

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav Molekulární biologie a radiobiologie



Kvantifikácia proteínov
pomocou hmotnostnej spektrometrie a jej využitie
pri sledovaní degeneračných zmien proteínu

Bakalárska práca

Vedúci práce:
Mgr. Martin Černý, Ph.D.

Vypracovala:
Karina Blaženiaková

Brno 2017

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som prácu **Kvantifikácia proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie a jej využitie pri sledovaní degeneračných zmien proteínu** vypracovala samostatne a všetky použité pramene a informácie uvádzam v zozname použitej literatúry. Súhlasím, aby moja práca bola zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a v súlade s platnou Smernicou o zverejňovaní vysokoškolských záverečných prác.

Som si vedomá, že sa na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brne má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy a užitie tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona.

Ďalej sa zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o využití diela inou osobou (subjektom) si vyžiadam písomné stanovisko univerzity, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity, a zaväzujem sa uhradiť prípadný príspevok na úhradu nákladov spojených so vznikom diela, a to až do ich skutočnej výšky.

V Brne dňa:.....

.....

podpis

POĎAKOVANIE

Chcela by som poďakovať predovšetkým Mgr. Martinovi Černému, Ph.D., ktorý je šedou eminenciou, majstrom bábkarom a *deus ex machina* mojej bakalárskej práce. Ďalej pracovníkom Ústavu Molekulárnej biológie a rádiobiológie, najmä za ich ústretovosť a zmysel pre humor. Rodine a priateľom, ktorých dobiedzanie sa trochu míňalo s motivačným účinkom. A molekulám, ktoré sa v primordiálnej polievke tohto sveta rozhodli polymerizovať...teda, Bohu...

ABSTRAKT

Posttranslačné modifikácie proteínov môžu mať dôležitú úlohu v regulačných dráhach, niektoré z nich sú však výsledkom stresového pôsobenia a starnutia proteínov. Táto bakalárska práca „Kvantifikácia proteínov pomocou hmotnostnej spektrometrie a jej využitie pri sledovaní degeneračných zmien proteínu“ stručne sumarizuje hlavné posttranslačné modifikácie súvisiace s degeneratívnymi procesmi. Experimentálna časť využíva cieleňú analýzu metódou SRM hmotnostnej spektrometrie na identifikáciu potenciálnych miest posttranslačných modifikácií. S využitím dostupnej lokálnej spektrálnej knižnice *Hordeum vulgare*, bol vybraný vysoko abundantný proteín endospermu obilky jačmeňa (Serpín Z-4) a optimalizovaná metóda pre cieleňú analýzu jeho tryptických peptidov. Celkom bolo sledovaných 14 peptidov reprezentujúcich viac ako 50 % sekvencie proteínu. Poškodenie bolo indukované inkubáciou homogenizovaných obiliek pri teplote 99 °C po dobu 0,5 - 24 h a tiež inkubáciou s peroxidom vodíka s koncentráciou 0 - 30 %. Teplotný stres významne znížil zastúpenie siedmych peptidov a oxidačný stres významne znížil zastúpenie štyroch peptidov. Mapovanie týchto peptidov na 3D štruktúru proteínu ukázalo, že väčšina peptidov s pozmeneným zastúpením je pravdepodobne lokalizovaná na povrchu molekuly a teda predstavuje očakávaný cieľ stresom vyvolaných modifikácií. Nakoniec bola vytvorená SRM metóda testovaná aj na extraktoch z potravín.

Kľúčové slová: posttranslačné modifikácie, LC-MS, starnutie, stres

ABSTRACT

Protein posttranslational modifications may play an important role in regulatory pathways but some of them are also the result of stress and protein ageing. This thesis "Protein quantitation and its application in the monitoring of degenerative protein modifications" briefly reviews major protein posttranslational modifications involved in degenerative processes. The experimental part utilises SRM-based targeted mass spectrometry to identify sites of stress-induced posttranslational modifications. Based on the available spectral libraries, a highly abundant barley seed protein was selected (Serpine-Z4) and the method for a targeted analysis of its tryptic peptides was optimised. Altogether, relative abundances of 14 peptides representing more than 50% of the protein sequence coverage were followed. The damage was induced by incubating barley seed powder at 99°C for 0.5-24 h or with hydrogen peroxide (0-30%). Abundances of seven and four peptides were significantly decreased by heat and oxidative damage, respectively. The mapping of these peptides to the protein's 3D structure revealed that most of the altered peptides are exposed on the surface and thus present a likely target of stress-induced modifications. Finally, the SRM-based method was tested on food extracts.

Keywords: posttranslational modifications, LC-MS, SRM, ageing, stress

OBSAH

1 Úvod.....	8
2 Literárny prehľad	9
2.1 Posttranslačné modifikácie proteínov	10
2.1.1 Oxidačné modifikácie proteínov.....	10
2.1.1.1 Oxidačné modifikácie cysteínu	11
2.1.1.2 Oxidácia metionínu	12
2.1.1.3 Nitrácia proteínov	12
2.1.1.4 Karbonylácia proteínov	13
2.1.1.5 Glykácia proteínov	15
2.1.1.6 Deamidácia proteínov.....	16
2.2 Proteomické metódy	17
2.2.1 Hmotnostná spektrometria.....	17
2.2.1.1 Tandemová hmotnostná spektrometria (MS/MS)	18
2.2.1.2 Kvantifikácia prostredníctvom MS	19
2.3 Jačmeň siaty <i>Hordeum vulgare</i>	21
3 Materiál a metodika	23
3.1 Extrakcia celkového proteómu pre analýzu vplyvu tepla.....	23
3.2 Extrakcia proteómu pre analýzu vplyvu H ₂ O ₂	25
3.3 Extrakcia zo vzoriek potravín spojená s pre-frakcionáciou.....	26
3.4 Parametry analýzy SRM-MS v spojení s LC chromatografiou	27
3.5 Necielená proteomická analýza	28
4 Výsledky a diskusia	29
4.1 Vytvorenie SRM-MS metódy pre ciele kvantifikáciu peptidov	29
4.2 Výsledky SRM-MS analýzy	30
4.2.1 Serpín-Z4 (P06293)	30
4.3 Sledovanie zmien proteínu (Serpín-Z4) pôsobením teplotného stresu.....	33
4.4 Sledovanie zmien proteínu (Serpín-Z4) pôsobením oxidačného stresu H ₂ O ₂	34
4.5 Mapovanie peptidov na 3D model Serpínu-Z4.....	35
4.6 Sledovanie Serpínu-Z4 vo vzorkách chleba a piva.....	36
5 Záver:.....	37

6	Zoznam použitej literatúry:.....	38
7	Zoznam obrázkov:	42
8	Zoznam použitých skratiek:.....	44

1 ÚVOD

Molekuly proteínov po svojej syntéze podliehajú cieleným aj spontánnym zmenám kvalitatívnej aj kvantitatívnej povahy. V súčasnej dobe jedným z najefektívnejších nástrojov sledovania týchto zmien predstavuje hmotnostná spektrometria.

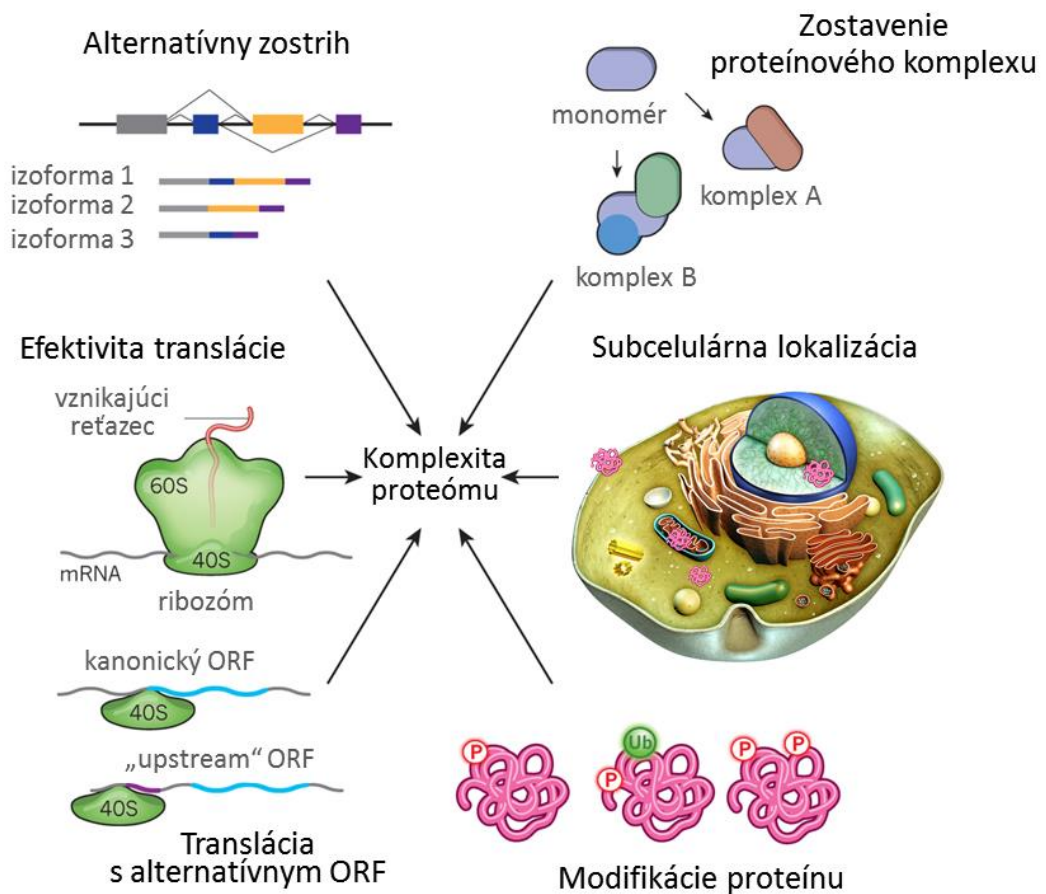
Neriadené zmeny sú predovšetkým výsledkom stochastického pôsobenia okolitého prostredia v danom redoxnom stave, v ktorom sa proteíny nachádzajú. Akumulácia ireverzibilných oxidačných zmien môže viesť k narušeniu prirodzenej štruktúry proteínov, s čím je často spojená strata príslušnej funkcie, a zvyčajne aj agregácia poškodených proteínov. Mnohé degeneratívne ochorenia sú výsledkom práve týchto procesov. Podľa teórie voľných radikálov samotné starnutie živých organizmov je tiež podmienené nahromadením oxidačného poškodenia proteínov, pričom neschopnosť toto poškodenie opraviť resp. nahradiť de novo syntézou proteínov vedie k postupnému systematickému zlyhávaniu a fatalite.

Akumulácia je výraznejšie pozorovateľná u proteínov v biologických systémoch, v ktorých nie je aktívny proteostatický aparát buniek, teda v rôznych štádiách, kedy je pozastavená biologická aktivita, napr. dormantné semená, rôzne formy spór živočíchov a pod. resp. u proteínov, ktoré už nie sú súčasťou živých organizmov, napr. proteíny v potravinách.

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo popísať tie modifikácie proteínov, ktoré vedú k ich poškodeniu a sú tak súčasťou stresovej odpovede a starnutia. V experimentálnej časti mali byť využité metódy proteomickej analýzy pre monitorovanie poškodenia proteínov a testovaná úspešnosť použitia vyvinutej metodiky i pre analýzu proteínov z potravinových vzoriek.

2 LITERÁRNY PREHĽAD

Komplexita proteómu (Obr. 1) organizmu, vzhľadom na počet proteoforiem, špecifických molekulárnych foriem proteínu vznikajúcich transkripciou jedného génu, niekoľkonásobne prevyšuje počet génov odpovedajúceho genómu. Túto diverzitu podmieňuje prítomnosť sekvenčných polymorfizmov, alternatívny zstrih primárneho transkriptu (a ko-translačné) a posttranslačné modifikácie proteínov. Proteóm oplýva tiež kvantitatívnou rôznorodosťou, kedy koncentrácie najviac zastúpených proteínov a naopak najmenej abundantných sa môžu líšiť 7 - 10^{10} krát, čo je dynamický rozsah, ktorý nemožno dosiahnuť ani jednou súčasnou analytickou metódou (Domon, 2006; Zubarev, 2013). Zastúpenie proteínov je determinované vysoko regulovanými mechanizmami biogenézy a degradácie, výsledkom ktorých je dynamická kontrola komplexity proteómu.



Obr. 1: Komplexita proteómu ako dôsledok početných faktorov, (Harper a Bennett, 2016, upravené).

