0A4X1W7V5	Aktin, gama, hladká svalovina	11	73	40,2	5,48
6	A0A480UJ69	3-ketoacyl-CoA thioláza, peroxizomální izoforma X1	26	63	44,5	8,21
7	A0A8D0RDH0	Betain-homocystein S-methyltransferáza 1	35	89	44,1	6,84
8	P00636	Fruktóza-1,6-bisfosfátáza 1	29	74	36,8	7,3
9	F1RPH0	Fosfoglycerátkináza	35	85	44,5	7,9
10	P41367	Acyl-CoA dehydrogenáza specifická pro střední řetězce, mitochondriální	36	58	46,5	8,28
254	P00336	B-řetězec L-laktátdehydrogenáza	6	23	36,6	5,86
255	A0A288CFT0	Triosefosfátizomeráza	10	41	30,5	7,71
<b>256</b>	<b>A0A287A843</b>	<b>Ceramidsyntáza 2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>45,4</b>	<b>8,87</b>
257	F1RGJ3	Stres-70,protein, mitochondriální	9	16	70,1	5,6
258	A0A287AJ91	DnaJ člen A3 rodiny proteinů tepelného šoku (Hsp40)	10	19	57,3	9,69
1214	A0A287BQ89	Cytosolová složka sestavy železa a síry 2A	1	7	18,4	4,98
1215	F1SFY5	Oxidoreduktáza HTATIP2	1	5	30,7	8,12
1216	A0A4X1TJK6	vitamin-K-epoxid reduktáza (citlivá na warfarin)	1	9	15,3	11,03

Příloha B – Identifikované peptidy ve vzorcích pankreatické tkáně připravených metodou štěpení v gelu, vyhodnoceno v Proteome Discoverer. Prvních 10 identifikovaných peptidů, dva před a dva za sledovaným proteinem a poslední tři peptidy.

	Databázový kód	Název proteinu	Unikátní peptidy	Pokrytí [%]	M <sub>w</sub> [kDa]	Vypočtené pI
1	A0A5G2RDD7	Proteindisulfidizomeráza	46	45	68,7	5,38
2	Q6QAQ1	Aktin, cytoplazmatický 1	1	63	41,7	5,48
3	I3LVD5	Aktin gama 1	1	63	41,8	5,48
4	A0A4X1W7V5	Aktin, gama-enterická hladká svalovina	6	55	40,2	5,48
5	A0A287BIL8	78 kDa protein regulovaný glukózou	45	57	73	5,36
6	A0A4X1WBI1	Keratin, cytoskelet typu II 8	40	62	54,4	5,82
7	A0A286ZYX8	Fruktózabisfosfátaldoláza	3	61	36,4	8,84
8	P00355	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	23	54	35,8	8,35
9	F1RL80	Aminotransferáza aminokyselin s rozvětveným řetězcem mitochondriální	2	31	54	8,47
10	A0A287B8F3	Fruktózabisfosfátaldoláza	2	59	45	8,09
399	I3LQ84	Kolagen typu VI alfa 2 řetězec	6	6	101	6,73
401	A0A287BKE2	Protein NDRG1	5	19	41,7	5,71
<b>402</b>	<b>A0A287A843</b>	<b>Ceramidsyntáza 2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>45,4</b>	<b>8,87</b>
403	I3L6U9	Protein vázající guaninový nukleotid podjednotka alfa-11	3	11	42,1	6,02
404	F1SEM2	Dolichyl-difosfoligosacharid--proteinová glykosyltransferáza podjednotka 2	6	12	69,2	5,72
1396	A0A287B6C5	NADPH adrenodoxinoreduktáza, mitochondriální	1	4	48,4	8,18
1397	A0A8W4FEN3	Opakování bohaté na leucin obsahující 59	1	4	35,1	9,48
1398	F1SQ16	Golgin B1	1	0	377,3	5,03

Příloha C – Identifikované peptidy ve vzorcích jaterní tkáně připravených metodou štěpení v roztoku, vyhodnoceno v Proteome Discoverer: prvních 10 identifikovaných peptidů, dva před a dva za sledovaným proteinem a poslední tři peptidy.