2.1 Posttranslačné modifikácie proteínov

Doposiaľ bolo popísaných viac ako 300 prirodzene sa vyskytujúcich aminokyselín, z nich však iba 22 je proteínogénnych. Proteíny vzniknuté transláciou mRNA prepisu kódujúcej DNA podliehajú modifikáciám, ktoré podstatne zvyšujú diverzitu proteínov prítomných v živých bunkách. Databáza Unimod registruje viac ako 1377 rôznych modifikácií proteínov (<http://www.unimod.org>; 03/2017). Posttranslačné modifikácie (PTM) môžu byť zoskupené na základe svojej stability, na reverzibilné a ireverzibilné; ireverzibilné modifikácie sú často asociované so starnutím alebo poškodením buniek (tkaniva), kdežto prechodné reverzibilné modifikácie bývajú asociované so šírením signálu a reguláciou (Liddy et al., 2013). Na modifikácie možno nahliadať tiež z pohľadu ich pôvodu, buď sú výsledkom cielených enzymatických reakcií, alebo dôsledkom spontánnych chemických procesov (v bunke). Ďalej je možné deliť PTM na tie, ktoré pozmeňujú postranný aminokyselinový reťazec a tie, ktoré ovplyvňujú peptidovú väzbu (Stadman a Levine, 2000). Všetky sú však kovalentného charakteru.

Mnohé PTM sú integrálne pre životné procesy buniek. Reverzibilná fosforylácia proteínov plní funkciu v bunečnom cykle, raste buniek, apoptóze a signalizačných dráhach. Naviazanie cukornej zložky, glykozylácia, môže ovplyvniť skladanie proteínov, ich konformáciu, lokalizáciu, stabilitu a aktivitu. Životnosť proteínov býva ovplyvnená naviazaním 8 kDa polypeptidu ubikvitínu na príslušný lyzín a následnou polyubikvitináciou, ktorá vedie až k degradácii daného proteínu proteazómovým komplexom. Dôležitými PTM z tohto pohľadu sú tiež metylácia, acetylácia, S-nitrosylácia a početné ďalšie. Proteíny však podliehajú tiež ireverzibilným modifikáciám, ktoré nemusia byť žiaduce, ale naopak často vedú k poškodeniu proteínu, strate správnej konformácie a funkcie. A práve tie sú predmetom záujmu tejto bakalárskej práce.

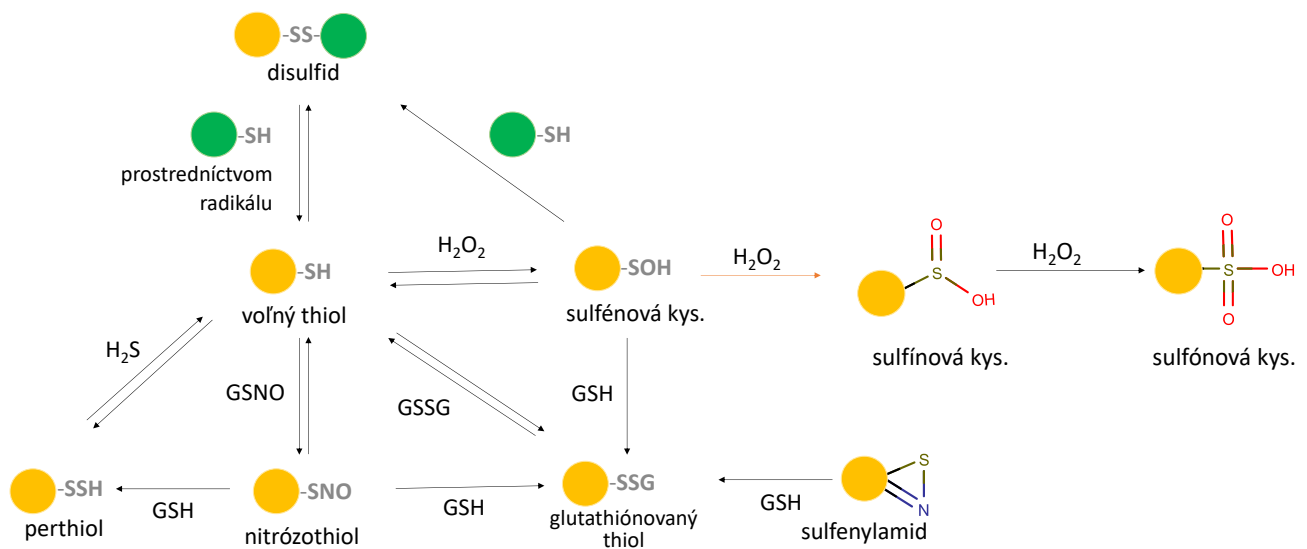
2.1.1 Oxidačné modifikácie proteínov

Reaktívne formy kyslíka a dusíka (ROS resp. RNS), ktoré sú generované ako vedľajší produkt biologických procesov (najmä koncového dýchacieho reťazca) alebo ako výsledok oxidatívneho stresu prostredia, spôsobujú špecifické reverzibilné (s účelom signalizácie) a ireverzibilné (oxidačné poškodenie) biomolekúl (Liddy et al, 2013). Proteíny sú považované za hlavný cieľ reaktívnych oxidačných foriem, pričom až 68 % oxidovaných biomolekúl v bunke sú práve proteíny (Rinalducci, Murgiano a Zolla,

2008). K oxidácii aminokyselín polypeptidového reťazca dochádza buď priamo alebo sprostredkované formáciou reaktívnych medziproduktov. Vzhľadom na množstvo oxidačných modifikácií budú ďalej spomenuté iba tie najintenzívnejšie preštudované, a to oxidácia cysteínu a metionínu, nitrácia, karbonylácia, glykácia a deamidácia proteínov.

2.1.1.1 Oxidačné modifikácie cysteínu

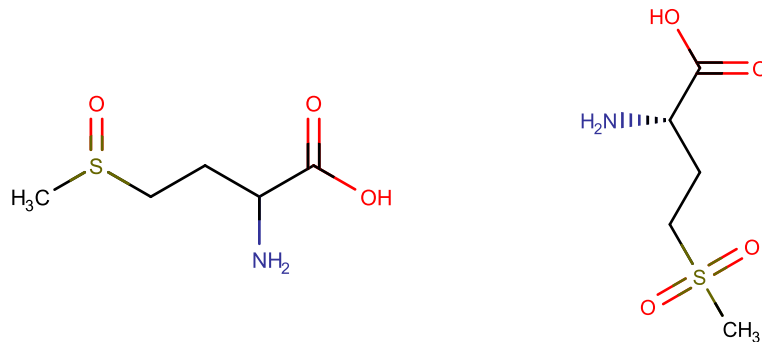
Thiolová skupina cysteínu (Cys) je náchylná k oxidácii. Tvorba jednotlivých oxidačných modifikácií na Cys (Obr. 2) závisí na lokálnom redoxnom stave prostredia, či však bude daný Cys oxidovaný ROS/RNS podmieňuje aj jeho lokalizácia (prístupnosť) a konkrétne chemické vlastnosti (napr. disociačná konštantna pKa), pričom pravdepodobne iba minoritná časť cysteínov je oxidácii prístupná (Chung et al., 2013). Oxidačné PTM Cys môžu stabilizovať štruktúru proteínu, pre mnohé proteíny je nevyhnutné vytvorenie správnych disulfidových väzieb, na základe ktorých prebieha ďalšie zbalovanie proteínu. Ovplyvňujú tiež odolnosť proteínu, disulfidové väzby sú napr. jedným z faktorov zvyšujúcich termostabilitu proteínu (Kim et al., 2015).



Obr. 2: Skupina voľného thiolu môže byť modifikovaná malými molekulami, reakciou so sírovodíkom tzv. „S-sulphydration“ za vzniku persulfidovej väzby R-SSH, S-nitrozyláciou, S-glutathionyláciou a sulfenyláciou peroxidom vodíka. Ďalšími reverzibilnými modifikáciami sulfénovej kyseliny sú vznik disulfidovej väzby, S-glutathionylácia a vznik sulfenylamidu. So zvýšenou koncentráciou ROS vznikajú ireverzibilné modifikácie: sulfínová a sulfónová kyselina, (Chung et al., 2013, upravené).

2.1.1.2 Oxidácia metionínu

Metionín (Met), obsahujúci atóm síry, podobne ako cysteín, je ľahko oxidovateľný širokým spektrom oxidantov na metionínsulfoxid a metionínsulfón (Obr. 3).

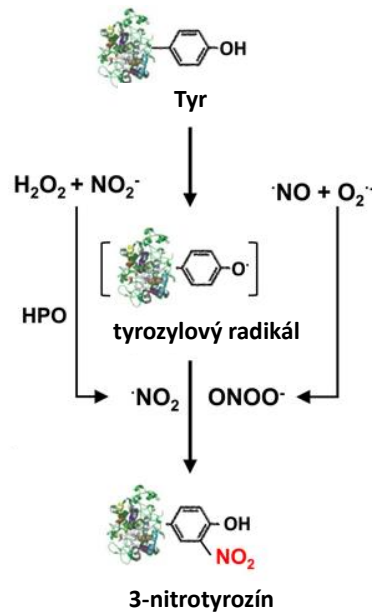


Obr. 3: Metionínsulfoxid, metionínsulfón

Iba v prípade týchto dvoch aminokyselín môže byť oxidácia reverzibilnou. Reverziu na nemodifikovaný Met zabezpečuje enzýmová rodina metionínsulfoxid reduktáz (Lee et al., 2009). Met pravdepodobne môže slúžiť ako antioxidant chrániaci ostatné aminokyseliny pred oxidačným poškodením (Levine et al., 1999). Oxidácia Met bola navrhnutá ako marker pre degradáciu proteínu bunecným aparátom, kvôli pozorovanému zvýšenému obratu „turnover“ proteínov s oxidovaným Met, zdokumentovaný je však aj znížený obrat niektorých značne modifikovaných proteínov (Davies, 2005).

2.1.1.3 Nitrácia proteínov

Najčastejším produktom nitrácie proteínov je nitrotyrozín (Obr. 4) a oveľa menej nitrotryptofán (Černý et al., 2013). Nitrácia tyrozínu (Tyr) je už dlhodobo považovaná za biomarker nitro-oxidačného stresu. Demonštrovať relevanciu nitrácie v súvislosti so stratou funkcie proteínov *in vivo*, teda jednoznačne preukázať priamy a kvantitatívny vzťah medzi rozsahom nitrácie Tyr v špecifických proteínoch a biologickou odpoveďou v bunke, sa ukazuje ako náročné aj preto, že vplyv nitrácie Tyr v biologických procesoch je zvyčajne zastretý početnosťou súčasných oxidačných javov (Radi, 2013).

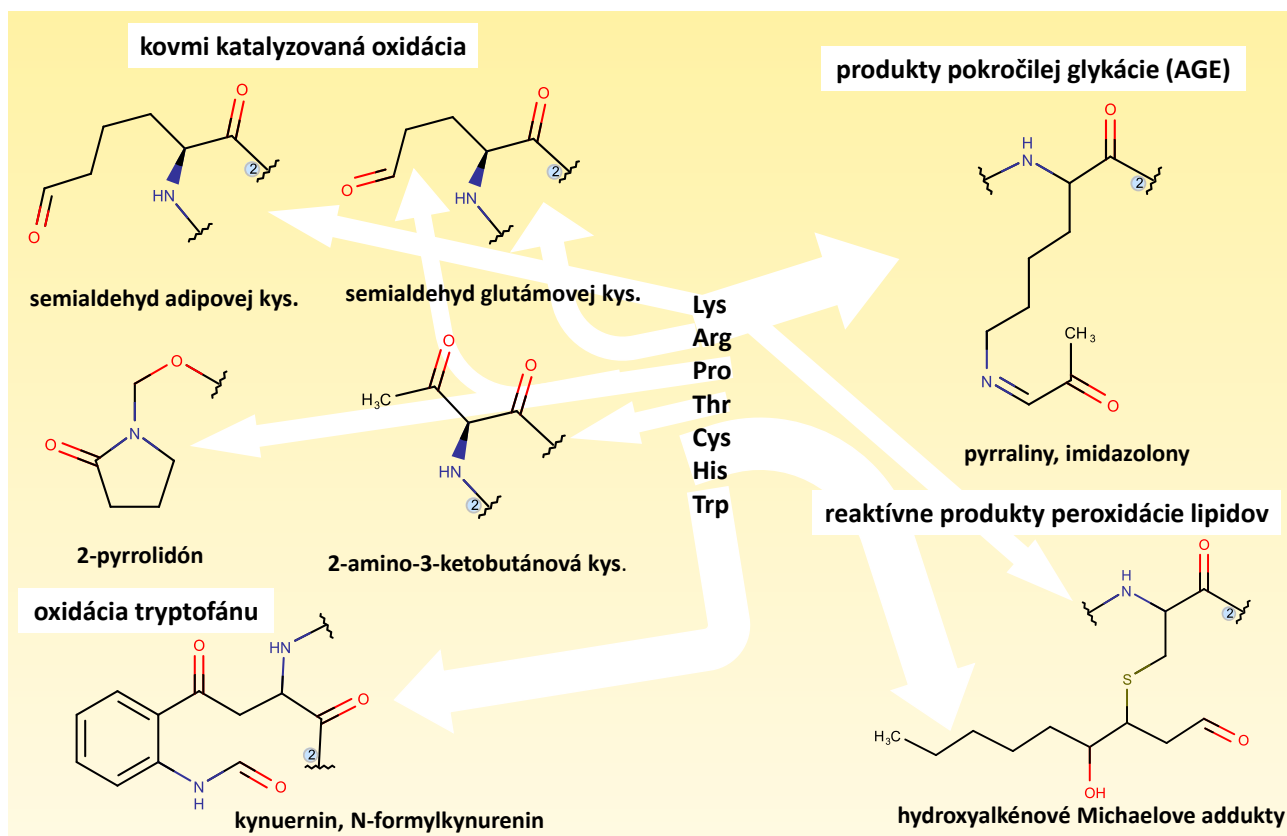


Obr. 4: V prvom kroku je tyrozín oxidovaný radikálmi $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{OH}$, alebo $\text{CO}\cdot^{-3}$. Následná nitrácia prebieha prostredníctvom dvoch hlavných dráh. Reakciou s peroxynitritom $\text{ONOO}\cdot$ ktorý vzniká promptnou reakciou radikálov oxidu dusnatého a superoxidu. Či reakciou s radikálom oxidu dusičitého $\cdot\text{NO}_2$ vzniknutým reakciou peroxidu vodíka a dusitanu v prítomnosti hemoperoxidázy (Corpas et al., 2013, upravené).