	Databázový kód	Název proteinu	Unikátní peptidy	Pokrytí [%]	M <sub>w</sub> [kDa]	Vypočtené pI
1	A0A5G2QRW3	Protein obsahující profilovou doménu rodiny globinů 1	2	55	26,1	9,86
2	P01965	Hemoglobinová podjednotka alfa	1	95	15	8,7
3	A0A8W4FGV2	Karbamoylfosfát syntáza 1	76	54	165,2	6,8
4	A0A286ZT13	Albumin	39	72	69,8	6,46
5	P02067	Podjednotka hemoglobinu beta	4	96	16,2	7,68
6	A0A4X1SSR6	Kataláza	21	56	62,5	6,81
7	I3LRS5	Aldehyddehydrogenáza (NAD(+))	32	68	54,8	7,59
8	P42174	Glutamátdehydrogenáza 1, mitochondriální	30	57	61,3	7,96
9	A0A286ZYU8	10-formyltetrahydrofolát dehydrogenáza	20	60	95,1	5,86
10	Q6QAQ1	Aktin, cytoplazmatický 1	1	59	41,7	5,48
1105	Q29380	Napětově závislý aniontový selektivní kanál, protein 3	1	9	30,6	8,66
1106	A0A5G2RCR6	Protein obsahující profilovou doménu MFS (Major facilitator superfamily)	3	9	60,2	8,34
<b>1107</b>	<b>A0A287A843</b>	<b>Ceramidsyntáza 2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>45,4</b>	<b>8,87</b>
1108	A0A287AWH8	Podjednotka zeta koatomeru	2	11	23,4	5,08
1109	F1RZS1	Trimetyllsindioxygenáza, mitochondriální	2	6	49,6	7,9
2150	A0A287BIL5	Sad1 a UNC84 doména obsahující 2	1	1	81,6	7,23
2151	A0A287BMB4	Alaninaminotransferáza	1	1	116,6	6,52
2152	F1SEQ3	Transmembránový protein indukovaný růstovým hormonem	2	6	37,1	9,89

Příloha D – – Identifikované peptidy ve vzorcích pankreatické tkáně připravených metodou štěpení v roztoku, vyhodnoceno v Proteome Discoverer. Prvních 10 identifikovaných peptidů a poslední tři peptidy.

	Databázový kód	Název proteinu	Unikátní peptidy	Pokrytí [%]	M <sub>w</sub> [kDa]	Vypočtené pI
1	I3LSA5	Alfa-amyláza	2	48	55,8	6,96
2	G9F6X8	Proteindisulfidizomeráza	34	60	56,4	4,89
3	A0A287BIL8	78 kDa protein regulovaný glukózou	38	52	73	5,36
4	A0A286ZT13	Albumin	42	71	69,8	6,46
5	P09954	Karboxypeptidáza A1	15	44	47,2	5,3
6	Q29092	Endoplazmin	42	50	92,4	4,83
7	I3LGC2	Protein vázající ribosomy1	51	36	157,3	9,1
8	A0A5G2QRW3	Protein obsahující profilovou doménu rodiny globinů	2	45	26,1	9,86
9	A0A287AX21	Proteindisulfidizomeráza	21	42	58,9	4,91
10	P09955	Karboxypeptidáza B	18	62	47,4	5,4
2215	A0A5G2R117	Eukaryotický iniciační faktor translace 6	1	4	27,1	4,74
2216	A0A8W4FN51	GMP reduktáza	1	1	54,5	10,14
2217	A0A287AMW5	Jumonji a interakční doména bohatá na AT obsahující 2	1	1	137	9,39

Příloha E – Identifikované peptidy ve vzorku jaterní tkáně připraveného metodou štěpení v roztoku, s následnou bazickou frakcionací, vyhodnoceno v Proteome Discoverer. Prvních 10 identifikovaných peptidů, dva před a dva za sledovaným proteinem a poslední tři peptidy.

	Databázový kód	Název proteinu	Unikátní peptidy	Pokrytí [%]	M <sub>w</sub> [kDa]	Vypočtené pI
1	P01965	Podjednotka hemoglobinu alfa	1	80	15	8,7
2	F1RGX4	Protein obsahující profilovou doménu rodiny globinů	1	80	15,2	8,7
3	A0A5G2QRW3	Protein obsahující profilovou doménu rodiny globinů	2	51	26,1	9,86
4	P02067	Podjednotka hemoglobinu beta	4	89	16,2	7,68
5	A0A4X1SSR6	Kataláza	5	63	62,5	6,81
6	A0A8W4FGV2	Karbamoylfosfátsyntáza 1	84	57	165,2	6,8
7	A0A286ZT13	Albumin	45	77	69,8	6,46
8	I3LRS5	Aldehyddehydrogenáza (NAD(+))	33	61	54,8	7,59
9	Q6QAQ1	Aktin, cytoplazmatický 1	1	70	41,7	5,48
10	P42174	Glutamátdehydrogenáza 1, mitochondriální	33	58	61,3	7,96
1803	A0A5G2QBC5	Protein SET	3	10	40,9	6,21
1804	A0A287AAB2	Protein obsahující doménu podobnou Ig	1	20	31,4	7,53
<b>1805</b>	<b>A0A287A843</b>	<b>Ceramidsyntáza 2</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>45,4</b>	<b>8,87</b>
1806	Q2PKF4	Protein vázající guaninový nukleotid G(q) podjednotka alfa	4	19	42,1	5,68
1807	K9IVV3	Transmembránový člen nadrodiny 9	7	13	75,8	7,58
4991	I3LSM9	Faktor 4 spojený s proteinem vázajícím TATA-box	1	1	105,2	9,85
4992	A0A5G2QQT6	Proteinová fosfatáza 4 regulační podjednotka 2	1	4	42,2	4,48
4993	F1RFG1	Obecný transkripční faktor 3C polypeptid 1 izoforma 1	2	1	238,7	7,65

*Příloha F – Identifikované peptidy ve vzorku pankreatické tkáně připraveného metodou štěpení v roztoku, s následnou bazickou frakcionací, vyhodnoceno v Proteome Discoverer. Prvních 10 identifikovaných peptidů, dva před a dva za sledovaným proteinem a poslední tři peptidy.*

	Databázový kód	Název proteinu	Unikátní peptidy	Pokrytí [%]	M <sub>w</sub> [kDa]	Vypočítané pI
1	F1S574	Alfa-amyláza	2	53	57,1	6,77
2	A0A5G2RDD7	Proteindisulfidizomeráza	37	49	68,7	5,38
3	A0A287BIL8	78 kDa protein regulovaný glukózou	41	52	73	5,36
4	A0A286ZT13	Albumin	36	70	69,8	6,46
5	P09954	Karboxypeptidáza A1	17	47	47,2	5,3
6	P01965	Podjednotka hemoglobinu alfa	1	67	15	8,7
7	A0A5G2QRW3	Protein obsahující profilovou doménu rodiny globinů	2	49	26,1	9,86
8	P02067	Podjednotka hemoglobinu beta	4	86	16,2	7,68
9	Q29092	Endoplazmin	43	49	92,4	4,83
10	A0A5G2QSL2	Peptidáza S1 protein obsahující doménu	3	30	25,9	7,06
2660	F1RR64	Endonukleáza	3	13	32,6	9,39
2661	F1SJH5	CLN6 transmembránový ER protein	1	4	36	8,97
<b>2662</b>	<b>A0A287A843</b>	<b>Ceramidsyntáza 2</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>45,4</b>	<b>8,87</b>
2663	Q9N1U3	Glukokortikoidní receptor	2	2	85,6	6,98
2664	A0A287AAA4	DNA helikáza	7	4	212,2	5,8
4681	I3L554	Centrozomální protein 128	1	1	134	6,15
4682	A0A4X1U5Q1	Vývoj embryonálního ektodermu	1	2	53	7,36
4683	A0A5G2R1T1	Cysteindesulfuráza	1	2	49,1	8,66

Příloha G – Identifikované peptidy ve vzorku nosiče inkubovaného s trypsinem, vazba z jaterní tkáně, vyhodnoceno v Proteome Discoverer. Prvních 10 identifikovaných peptidů, dva před a dva za sledovaným proteinem a poslední tři peptidy.