2.1.1.4 Karbonylácia proteínov

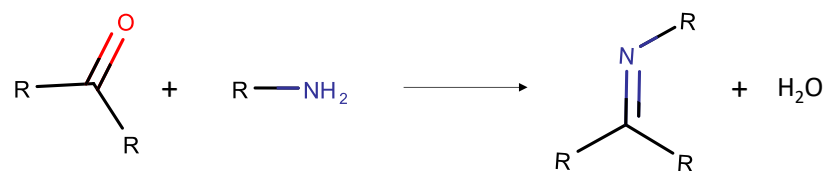
Karbonylácia proteínov (Obr. 5) je považovaná za tretiu najčastejšiu PTM, po oxidácii cysteínu a metionínu (Černý et al., 2013). Jedná sa o ireverzibilnú modifikáciu, ktorej výsledkom je reaktívna karbonylová skupina (aldehyd, ketón alebo laktám) naviazaná na molekulu proteínu (Fedorova et al., 2014). Postranné reťazce, najmä lyzínu, arginínu, prolínu a treonínu sú karbonylované priamo hydroxylovými radikálmi vznikajúcimi Fentonovou reakciou, v ktorej sú ióny kovov redukované v prítomnosti peroxidu vodíka (Stadtman a Berlett, 1991).

Priamo oxidovaný môže byť tiež tryptofán (Trp), pričom rozštiepením jeho indolového kruhu vznikajú z karbonylových zlúčenín kynurenin, N-formylkynurenin (s aldehydovou resp. keto skupinou) a dva laktámy. Oxidácie Trp v kontexte karbonylácie proteínov však doposiaľ neboli predmetom detailného štúdia (Fedorova et al., 2014).



Obr. 5: Rôzne podoby karbonylácie aminokyselín v proteínoch, (Dalle-Donne et al., 2003), upravené.

Nepriama karbonylácia proteínov je však rozšírenejšia. Zahrňuje reakcie s oxidovanými konečnými produktmi pokročilej glykácie (AGE) alebo produktmi oxidácie lipidov hydroxylovým radikálom (LPP). LPP, ako silné elektrofil, ochotne reagujú s postrannými reťazcami cysteínu, histidínu, lyzínu a arginínu za vzniku Michaelovho aduktu. V niektorých prípadoch následnou reakciou s ϵ -aminoskupinou lyzínu vznikajú Schiffove bázy (Obr. 6) a teda dochádza ku sieťovaniu „cross-linking“ aminokyselín (Yuan et al., 2007). Analýzu karbonylových PTM komplikuje nestabilita karbonylovej skupiny, ktorá ochotne interaguje s najbližšou aminoskupinou, dokonca aj v priebehu skladovania pri teplote - 80 °C (Madian a Regnier, 2010).

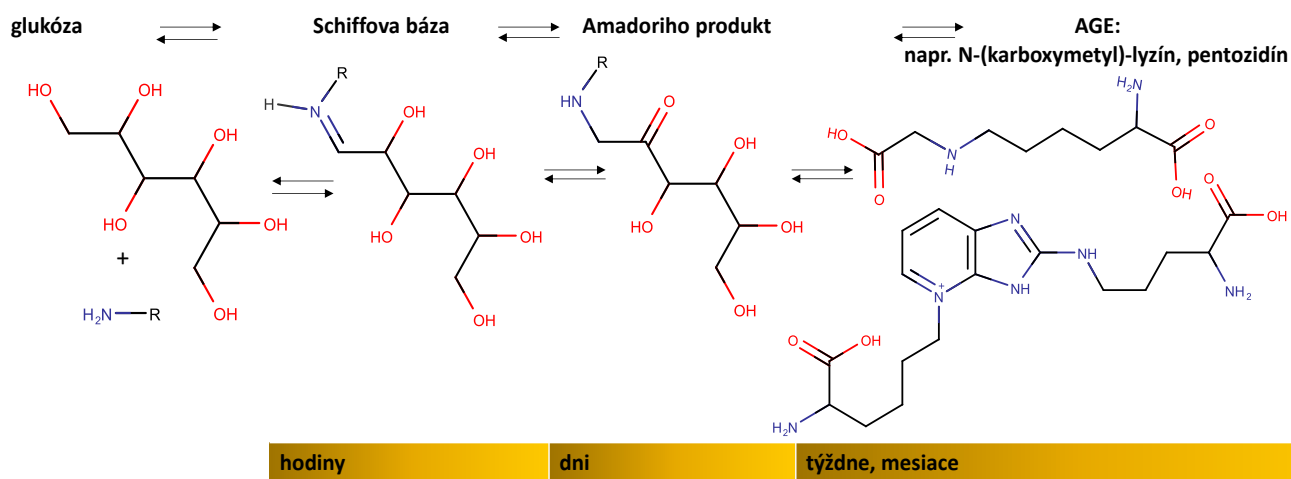


Schiffova báza

Obr. 6: Vznik Schiffovej bázy – imínu reakciou karbonylovej a aminoskupiny.

2.1.1.5 Glykácia proteínov

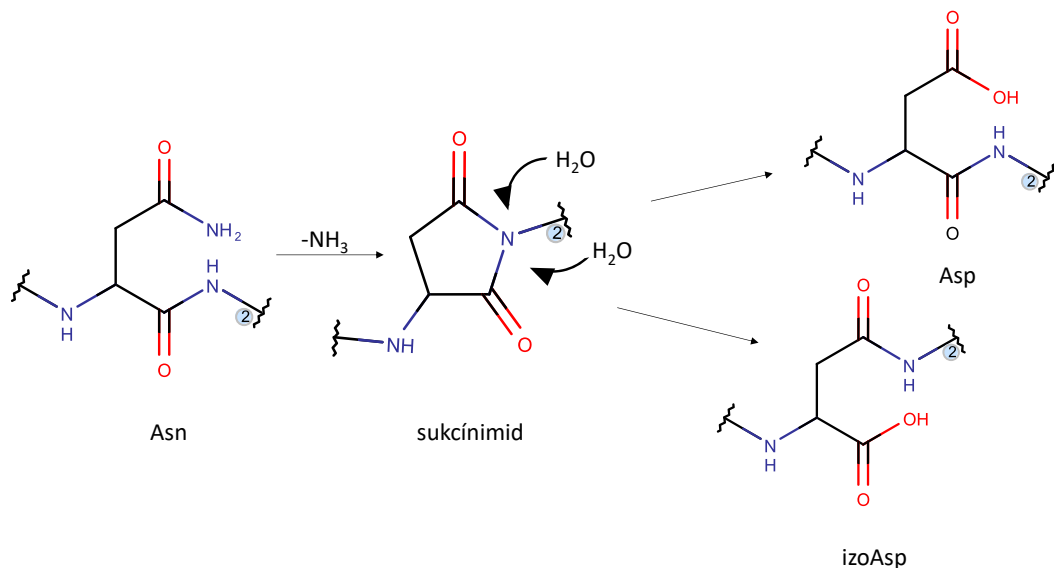
Ku glykácii proteínov dochádza ne-enzymaticky v niekoľkých krokoch tzv. Maillardovej reakcie. Aldehydová skupina redukujúcich sacharidov (alebo ich derivátov) kondenzuje s terminálnymi aminoskupinami polypeptidového reťazca, ε-aminoskupinami lyzínov alebo guanidínovou skupinou arginínov za vzniku Schiffovej bázy. Amadoriho prešmyk vodíka hydroxylovej skupiny uhlíka C2 na dusík viazaný dvojitou väzbou na uhlík C1 vedie k vzniku ketónu. Tento ketoamín, Amadoriho produkt, môže pomaly samovoľne revertovať a teda dochádza k obnoveniu voľného sacharidu a amínu. Amadoriho produkt však môže byť ďalej oxidovaný za vzniku heterogénnej skupiny zlúčenín známych pod názvom produkty pokročilej glykácie AGE (Obr. 7) (Priego et al., 2009).



Obr. 7: Schéma vzniku pokročilých produktov glykácie AGE (Busch et al., 2010, upravené).

2.1.1.6 Deamidácia proteínov

Asparagín (Asn) a glutamín (Gln) v proteínoch i peptidoch môžu byť deamidované prostredníctvom spontánnych chemických reakcií, ku ktorým dochádza in vivo aj in vitro s rôznou intenzitou, ktorá je podmienená 3D štruktúrou proteínu, lokálnym pH, teplotou, koncentráciou iónov atď. V závislosti na susedných aminokyselinách sa pri neutrálnom pH a 37 °C polčasy deamidácie Asn a Gln pohybujú v rozsahu 1 – 500 dní resp. 100 – 1000 dní. Relatívne vysoká frekvencia samotného výskytu a tiež deamidácie Asn a Gln tiež viedlo k postulácii idey tzv. vnútorných hodín, ktoré odpočítavajú biologické udalosti v „živote“ proteínu. (Robinson a Robinson, 2001). Oveľa častejšie dochádza k deamidácii pri zvýšenom pH, čo je typické pre štiepenie trypsínom. Preto je zložité odlíšiť prirodzenú deamidáciu proteínu, ktorá môže byť markerom starnutia proteínu, od deamidácie ako artefaktu prípravy proteomického vzorku (Hao et al., 2011). Deamidácia Asn (Obr. 8) prebieha v prvom kroku formovaním cyklického medziproduktu kondenzáciou postranného reťazca amidovej skupiny s karbonylovou skupinou nasledujúcej aminokyseliny, v druhom kroku dochádza k hydrolytickému otvoreniu kruhu. Táto hydrolyza poskytuje dva produkty aspartát Asp a izoaspartát (izoAsp) a to v pomere až 3 : 7. Vznik izoAsp vedie k významným zmenám v peptidovej „kostre“ proteínu a preto je často dôvodom straty biologickej aktivity (Shimizu et al., 2005).



Obr. 8: Schéma deamidácie Asn cez medziprodukt sukcinimid s prevalentným výsledným produktom – asparágovou kyselinou.

2.2 Proteomické metódy

Skúmanie kovalentnej štruktúry proteínov bolo pred „genomickou revolúciou“ založené na chemických a enzymatických reakciách vzoriek jediného vysoko purifikovaného proteínu. Produkty týchto reakcií boli tradične detekované spektrofotometricky, na základe absorbancie UV alebo fluorescenčného žiarenia. Avšak už v polovici 90. rokov minulého storočia niekoľko rôznych prístupov založených na hmotnostnej spektrometrii (MS) prakticky nahradilo Edmanovo odbúravanie na pozícii hlavného nástroja pre determináciu aminokyselinovej sekvencie polypeptidov. Trend využívania MS bol akcelerovaný genómovými projektami. Genomika teda poskytla kompletné genomické sekvencie kľúčové pre rýchlu a robustnú identifikáciu proteínov koreláciou MS peptidových meraní so sekvenčnými databázami. Systematickú analýzu komplexných vzoriek proteínov jednotlivých tkanív (pletív) či buniek zahŕňa pojem proteomika, ktorej ústredným nástrojom je hmotnostná spektrometria (Domon, 2006).

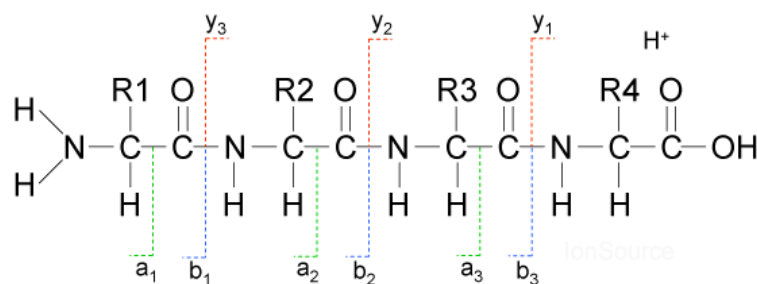
2.2.1 Hmotnostná spektrometria

Slovami John B. Fenna, laureáta Nobelovej ceny za chémiu za jeho príspevok k vývoju elektrosprejovej ionizácie, je hmotnostná spektrometria, umením merania atómov a molekúl za účelom určenia ich molekulárnej hmotnosti. Takáto informácia o hmote je niekedy dostačujúca, často nevyhnutná a vždy užitočná pri identifikácii molekuly. Toto umenie sa praktizuje tak, že je molekule záujmu dodaný náboj a potom je merané, ako trajektórie vzniknutých iónov reagujú vo vákuu na rôzne kombinácie elektrických a magnetických polí (Jayshree Ramkumar, 2014).

Od roku 1912, kedy bol zostrojený prvý hmotnostný spektrometer, bolo využitie MS obmedzené na detekciu malých, teplotne stabilných molekúl, z dôvodu nedostatku efektívnych techník umožňujúcich „mäkko“ ionizovať a transferovať ionizované molekuly z kondenzovaného do plynného stavu bez nadmernej fragmentácie. 80. roky minulého storočia však priniesli dve techniky schopné rutínnej premeny intaktných biomolekúl na molekulové ióny – elektrosprejová ionizácia (ESI) a matricou asistovaná laserová desorpcia/ionizácia (MALDI). MS sa tak stala významným analytickým nástrojom s kvalitatívnymi i kvantitatívnymi aplikáciami (El-Aneed et al., 2009; Domon, 2006).

2.2.1.1 Tandemová hmotnostná spektrometria (MS/MS)

V MS/MS sú (proteínové) vzorky premieňané na ióny v zdroji ionizácie a následne separované podľa pomeru hmoty a náboja (m/z). Následne sú vybrané ióny so špecifickým m/z (tzv. prekursorové ióny) a fragmentované na produktové ióny kolíziou indukovanou disociáciou (CID), disociáciou prijatím elektrónu (ECD), fotodisociáciou a pod. Hmotnostné spektrum (zobrazenie intenzity iónu ako funkcie m/z) je získané prostredníctvom druhého analyzátora hmoty. Hmotnostné spektrometry umožňujúce tandemovú analýzu sú napr. trojitý kvadrupól (QQQ), qTOF (kvadrupól v spojení s analyzátorom rýchlosti doletu), hybridné hmotnostné spektrometry spájajúce iónovú pascu s analyzátorom typu FTMS (založenom na Fourierovej transformácii iónovej cyklotrónovej rezonancie). Často bývajú napojené na chromatografickú kolónu. Fragmentácia plyných iónov je esenciálna pre MS/MS a v závislosti od typu môže poskytnúť rôzne typy fragmentov a rôzne informácie o štruktúre a kompozícii molekuly. Princípom jednej z najpoužívanějších foriem fragmentácie, CID je zrážka akcelerovaných iónov s neutrálnym plynom (argón, hélium). U QQQ prebieha fragmentácia zvyčajne v druhom kvadrupóle, ktorý býva označovaný ako kolízna cela a pri podmienkach nízko energetického CID, s rozsahom kolíznej energie 1-200 eV a efektívnosťou fragmentácie 5-50 % (Mitchell Wells a McLuckey, 2005). Tento typ fragmentácie sa radí medzi „pomaly-zahrievacie“ techniky a preto sú vo výsledku preferenčným štiepením slabších väzieb peptidového reťazca produkované ióny b a y (Obr.9).



Zdroj: http://www.ionsource.com/tutorial/DeNovo/art/aby_anno_frag.gif

Obrázok 9: Typy iónov, ktoré môžu vzniknúť fragmentáciou peptidového reťazca. Využívané pri de-novo sekvenovaní peptidov (proteínov). Pretože peptidy sú v pozitívnom móde protonované, vzniknuté fragmenty sú tiež katióny.

2.2.1.2 Kvantifikácia prostredníctvom MS

Proteíny separované technikou 2D gélovej elektroforézy a následne analyzované pomocou MS resp. tandemovej hmotnostnej spektrometrie MS/MS boli tradične kvantifikované intenzitou zafarbenia danej škvrny na gély. Zo súčasného pohľadu medzi nevýhody tohto spôsobu kvantifikácie patrí limitovaný dynamický rozsah, ťažkosti pri manipulácii s membránovými proteínmi, náročnosť identifikácie proteínov s extrémnymi hodnotami pI, či molekulárnej hmotnosti. Proteomika preto smerovala k vývoju metód, ktoré nie sú založené na príprave vzoriek pomocou gélu. Zavedením vnútorného štandardu v podobe zlúčenín značených stabilnými izotopmi, ktoré sa neznačených líšia v hmote, ale ostatné chemické a fyzikálne vlastnosti, ktoré by mohli ovplyvniť spôsob, akým sú prostredníctvom hmotnostného spektrometra analyzované, sú rovnaké. Medzi to metódy patria izotopovo kódované afinitné značky (ICAT), *in vivo* inkorporácia ťažkých izotopov v bunkových kultúrach metódou SILAC, enzymatické značenie pomocou izotopov kyslíka $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$, tandemové hmotnostné značky TMT i izobarické značky pre relatívnu a absolútnu kvantifikáciu iTRAQ využívané v MS/MS (Zhu et al., 2010). I tieto však majú svoje potenciálne limitácie v podobe predĺženého času a komplexity prípravy vzorky, potreby zvýšenej koncentrácie vzorky, vysokej ceny reagentov a nekompletného značenia.

2.2.1.2.1 Relatívna kvantifikácia pomocou intenzity pík v LC-MS

Kvantifikáciu bez značenia možno previesť dvoma spôsobmi. Relatívna kvantifikácia pomocou intenzity pík je založená na lineárnej korelácii medzi množstvom ionizovaného proteínu (peptidu) a plochou píku chromatografie, ktorá odpovedá intenzite píku v čase eluovania daného peptidu. Intenzitu je možné počítať tiež ako výšku daného píku. Výsledky možno a je žiadúce spresniť normalizáciou vypočítaných plôch pík, ktorá odstráni variáciu spôsobenú odchýlkami v príprave vzorky a vstrekaní na kolónu. Tento typ analýzy tiež vyžaduje zarovnanie (alignment) pík chromatografie jednotlivých meraní, nakoľko môže dochádzať k posunom v dôsledku opotrebovania chromatografickej kolóny. Množstvo nameraných dát možno spracovať pomocou softvéru, ktorý odlíši píky peptidov od pozadia a tiež od seba navzájom, avšak niekedy je nutná manuálna korekcia (Zhu et al., 2010).

2.2.1.2.2 *Relatívna kvantifikácia pomocou počítania spektier v LC-MS*

Kvantifikácia prostredníctvom počítania spektier je jednoduchá metóda založená na princípe, že cieľenej analýze je pravdepodobnosť výberu abundančných prekursorových iónov vyššia a ak sú dané abundantné peptidy vybrané a fragmentované, je tiež vyššia pravdepodobnosť, že budú úspešne identifikované na základe ich hmotnostných spektier (oproti menej zastúpeným prekursorovým iónom). Proteíny sú potom kvantifikované ako suma všetkých peptidov a k nim úspešne priradených hmotnostných spektier. Predominantne je táto metóda využívaná v tzv. „bottom-up proteomike, ktorej súčasťou je štiepenie proteínového vzorku na peptidy. Do úvahy je potrebné vziať, že priama kvantifikácia pomocou metódy počítania spektier poskytuje preukázateľne menej presné odhady relatívnej abundancie proteínov v porovnaní s inými metódami kvantifikácie v „bottom-up“ analýze. Alternatívne pri štúdiu intaktných proteínov metódou „top-down“ a implementovaní štatistických testov boli získané výsledky porovnateľné (alebo dokonca s vyššou citlivosťou) s kvantifikáciou založenou na normalizovaných intenzitách pík (Geis-Asteggiane et al., 2016).

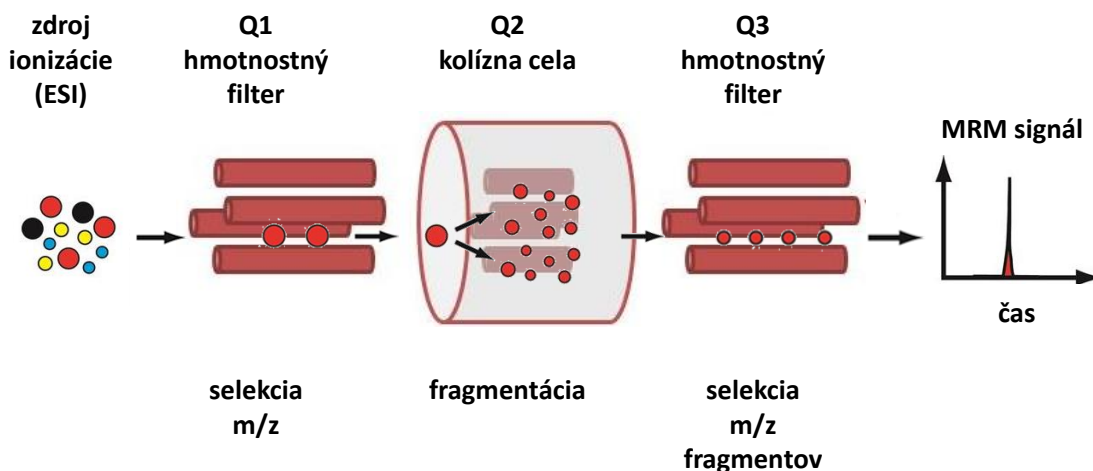
2.2.1.2.3 *Cieľená analýza pomocou metódy SRM-MS/MS*

Ďalšou stratégiou sú prístupy založené na štatistickom vyhodnotení ako SRM a SWATH. Absolútnu kvantifikáciu zase poskytuje napr. metóda AQUA peptidov (Chahrour et al., 2015).

Dáta, ktoré vo výsledku poskytnú proteomický prístup založený na identifikácii veľkého počtu proteínov vo vzorku, nie sú vždy užitočné pre zodpovedanie niektorých biologických otázok. Na overovanie hypotézy je užitočnejším prístupom cieľená proteomika. Analýza sa sústreďuje iba na podsúbor proteínov záujmu, ktorých zastúpenie je sledované a porovnávané v rámci sady vzoriek (Marx, 2012). Hmotnostný spektrometer s trojitým kvadrupólom (QQQ-MS) (Obr. 10) umožňuje prevedenie metódy SRM (monitorovanie vybranej reakcie), keďže reakcií je väčšinou monitorovaných viac, hovoríme o MRM (monitorovanie viacerých reakcií) (Picotti et al., 2010; 2013).

Vybraný malý počet proteotypických peptidov, ktoré unikátne a stechiometricky reprezentujú kandidátne proteín(y) záujmu, je selektívne meraných v predefinovaných rozsahoch m/z a „oknách“ retenčných časov kvapalinovej chromatografie. Tieto peptidy

sú kvantifikované monitorovaním špecifických párov prekursor-produktový iont tvz. tranzícií (Frost a Li, 2014).



Obr. 10: Schéma princípu hmotnostného spektrometru s trojitým kvadrupólom, upravené podľa Wikimedia Commons

Hlavnou výhodou SRM prístupu je vyššia senzitivita, oproti proteomickým metódam zameraným na identifikáciu proteínov vo vzorku, možno sledovať zmeny zastúpenia aj peptidov (prislúchajúcim proteínom záujmu) s malým počtom kópií, teda malou abundanciou vo vzorku. Dôležitým krokom je vybranie proteotypických peptidov pre dosiahnutie čo najvyššej senzitivity. Ďalšou výhodou je reproducibilita, pri dodržaní parametrov metódy, je metóda prenositeľná medzi laboratóriami s porovnateľnými výsledkami. Rýchlosť je tiež pozitívom, po vytvorení SRM metódy, sú nasledujúce merania časovo oveľa menej náročné oproti metódam založeným na identifikácii proteínov (peptidov) (Marx, 2012).

2.3 Jačmeň siaty *Hordeum vulgare*

V experimentálnej časti bakalárskej práce bola použitá modelová rastlina jačmeň siaty, *Hordeum vulgare* L., čeľaďe lipnicovité *Poaceae*, je kultúrna samoopelivá jednoročná rastlina. Plodom je jednosemenná nažka – obilka. Jedná sa o diploidný druh s chromozómovým číslom 7. Genóm jačmeňa, o veľkosti 5,1 Gb, patrí medzi najväčšie doposiaľ osekvenované diploidné genómy. Identifikovaných bolo 26 159 transkribovaných lokusov na základe homológie s ryžou, čirokom, arábovkou a mrvicou, celkový počet génov sa odhaduje na 30400 (Mayer et al., 2012). Podľa štatistík Organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO) z roku 2014 je jačmeň štvrtou najpestovanejšou plodinou s celosvetovou pestovateľskou plochou takmer

50 mil. ha (UN Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT), 2016). Dve tretiny produkcie sa používajú ako krmivo pre zvieratá, jedna tretina v sladovníctve a asi 2 % pre ľudskú spotrebu (Baik a Ullrich, 2008). Agronomický význam a dostupnosť sekvencie genómu tak robia jačmeň atraktívnym predmetom štúdia.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Extrakcia celkového proteómu pre analýzu vplyvu tepla

Použitým materiálom boli obilky jačmeňa *Hordeum vulgare* L. kultivar Sebastian. V prvej časti experimentu boli pripravené proteínové extrakty (Tab. 1) v dvoch biologických opakovaniach určené na prvotné merania, ktorých výsledok slúžil na optimalizáciu SRM metódy. Rovnakým spôsobom bola pripravená sada vzoriek vystavených teplote 99 °C po dobu 30, 60, 120, 24 x 60 min použitá na analýzu teplotného stresu.