	Databázový kód	Název proteinu	Unikátní peptidy	Pokrytí [%]	M <sub>w</sub> [kDa]	Vypočítané pI
1	A0A4X1WBI1	Keratin, cytoskelet typu II 8	33	54	54,4	5,82
2	A0A8W4FGV2	Karbamoylfosfátsyntáza 1	47	36	165,2	6,8
3	F1S9Q3	Člen rodiny proteinů tepelného šoku A (Hsp70) 8	23	40	71,8	5,59
4	A0A287A5G1	Aktin gama 1	6	48	42	5,48
5	A0A8I8C3K7	Protein tepelného šoku HSP 90-alfa	18	35	93,3	5,68
6	A0A8D1SAM9	Protein tepelného šoku HSP 90-beta	15	36	84,2	5,02
7	A0A4X1VS57	Eukaryotický translační elongační faktor 2	23	27	95,8	7,05
8	A0A8W4FNX1	Aktin, gama-enterická hladká svalovina	3	35	42,1	5,85
9	A0A8W4FAS4	Fibrinogen alfa řetězec	18	24	99	6,46
10	A0A4X1SSR6	Kataláza	2	38	62,5	6,81
434	A0A287A6P1	Gelsolin	7	13	85,6	6,47
		Protein vázající prvek (Far upstream element binding protein 3)				
435	A0A286ZXF7		5	10	72,4	9,29
<b>436</b>	<b>A0A287A843</b>	<b>Ceramidsyntáza 2</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>45,4</b>	<b>8,87</b>
437	F1RIE0	LRP chaperon MESD	3	22	25,9	7,88
		Lehký polypeptid myozinu 6				
438	A0A480I0Y2		5	22	22,1	5,47
1940	A0A8W4FBG7	Pyruvátdehydrogenáza E1 složka podjednotka beta	2	7	36,2	6,44
1941	A0A5G2R9G8	Protein 2 bohatý na cystein a glycin	1	5	21	8,53
1942	A0A8W4FCA7	Coiled-coil doména obsahující 157	1	6	41,4	6,47

Příloha H – Identifikované peptidy ve vzorku nosiče inkubovaného s trypsinem, vazba z buněčného lyzátu s nadměrnou expresí CerS2, vyhodnoceno v Proteome Discoverer. Prvních 10 identifikovaných peptidů, dva před a dva za sledovaným proteinem a poslední tři peptidy.

	Databázový kód	Název proteinu	Unikátní peptidy	Pokrytí [%]	M <sub>w</sub> [kDa]	Vypočítané pI
1	P08238	Protein tepelného šoku HSP 90-beta	21	51	83,2	5,03
2	P11142	Protein tepelného šoku s kognátem 71 kDa	20	51	70,9	5,52
3	P07900	Protein tepelného šoku HSP 90-alfa	21	47	84,6	5,02
4	P06733	Alfa-enoláza	30	59	47,1	7,39
5	P19338	Nucleolin	38	53	76,6	4,7
6	P60709	Aktin, cytoplazmatický 1	6	53	41,7	5,48
7	P13639	Elongační faktor 2	32	32	95,3	6,83
8	P04406	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	20	52	36	8,46
9	A0A7I2V2G2	Stres-70 protein, mitochondriální	33	52	66,6	5,66
10	A0A0G2JIW1	Protein tepelného šoku rodiny A (Hsp70), člen 1B	24	41	70,1	5,66
269	P22102	Trifunkční purinový biosyntetický protein adenosin-3	13	15	107,7	6,7
270	P33993	Licenční faktor replikace DNA MCM7	12	22	81,3	6,46
<b>271</b>	<b>Q96G23</b>	<b>Ceramidsyntáza 2</b>	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>44,8</b>	<b>8,98</b>
272	A0A7I2V2S3	Exportin 1	11	15	109,3	6,16
273	K7ER90	Eukaryotický iniciační faktor translace 3 podjednotka G (fragment)	1	36	25,4	5,49
2514	A0A2R8YD87	Vakuolární třídění proteinů 13 homolog D (Fragment)	1	1	173,8	7,09
2515	J3KPT4	TraB obsahující doménu	1	3	42,7	8
2516	Q12789	Obecný transkripční faktor 3C polypeptid 1	1	0	238,7	7,3