Tab. 1: Extrakcia celkového proteómu pre LC-MS analýzu

homogenizácia		obilky boli homogenizované mlynom v tekutom dusíku
	vystavenie teplote 99 °C v časovom gradiente	inkubácia Thermomixer comfort (Eppendorf), 30 (60, 120, 24 x 60) min, 99 °C
extrakcia	TCA (trichlóroctová kyselina)/acetónová extrakcia	k homogenátu bolo pridané 2 ml 10% (w/v) TCA v acetóne, inkubované cez noc (min. 12 hod) pri -20 °C
		centrifugácia (5 min, 20000 g, 4 °C)
	premyvácia fáza I.	odobranie supernatantu
		re-suspendácia sedimentu (pelet) v 1,5 ml 10% (w/v) TCA v destilovanej H ₂ O
		centrifugácia (5 min, 20000 g, 4 °C)
	premyvácia fáza II.	odobranie supernatantu
		re-suspendácia sedimentu fr v 1,5 ml 80% (w/v) acetóne
		centrifugácia (5 min, 20000 g, 4 °C)
	re-solubilizácia proteínového sedimentu	pridanie 0,8 ml 2 % (w/v) SDS pufri [30% (w/v) sacharóza, 10 % (w/v) acetón, 5% (v/v) merkptoetanol, 5 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0], inkubácia 30 min pri 25 °C
inkubácia	Thermomixer comfort (Eppendorf), 10 min, 500 rpm, 20 °C	

	fenolová extrakcia	k vzorke pridaných 0,4 ml pufrom saturovaného fenolu, dôkladne pretrepané	
		centrifugácia (20 min, 20000 g, 4 °C)	
		odobraná vrchná (fenolová) fáza bez porušenia sacharózovej vrstvy oddeľujúcej fenolovú fázu od vodnej do mikroskúmavky s objemom 2 ml	
	zrážanie proteínov	objem mikroskúmavky doplnený vychladeným roztokom octanu amónneho v metanole	
		inkubácia cez noc pri -20 °C	
		centrifugácia (5 min, 20000 g, 4 °C)	
	premyšvací fáza III.		odobranie supernatantu
			pridanie 1 ml 80 % (v/v) acetónu v dest. H ₂ O
		centrifugácia (5 min, 20000 g, 4 °C)	
	re-solubilizácia proteínového peletu	k vysušenému peletu bolo pridané 300 µl roztoku 100 mM hydrogénuhličitanu amónneho a 8 M močoviny	
		inkubácia Thermomixer comfort (Eppendorf), 60 min, 600 rpm, 25 °C	
stanovenie koncentrácie	Bradfordova metóda (Bradford, 1976)	Sigma - Aldrich	
riedenie		vzorka doplnená roztokom 10 % acetonitrilu (ACN) a 25 mM hydrogénuhličitanu amónneho v destilovanej H ₂ O (finálna koncentrácia: 2 M močovina, 2,5 % ACN)	
štiepenie	trypsínom	pridanie imobilizovaného trypsínu (10 µl na 500 µg proteínu), (Promega)	
		inkubácia (s trypsínom) cez noc pri 30 °C	
odsolenie vzorku	C18 SPEC odsolovacia doštička (Agilent)	doštička aktivovaná 800 µl metanolu	
		premytie doštičky 2 x 400 µl metanolu	

		premytie doštičky 4 x 400 µl redestilovanej H ₂ O
		nanesenie vzorky
		premytie doštičky 4 x 400 µl redestilovanej H ₂ O
		elúcia vzorky 2 x 200 µl metanolu
odparenie	metanolu zo vzorky	SpeedVac koncentrátor (Thermo)
príprava pre LC-MS analýzu		rozpustenie vzorky vo vodnom roztoku 0,1 % mravčej kyseliny a 5 % ACN

3.2 Extrakcia proteómu pre analýzu vplyvu H₂O₂

V druhej fáze experimentu boli vzorky pre analýzu vplyvu silného oxidačného činidla H₂O₂ (3 %; 15 %; 30 %) pripravené podľa protokolu umožňujúceho extrakciu proteínovej frakcie i frakcie mastných kyselín (Bromke et al., 2015), kroky odpovedajúce extrakcii proteínov uvádza Tab. 2.

Tab. 2: Extrakcia proteínovej frakcie, jednotlivé kroky boli vykonávané na ľade

extrakcia	1 ml metanol/metyl tert-butyléter (1:3:1); -20 °C
trepanie	30 min 4 °C
sonikácia	10 min
	500 µl metanol:H ₂ O (1:3)
vortex	5 min 4°C
odobratie lipidovej, proteínovej/škrobovej a semipolárnej fázy	
10 min H ₂ O ₂ (3 %; 15 %; 30 %)	

Proteínová fáza bola následne premytá 80 % ACN a rozpustená v SDS pufre, ďalší postup bol identický s krokmi uvedenými v Tab. 1.

3.3 Extrakcia zo vzoriek potravín spojená s pre-frakcionáciou

V tretej fáze boli extrahované proteíny zo vzoriek pšenično-jačmenného chleba (výrobca uvádza 10 % obsah jačmeňa) a nealkoholického jačmenného piva. Prevedená bola pre-frakcionácia proteínov prostredníctvom denaturatívnej elektroforetickej separácie na polyakrylamidovom géle (PAGE) metódou podľa Laemmliho (Laemmli, 1970). Vzorky piva (400 μ l) a chleba (100 μ l) boli doplnené Laemmliho pufrom na objem 500 μ l resp. 600 μ l. Na základe údajov od výrobcov, kde uvedený obsah proteínov v pive bol 0,5 g na 100 ml, jačmenný chlieb by mal obsahovať 10 % bielkovín, bola odhadnutá koncentrácia proteínov na 5 μ g/ μ l a 6 μ g/ μ l. Vzorky boli nanosené na pripravený polyakrylamidový gél a po priebehu denaturačnej elektroforézy (Bio-Rad; Offgel Fractionator 3100; 50 V - 10 min, 100 V - 30 min, 150 V - 1 h) boli vyrezané časti gélu s očakávanou prítomnosťou frakcie proteínov s molekulovou hmotnosťou \sim 43 Da (prináleží Serpín Z-4, pozri Výsledky a diskusia). Nasledovala dvojkroková dehydratácia gélu pomocou 500 μ l 100% ACN, ktorý bol následne odparený na SpeedVacu. Vysušený gél bol zhomogenizovaný a následne k nemu bolo pridaných 1 μ g trypsínu (Promega). Inkubácia prebehla pri teplotnom optime enzýmu 37 °C a po dobu minimálne 4 hod. Po ukončení štiepenia boli z gélu extrahované peptidy pridaním 100 μ l ACN a sonikáciou po dobu 5 min v dvoch opakovaniach. Odobraný roztok bol doplnený na objem 5 ml 0,1 % roztokom kyseliny mravčej (zníženie koncentrácie ACN pod 5 %). Následne boli vzorky odsolené prostredníctvom C18 chromatografických kolón a vzorka bola ďalej spracovaná spôsobom uvedeným v Tab.1.

3.4 Parametry analýzy SRM-MS v spojení s LC chromatografiou

Pripravené vzorky boli analyzované pomocou hmotnostného spektrometru typu trojitý kvadrupól TSQ Quantiva (Thermo, www.thermoscientific.com, USA) s napojením na kvapalinovú chromatografiu, využitý bol nelineárny gradient 2-35 % ACN v priebehu 60 min. Parametre analýzy na TSQ Quantiva boli: tlak CID – 1,5 mTorr, parametre zdroja: teplota 250 °C, napätie na ihlu (newobjectives silica) 1700 V, vysušací plyn – vypnúť.

Využitá bola lokálna spektrálna knižnica jačmeňa *Hordeum vulgare* L., priradením k nameraným spektrám (z TSQ Quantiva) boli identifikované peptidy a proteíny, z ktorých peptidy pochádzali. Kandidátne peptidy boli následne ciele SRM- založenou analýzou, vytvorenou s použitím v súčasnosti najvyužívanejšieho „open-source“ softvéru na tvorbu SRM-MS metód, Skyline 3.6 (MacCossLab Software, (<https://skyline.gs.washington.edu>)). Skyline okrem vyhodnocovania výsledkov umožňuje plne automatizovanú predikciu a optimalizáciu parametrov SRM metódy, akými je napr. kolízna energia (CE). Vytvorená metóda obsahuje niekoľko tranzícií pre každý produktový ión, ktoré budú zmerané v rozsahu hodnôt CE v okolí hodnoty CE predikovanej na základe existujúcej lineárnej rovnice.

Tab. 3: Ukážka časti zoznamu metódy SRM s príslušnými kolíznymi energiami pre maximalizáciu intenzity meraných prekurzorových iónov

zlúčenina (peptid)	retenčný čas [min]	retenčné okno [min]	polarita	m/z prekurzor	m/z produkt	CE [V]
FALR(+2)	47.5	95	Positive	253.65791	175.118952	15.5
FALR(+2)	47.5	95	Positive	253.65791	288.203016	11.5
FALR(+2)	47.5	95	Positive	253.65791	359.24013	0
FDESNTK(+3)	47.5	95	Positive	280.79598	147.112804	0
FDESNTK(+3)	47.5	95	Positive	280.79598	248.160482	0

Kvantitatívne rozdiely boli posúdené metódou relatívnej kvantifikácie pomocou intenzity píkov chromatografie LC-MS (Černý et al., 2013).

3.5 Necielená proteomická analýza

Vzorky boli analyzované pomocou C18 reverznej chromatografie (15 cm, 0,1 mm, Zorbax Column, Agilent) s priamym napojením na zdroj nanoESI (CaptiveSpray, Bruker). S výnimkou ACN frakcionácie pracoval Dionex Ultimate 3000 RSLC s prietokom 300–500 nl/min a s gradientom ACN 4–35% po dobu 60 min. UHR-TOF spektrometer bol nastavený pre meranie v MS/MS módu pre identifikáciu proteínov (rozsah 50 až 2200 m/z, zber MS spektier 2 Hz, rozsah MS/MS 10-20 Hz, každých 7 s).

Dáta získané LC-MS analýzou boli najskôr spracované v programe Preview™ ([Protein Metrics Inc.](#)), v ktorom bola prevedená rekalibrácia spektier s využitím MIPS jačmennej databázy (HighConf_genes_MIPS_23Mar12_ProteinSeq; <ftp://ftpmips.helmholtz-muenchen.de/>) a súčasne boli predikované najvhodnejšie vyhľadávacie parametre pre program Proteome Discoverer™ (Thermo Scientific) slúžiaci k identifikácii proteínov.

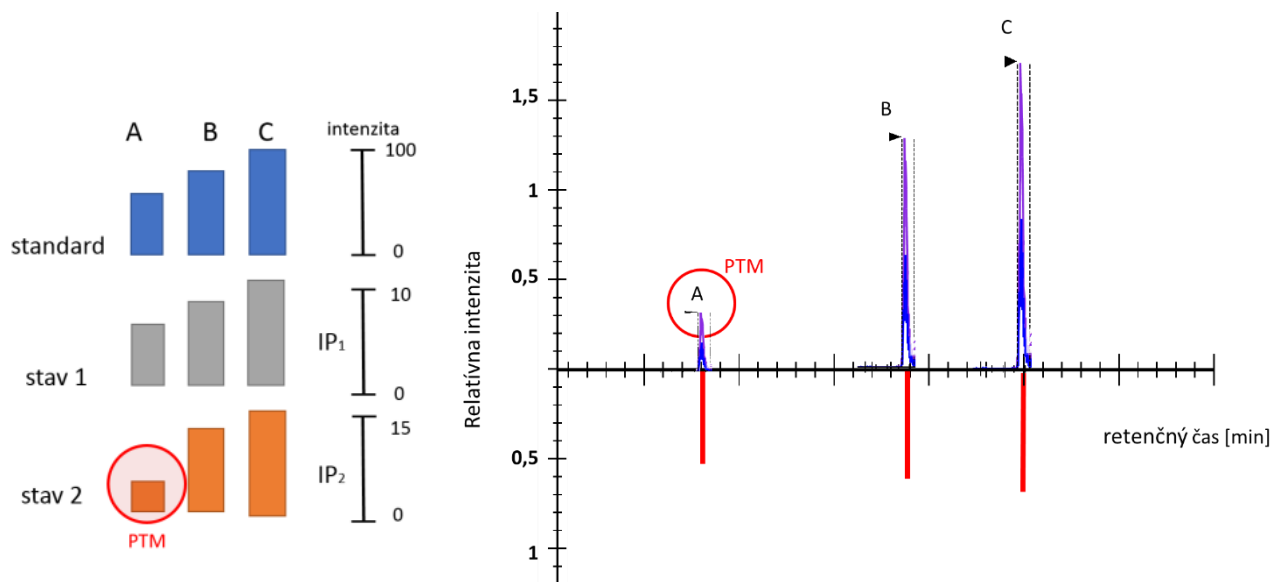
Program Proteome Discover™ pracoval s nastavenými parametrami: trypsin – s možnosťou vynechania maximálne jedného štiepiaceho miesta; tolerancia presnosti MS – 10 ppm; tolerancia MS/MS – 0,05 Da; dynamické modifikácie (maximálny počet tri) – oxidácia (M), deamidácia (N, Q), premena Q na pyro-Glu (N-konec). Ako vyhľadávací algoritmus slúžil Sequest HT využívajúci MIPS jačmennú databázu a hladiny FDR 1% (false discovery rate).

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Vytvorenie SRM-MS metódy pre cieleňú kvantifikáciu peptidov

PTM proteínov možno tradične sledovať pomocou 2-D elektroforézy, ktorá často poskytuje dostatočné rozlíšenie na separovanie modifikovaných (a nemodifikovaných) foriem proteínov na základe náboja a molekulárnej hmotnosti. Modifikované proteíny môžu byť vizualizované priamo na gély alebo po prenesení na membránu (Western blot) pomocou systému založenom na špecifických protilátkach či značení metabolicky. Modifikované proteíny môžu byť tiež odlišené prevedením 2-D elektroforézy so vzorkou proteínu pred a po enzymatickom odštiepení modifikovanej skupiny. Pri dostatočnom množstve proteínu (prúžok/škvrna je zafarbiteľná Coomassie blue – 10-20 ng pre identifikáciu jedného proteínu, množstvo 10 µg a viac pre analýzu ešte komplexných zmesí proteínov, aké poskytne napr. 1-D elektroforéza (Proteomics Core Facility, 2017)) môžu byť jednotlivé škvrny vyrezané z gélu a ďalej analyzované pomocou MS a predchádzajúce metódy potom predstavujú pre-frakcionalizáciu proteómu. Všetky tieto metódy sú však pomerne náročné a náchylné k vzniku falošne pozitívnych výsledkov. V súčasnosti je MS považovaná za jediný skutočne spoľahlivý nástroj k identifikácii proteínov a určení a lokalizácii prítomných PTM.

Primárnym cieľom tejto práce bolo pozorovať, ktoré časti proteínu sú k modifikáciám náchylné. Pre tento účel nie je potrebné poznať identitu prítomných modifikácií. Metódu cielenej analýzy SRM-MS možno využiť na cieleňé sledovanie zastúpenia jednotlivých peptidov a ich zmien v rámci jedného proteínu. SRM-MS analýza poskytuje až o rád vyššiu citlivosť a jediným predpokladom je dostupnosť spektrálnej knižnice, vďaka ktorej je možné metódu optimalizovať a sledovať vybrané peptidy. Spektrálna knižnica peptidov je anotovaná ne-redundantnou databázou peptidových spektier odpovedajúcej analýze tandemovou hmotnostnou spektrometriou v spojení kvapalinovou chromatografiou (LC-MS/MS) daného proteómu. Porovnaním profilov peptidov medzi kontrolným bodom a vzorkom, ktorý bol vystavený stresu (zvýšená teplota, oxidačné činidlo), potom môžeme určiť, ktoré peptidy sa s vysokou pravdepodobnosťou pôsobením stresu menia.



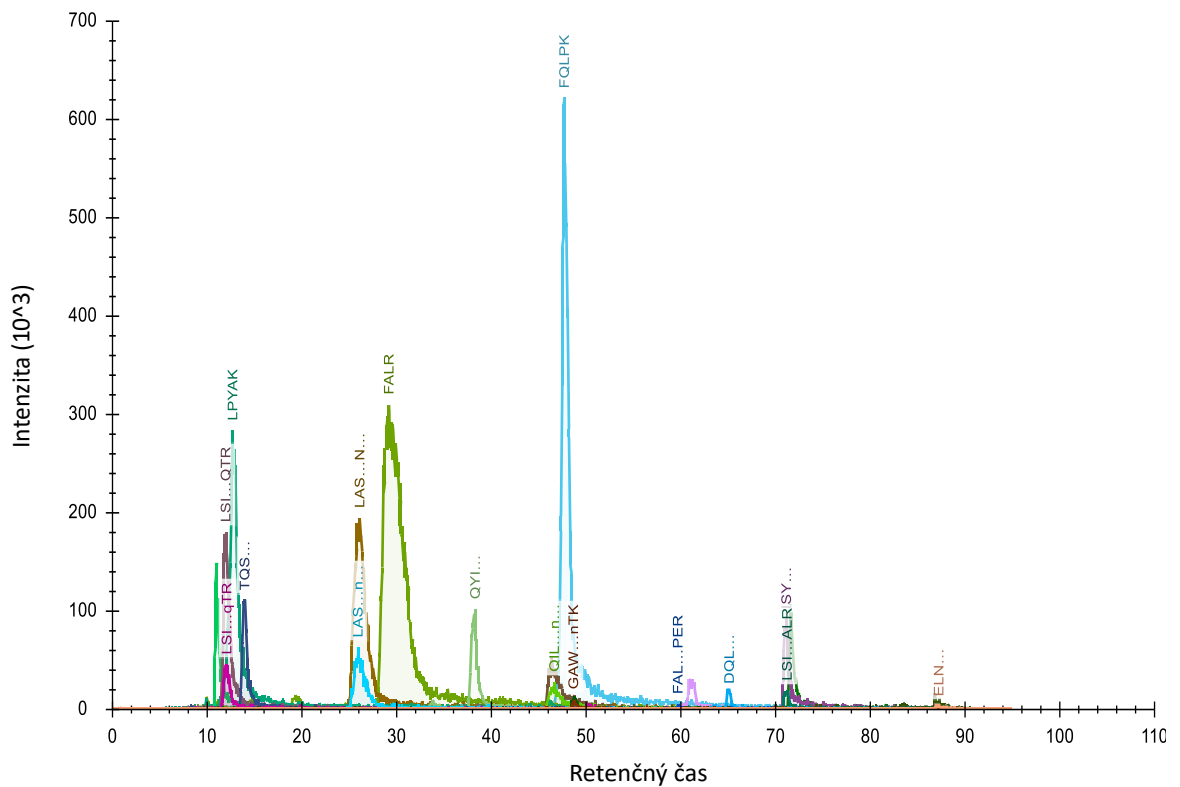
Obr. 11: Zastúpenie (vzájomných pomerov) jednotlivých peptidov by na rozdiel od intenzity, ktorá sa medzi jednotlivými vzorkami môže líšiť, malo zostať zachované. V prípade, že je pozorovaný pomer odlišný, možno usudzovať, že na peptide, ktorého miera zastúpenia sa odlišuje došlo k PTM (Černá et al., 2015).

4.2 Výsledky SRM-MS analýzy

Pre tvorbu metódy boli vybrané 3 identifikované proteíny s najvyššími intenzitami (patriace do frakcie zásobných proteínov) a z nich na základe úspešnosti pokrytia (69,25 % sekvencie), pre výslednú analýzu, teda porovnanie medzi vzorkami Serpín-Z4. Serpín-Z4 je dobrým modelom, pretože patrí medzi najabundantnejšie proteíny jačmennej obilky a zároveň je dostatočne krátky na to, aby bolo možné účinne sledovať väčšinu jeho sekvencie.

4.2.1 Serpín-Z4 (P06293)

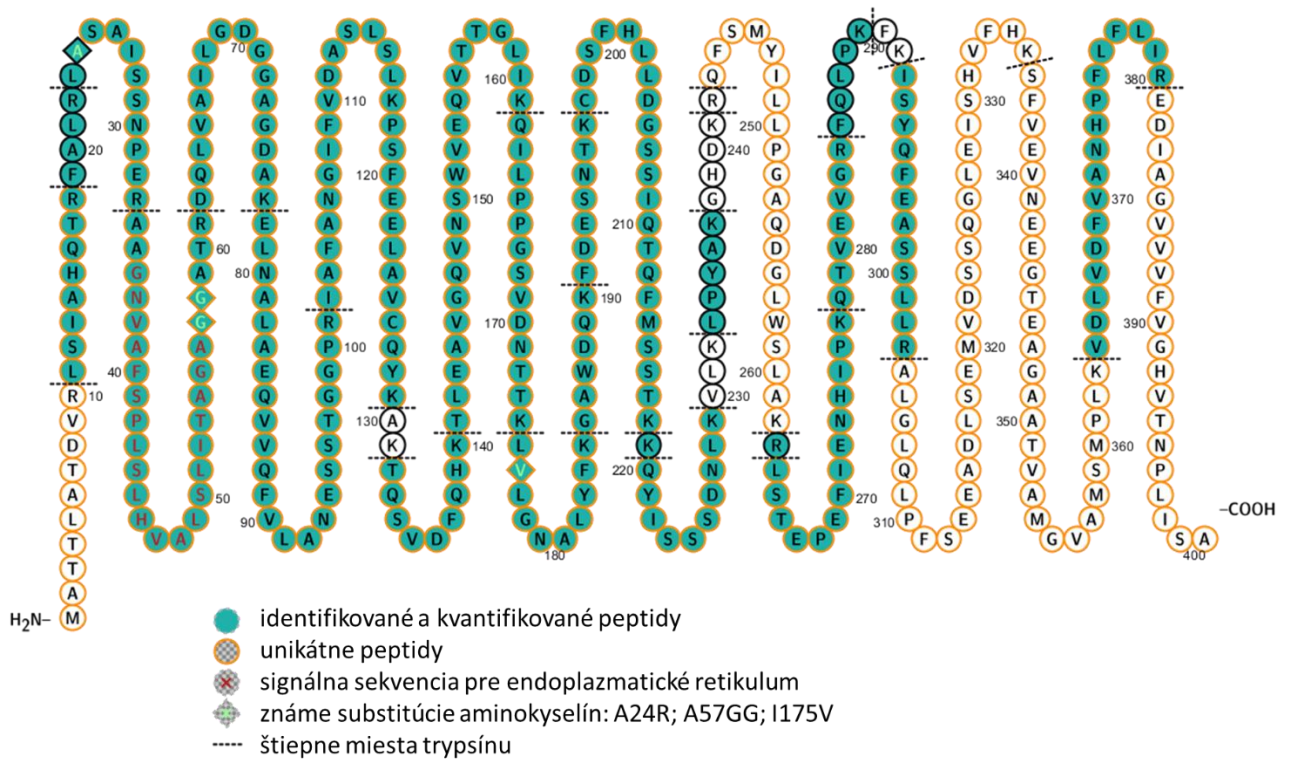
Serpín-Z4, kódovaný lokusom *PAZI*, s dĺžkou reťazca 399 (resp. 400) aminokyselín a molekulárnou hmotnosťou približne 43 kDa, je hlavným komponentom albumínovej frakcie proteínov endospermu obilky jačmeňa. Slúži ako zásobný proteín a významne prispieva k celkovému obsahu lyzínu v obilke. Ako homológ proteínov super-rodiny inhibítorov serínových proteáz – serpínov sa pravdepodobne viaže na príslušnú proteázu za vzniku stabilného (neaktívneho) komplexu, čo sa usudzuje aj na základe potvrdenej inhibície ľudských proteáz Serpínom-Z4 in vitro (Dahl et al., 1996; Roberts, 2003).



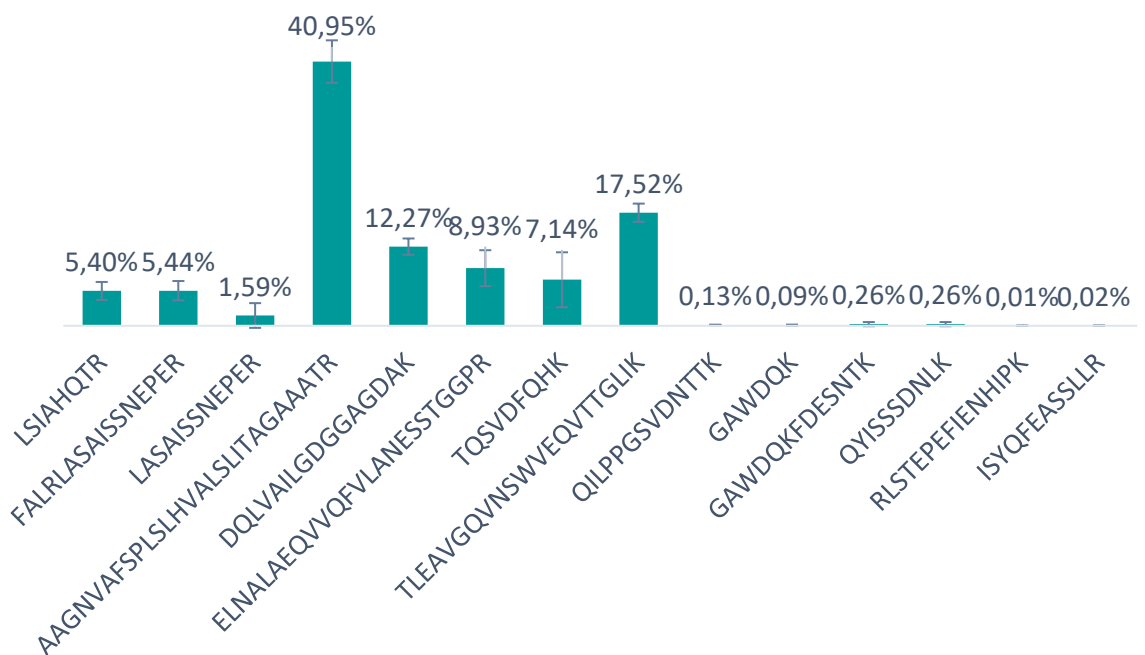
Obr. 12: Náhľad cielenej analýzy dobre detekovateľných peptidov Serpínu-Z4 separované na C18 kolóne Agilent LC pomocou nelineárneho gradientu ACN 2-35 %.

Štiepenie Serpínu-Z4 trypsínom v prípade plnej účinnosti enzýmu poskytuje vo výsledku 30 nemodifikovaných tryptických štepov. Na základe dostupnej spektrálnej knižnice z predchádzajúcich analýz proteómu jačmeňa, bolo identifikovaných 21 peptidov (Obr. 13). Na základe manuálnej kontroly spektier a SRM, bolo vybraných iba 14 kandidátnych peptidov vhodných pre ďalšiu analýzu. Týchto 14 peptidov predstavuje 50,6 % sekvencie, čo sa blíži k maximálnemu možnému pokrytiu dostupného z tryptických štepov. Zvyšná časť sekvencie by bola lepšie dostupná s použitím iného enzýmu, príliš dlhé (rezidua 35-60, 303-334, 335-362). N-terminálna sekvencia obsahuje úsek pre lokalizáciu do endoplazmatického retikula a teda mohla u už spracovaného proteínu chýbať, C-terminálna sekvencia býva často modifikovaná a to je zrejme dôvod, prečo v rámci tejto metódy nebola detekovaná. Zvyšné tryptické štepy o veľkosti 5 a viac aminokyselinových zvyškov síce boli detekované, ale kvalita ich spektier nebola vhodná pre komparatívnu analýzu.

A



B



Obr. 13 : Serpin-Z4. (A) Vizualizácia sekvencia a výsledkov z prevedenej SRM analýzy (UniProt, PeptideRank, Protter); (B) Podiel jednotlivých peptidov na celkovej zmeranej intenzite.

4.3 Sledovanie zmien proteínu (Serpín-Z4) pôsobením teplotného stresu

Stabilita proteínu je pravdepodobne zásadne ovplyvnená bunkovým prostredím – koncentráciou molekúl, intermolekulárnymi interakciami, prítomnými šaperónmi, ko-translačnému skladaniu. Termostabilita vyplývajúca zo samotnej štruktúry proteínu je dobre skúmaná najmä štúdiami s cieleňou mutáciou vybraných aminokyselín s cieľom zvyšovania termostability. Priamu koreláciu teplotnej nestability a obsahu asparagovej kyseliny v proteíne popísali Leuenberger et. al. Predpokladajú tiež, že z evolučného hľadiska je výhodná abundancia teplotne stabilných proteínov vzhľadom na náklady bunky vyplývajúce z nahradzovania poškodených a nesprávne zložených proteínov (Leuenberger et al., 2017).

Serpín-Z4 patrí medzi najabundantnejšie proteíny piva, predstavuje 10-25 % všetkých proteínov, ktoré nemožno odstrániť dialýzou. Obsah asparagovej kyseliny priemerného proteínu jačmene bola vypočítaná na 5,5 %, čo naznačuje, že by Serpín-Z4 s obsahom 4,8 % mohol mať vyššiu tepelnú odolnosť. Najviac je známe, že serpín väzbou na serínovej proteázy zmenou terciárnej štruktúry stáva termostabilnejším (Specker et al., 2014). Prevedená cieleňá analýza umožnila sledovanie 14 peptidov Serpínu-Z4 (50,6 % sekvencie) v jednotlivých frakciách s rôznou dĺžkou aplikácie teploty 99 °C. Štatistické vyhodnotenie pomocou t-testu ukázalo signifikantnú zmenu 3 peptidov, ktorých intenzita sa s časom vystavenia teplote 99 °C znižovala. Intenzita 1 peptidu a 1 jeho formy vzniknutej vynechaním štiepneho miesta trypsinom významne narastala, 7 peptidov bolo bez významnej zmeny a zvyšné 2 peptidy nebolo možné vyhodnotiť vo všetkých vzorkách. Celkovo teda nebol pozorovaný žiadny dramatický efekt, iba 8,4 % (sekvencie) Serpínu-Z4 konštatujeme ako pozmenenú vplyvom teplotného stresu. I keď je možné, že v časti sekvencie, ktorá nebola dostupná SRM analýze (bez identifikácie 30,75 %, bez spoľahlivej kvantifikácie 22 %) by bolo možné pozorovať ďalšie zmeny, tiež možné usudzovať, že aplikovaná teplota 99 °C na homogenizované obilky v suchom stave (vlhkosť do 20 %) nevyvolala výraznejšie zmeny.

Faktor, ktorý by mohol ovplyvniť správnu interpretáciu dát je prítomnosť rôznych foriem Serpínu. Specker et al. pozorovali predpokladanú formu Serpínu-Z4 po inhibičnej udalosti, kedy malo dôjsť k odštiepeniu časti reťazca o veľkosti 4,5 kDa (40 aminokyselín). Pozorovali tiež už pred tým opísané proteínové formy o veľkosti 30 a 25 kDa, ktoré sú predpokladanou kratšou variantou Serpínu-Z4, ktorá vzniká

degradačnou udalosťou a jej formou po inhibícii proteázy. Intenzita natívnej formy Serpínu-Z4 sa v ich experimente varom (100 °C) znížila na 39 % (oproti inkubácii pri izbovej teplote) v prospech 30 kDa degradačnej varianty.

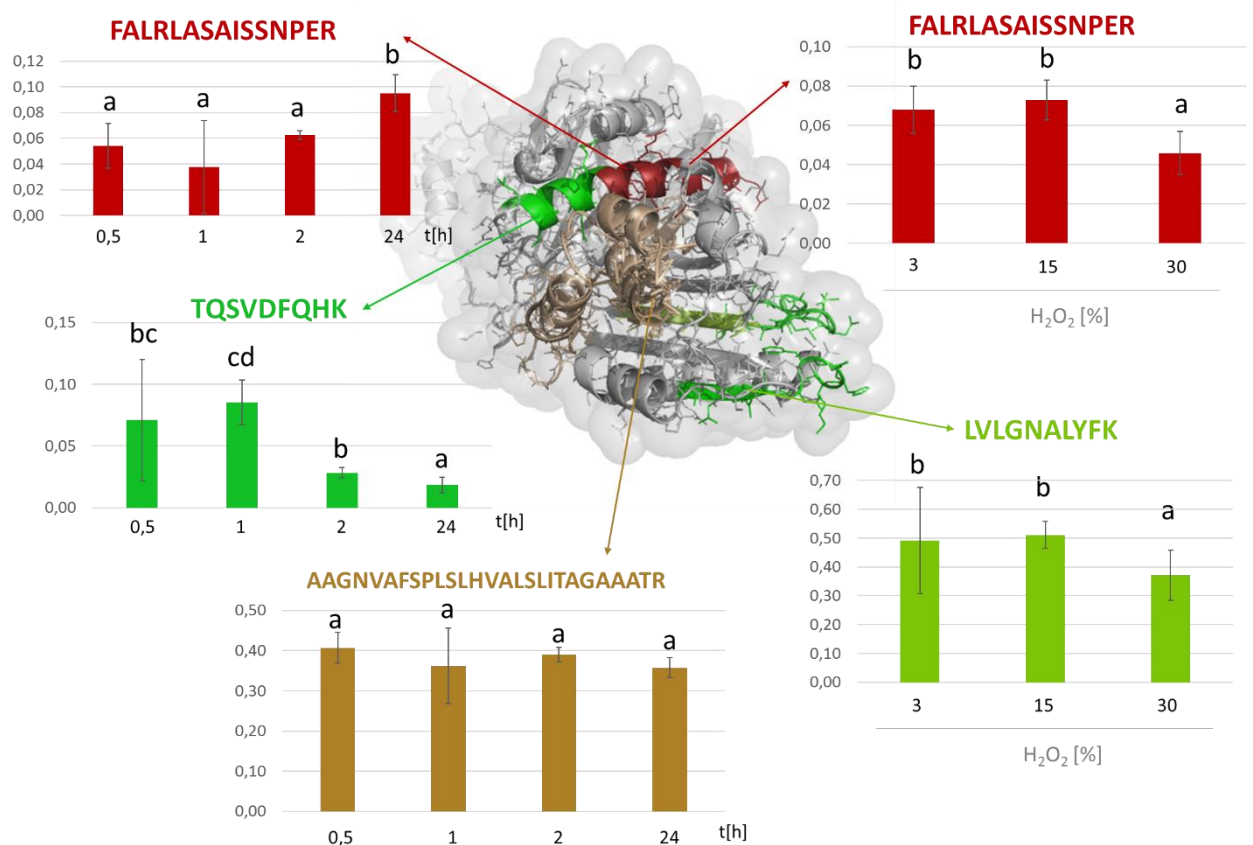
4.4 Sledovanie zmien proteínu (Serpín-Z4) pôsobením oxidačného stresu H₂O₂

Zásobné proteíny slúžia nie len ako zdroj aminokyselín vo fáze vývoja rastliny (semena), kedy je spôsobom výživy heterotrofia. Ale predpokladá sa, že slúžia tiež ako primárny cieľ oxidatívneho poškodenia (Davies, 2005), v priebehu starnutia semena resp. v priebehu procesov klíčenia, ktoré sú v dôsledku intenzívnej respirácie spojené so vznikom ROS, a tým spôsobom bránia poškodeniu vitálnych súčastí buniek. Proteíny sú primárnym cieľom oxidačného poškodenia. Poškodenie spôsobené ROS môže byť vysoko špecifické (lokalizáciou na špecifické miesta cielených molekúl) v prípade ROS s nižšou reaktivitou (ako sú peroxidy). Vo všeobecnosti však rozsah poškodenia závisí na kinetike oxidačnej reakcie, teda koncentrácii reaktantov, vzdialenosti miesta vzniku oxidačného činidla od cieľovej molekuly, výskyt sekundárneho poškodenia v podobe reťazových reakcií a prenosom poškodenia na ďalšie molekuly. Aminokyselinové zvyšky Met sa ukazujú ako dôležité ciele oxidačného poškodenia, zvýšená hladina metionínsulfoxidu bola pozorovaná v množstve *in vivo* patologických štúdií a *in vitro* štúdií zvýšeného oxidačného stresu (Davies, 2005).

Pre navodenie oxidačného stresu bola zvolená koncentračná rada peroxidu. Vzorky boli ošetrené 0-30 % peroxidom a pripravené na proteomickú analýzu. Pred použitím cieľovej analýzy bol overený stav celkového proteómu pomocou LC-MS necielenej analýzy a bol sledovaný efekt na množstvo dobre detekovateľnej modifikácie – oxidácie Met (nakoľko Serpín-Z4 obsahuje len 6 Met, boli posudzované všetky identifikované jačmenné proteíny). Analýza ukázala, že zatiaľ, čo v kontrolných vzorkách bolo identifikovaných 755 peptidov a pouze 6 obsahovalo oxidovaný Met, u vzoriek s 30 % (koncentrovaným) peroxidom z celkových 790 peptidov bolo identifikovaných 185 oxidovaných foriem. H₂O₂ i napriek svojmu zaradeniu medzi menej reaktívne ROS spôsobil 23 % nárast oxidačných udalostí na Met. Cieľená analýza Serpínu-Z4 potom ukázala, že minimálne 3 peptidy sú významne ovplyvnené ošetrením peroxidom.

4.5 Mapovanie peptidov na 3D model Serpínu-Z4

Experimenty s teplotou a peroxidom potvrdili, že je možné využiť metódu SRM-kvantifikácie pre ciele monitorovanie zmien v proteíne. S využitím dostupných bioinformatických nástrojov bola prevedená vizualizácia jednotlivých peptidov na 3D model proteínov. U peptidov zmenených pôsobením stresu bola pozorovaná tendencia výskytu na povrchu proteínu a je možné usudzovať, že Serpín-Z4 v nami vytvorených podmienkach nepodliehal denaturácii a preto boli modifikáciám prístupnejšie povrchové peptidy, čo sa následne prejavilo ako zmena zastúpenia ich nemodifikovaných foriem.



Obr. 14: Model Serpínu-Z4 (The Phyre2; Kelley et al. 2015) a zvýraznenie relatívnej abundancie peptidov. Peptidy, ktoré ubývali (zelená) počas analýzy teplotného stresu (grafy vľavo) a počas analýzy vplyvu peroxidu (vpravo, uvedená koncentrácia H₂O₂). Peptid s vynechaným miestom za Arg, ktorého modifikovaná forma (deamidácia Asn) bola detekovaná v teplotnej analýze, vykazoval opačné tendencie v teplotnej a peroxidovej analýze (červená).

4.6 Sledovanie Serpínu-Z4 vo vzorkách chleba a piva

Svoje uplatnenie nachádza proteomika i v oblasti intenzívneho komplexného štúdia potravín, ktorý je moderne označovaný tiež ako „omika“ – foodomics. Bezpečnosť a kvalita potravín je posudzovaná pomocou MS nie len vzhľadom na prítomnosť kontaminácií, patogénov, či alergénov, ale i detekciou peptidov, ktoré môžu byť zodpovedné za chuť, mať terapeutické účinky, či viesť k overeniu autenticity potraviny (Agrawal et al., 2013). Metodika sledovania Serpínu-Z4 bola uplatnená v analýze vzoriek pripravených z bežne dostupných potravín obsahujúcich jačmenné proteíny, zo pšenično-jačmenného chleba a piva. Cieľená analýza však neposkytla identifikáciu ani jediného peptidu Serpínu-Z4. Za predpokladu, že jednotlivé kroky analýzy boli prevedené správne, sa môžeme opodstatnene domnievať, že deklarovaný obsah jačmeňa 10 % neodpovedá skutočnému stavu. Dôvodom, prečo nebol identifikovaný ani jeden peptid však môže byť tiež intenzívny technologický proces spracovania múky na výsledný produkt – chlieb, ktorý vniesol do skúmaného proteínu modifikácie, ktoré vznikajú napr. Maillardovou reakciou v potravinách s vysokým obsahom proteínov a uhlíkov pri teplotách 50 °C a pH 4-7 vedúcou k zmenám farby (melanoidy), chuti, a nutričnej hodnoty (blokovanie alebo degradácia lyzínu) (Ramirez-Jimenez et al., 2000) a ktoré sme neboli (resp. softvér) schopní predpokladať a preto unikli identifikácii.

Použitou metodikou sme boli schopní s istotou identifikovať prítomnosť Serpínu-Z4 vo vzorkách piva, avšak hmotnostné spektrá ani jedného z 20 identifikovaných peptidov svojou nízkou intenzitou neumožňujú spoľahlivú kvantifikáciu. Dobre zdokumentovaná abundancia Serpínu-Z4 v pive je však závislá od producenta piva a môže byť aj významne nižšia (Tanner et al., 2013), zvlášť ak bola použitá odroda s intenzívnejším šľachtením na znížený obsah proteínov, čo je v sladovníckych odrodách do istej miery žiadúce.

5 ZÁVER:

Necielené posttranslačné modifikácie, ktorým proteíny podliehajú, majú svoj veľký význam v dopade na funkciu, životnosť a starnutie proteínu. V tejto bakalárskej práci bola navrhnutá a optimalizovaná metodika cieľenej analýzy pre sledovanie zastúpenia peptidov v jednom z najabundantnejších zásobných proteínov endospermu obilky jačmeňa (Serpín-Z4). Podarilo sa preukázať, že metodika je použiteľná a boli identifikované časti sekvencie, ktorých zastúpenie sa menilo. Podarilo sa tiež ukázať rozdiel medzi pôsobením oxidačného stresu a pôsobením teploty. Zatiaľ nie je príliš známe, kde na proteíne dochádza k stresom indukovaným modifikáciám a aj ich samotné množstvo, ktoré bolo identifikované v minulosti, je vysoké. Pokiaľ však vieme, ktorá časť proteínu je ovplyvnená, môžeme lepšie využiť bioinformatické nástroje a navrhnúť cieľenú analýzu a prítomnosť predikovanej modifikácie overiť. Táto úloha je však nad rámec bakalárskej práce a bude náplňou ďalšej štúdie.

Táto práca vznikla vďaka podpore grantu TE02000177 (TAČR) a podpore MŠMT v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601) a boli spracované na vybavení financovanom z projektu OP VaVpI CZ.1.05/4.1.00/04.0135 a výskumnej kapacity pre biotechnologické odbory a rozšírenie infraštruktúry.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:

AGRAWAL, Ganesh et al., 2013. Biomarker discovery and applications for foods and beverages: Proteomics to nanoproteomics. *Journal of Proteomics* [online]. **93**, 74-92 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.04.014. ISSN 18743919. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391913002030>

BAIK, Byung-Kee a Steven ULLRICH, 2008. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*. **48**(2), 233-242. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2008.02.002>. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008000283>

BRADFORD, Marion, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **72**(1-2), 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999. ISSN 00032697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269776699996>

BROMKE, Mariusz et al., 2015. Liquid chromatography high-resolution mass spectrometry for fatty acid profiling. *The Plant Journal*. **81**(3), 529-536. DOI: 10.1111/tpj.12739. ISSN 09607412. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.12739>

CIORBA, M. A. et al., 1997. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**(18), 9932-9937. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9932. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.94.18.9932>

ČERNÁ, Hana, Alžběta BREINEKOVÁ a Martin ČERNÝ, 2015. Elucidating protein posttranslational modifications using combination of recombinant protein spectral library and in silico designed SRM analysis. In: *MendelNet 2015: Proceedings of International PhD Students Conference*. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 409-411. ISBN 978-80-7509-363-9.

ČERNÝ, Martin et al., 2013. Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *Journal of Proteomics* [online]. **92**, 2-27 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.05.040. ISSN 18743919. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391913003254>

DAHL, S. W., S. K. RASMUSSEN a J. HEJGAARD, 1996. Heterologous Expression of Three Plant Serpins with Distinct Inhibitory Specificities. *Journal of Biological Chemistry*. **271**(41), 25083-25088. DOI: 10.1074/jbc.271.41.25083. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.271.41.25083>

DALLE-DONNE, Isabella et al., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. **329**(1-2), 23-38. DOI: 10.1016/S0009-8981(03)00003-2. ISSN 00098981. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898103000032>

DAVIES, Michael J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1703**(2), 93-109. DOI: 10.1016/j.bbapap.2004.08.007. ISSN 15709639. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963904002183>

DOMON, B., 2006. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*. **312**(5771), 212-217. DOI: 10.1126/science.1124619. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1124619>

EL-ANEED, Anas, Aljandro COHEN a Joseph BANOUB, 2009. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*. **44**(3), 210-230. DOI: 10.1080/05704920902717872. ISSN 0570-4928. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920902717872>

FEDOROVA, Maria, Ravi Chand BOLLINENI a Ralf HOFFMANN, 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*. **33**(2), 79-97. DOI: 10.1002/mas.21381. ISSN 02777037. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mas.21381>

FROST, Dustin a Lingjun LI, 2014. Recent Advances in Mass Spectrometry-Based Glycoproteomics. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. **95**, 71-123. DOI: 10.1016/B978-0-12-800453-1.00003-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128004531000038>

GEIS-ASTEGGIANTE, Lucía et al., 2016. Evaluation of Spectral Counting for Relative Quantitation of Proteoforms in Top-Down Proteomics. *Analytical Chemistry*. **88**(22), 10900–10907. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02151. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.6b02151>

HAO, P. et al., 2011. Detection, Evaluation and Minimization of Nonenzymatic Deamidation in Proteomic Sample Preparation. *Molecular*. **10**(10), 111009381-111009381. DOI: 10.1074/mcp.O111.009381. ISSN 1535-9476. Dostupné z: <http://www.mcponline.org/cgi/doi/10.1074/mcp.O111.009381>

CHAHROUR, Osama, Diego COBICE a John MALONE, 2015. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **113**, 2-20. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.04.013. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708515002460>

CHUNG, H. S. et al., 2013. Cysteine Oxidative Posttranslational Modifications: Emerging Regulation in the Cardiovascular System. *Circulation Research*. **112**(2), 382-392. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268680. ISSN 0009-7330. Dostupné z: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.112.268680>

JAYSHREE RAMKUMAR, Chandramouleeswaran, 2014. Mass Spectrometry: A Boon to Nuclear Industry. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. **6**(1), -. DOI: 10.4172/2155-9872.S6-005. ISSN 21559872. Dostupné z: <http://www.omicsonline.org/open-access/mass-spectrometry-a-boon-to-nuclear-industry-2155-9872.S6-005.php?aid=28664>

KIM, Keug Tae et al., 2015. Discovery of an intermolecular disulfide bond required for the thermostability of a heterodimeric protein from the thermophile *Hydrogenobacter thermophilus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **80**(2), 232-240. DOI: 10.1080/09168451.2015.1079476. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2015.1079476>

LAEMMLI, U., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* [online]. **227**(5259), 680-685 [cit. 2017-04-18]. DOI: 10.1038/227680a0. ISSN 00280836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/227680a0>

LEE, Byung Cheon et al., 2009. Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1790**(11), 1471-1477. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.04.014. ISSN 03044165. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416509000981>

LEUENBERGER, Pascal et al., 2017. Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science*. **355**(6327), 7825-. DOI: 10.1126/science.aai7825. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aai7825>

LEVINE, Rodney L. et al., 1999. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development*. **107**(3), 323-332. DOI: 10.1016/S0047-6374(98)00152-3. ISSN 00476374. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637498001523>

LIDDY, Kiersten, Melanie WHITE a Stuart CORDWELL, 2013. Functional decorations: post-translational modifications and heart disease delineated by targeted proteomics. *Genome Medicine* [online]. **5**(2), - [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1186/gm424. ISSN 1756994x. Dostupné z: <http://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/gm424>

MADIAN, Ashraf a Fred REGNIER, 2010. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. *Journal of Proteome Research*. **9**(8), 3766–3780. DOI: 10.1021/pr1002609. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr1002609>

MARX, Vivien, 2012. Targeted proteomics. *Nature Methods*. **10**(1), 19-22. DOI: 10.1038/nmeth.2285. ISSN 1548-7091. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nmeth.2285>

MAYER, Klaus et al., 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved, **491**(7426), 711-716. DOI: 10.1038/nature11543. ISSN 00280836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nature11543>

MITCHELL WELLS, J. a Scott MCLUCKEY, 2005. Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins. *Methods in enzymology*. (402), 148-185. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)02005-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687905020057>

PRIEGO CAPOTE, Feliciano a Jean-Charles SANCHEZ, 2009. Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycosylated proteins. *Mass Spectrometry Reviews*. **28**(1), 135-146. DOI: 10.1002/mas.20187. ISSN 02777037. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mas.20187>

Proteomics Core Facility: SAMPLE PREPARATION FAQs, 2017. *EMBL: European Molecular Biology Laboratory* [online]. [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: https://www.embl.de/proteomics/proteomics_services/user_guide/faq/

RADI, Rafael, 2013. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects. *Accounts of Chemical Research*. **46**(2), 550-559. DOI: 10.1021/ar300234c. ISSN 0001-4842. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar300234c>

RAMIREZ-JIMENEZ, A., E. GUERRA-HERNÁNDEZ a B. GARCÍA-VILLANOVA, 2000. Browning indicators in bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**(9), 4176-4181.

RINALDUCCI, S., L. MURGIANO a L. ZOLLA, 2008. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany*. **59**(14), 3781-3801. DOI: 10.1093/jxb/ern252. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ern252>

ROBERTS, T. H., 2003. Differential gene expression for suicide-substrate serine proteinase inhibitors (serpins) in vegetative and grain tissues of barley. *Journal of Experimental Botany*. **54**(391), 2251-2263. DOI: 10.1093/jxb/erg248. ISSN 1460-2431. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erg248>

ROBINSON, N. a A. ROBINSON, 2001b. Deamidation of human proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98**(22), 12409-12413. DOI: 10.1073/pnas.221463198. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.221463198>

SHIMIZU, Takahiko, Yasuji MATSUOKA a Takuji SHIRASAWA, 2005. Biological Significance of Isoaspartate and Its Repair System. *Biological*. **28**(9), 1590-1596. DOI: 10.1248/bpb.28.1590. ISSN 0918-6158. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/28.1590?from=CrossRef>

SPECKER, Claudia, Ludwig NIESSEN a Rudi VOGEL, 2014. In vitro studies on the main beer protein Z4 of *Hordeum vulgare* concerning heat stability, protease inhibition and gushing. *Journal of the Institute of Brewing*. **120**(2), 85-92. DOI: 10.1002/jib.118. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.118>

STADTMAN, E. R. a B. S. BERLETT, 1991. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *Journal of Biological Chemistry*. **266**(266), 17201-17211.

TANNER, Gregory et al., 2013. Measuring Hordein (Gluten) in Beer – A Comparison of ELISA and Mass Spectrometry. *PLoS ONE*. **8**(2), 56452-. DOI: 10.1371/journal.pone.0056452. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056452>

UN Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT) [online], 2016. [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

YUAN, Quan, Xiaochun ZHU a Lawrence M. SAYRE, 2007. Chemical Nature of Stochastic Generation of Protein-based Carbonyls: Metal-catalyzed Oxidation versus Modification by Products of Lipid Oxidation. *Chemical Research in Toxicology*. **20**(1), 129-139. DOI: 10.1021/tx600270f. ISSN 0893-228x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx600270f>

ZHU, Wenhong, Jeffrey SMITH a Chun-Ming HUANG, 2010. Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2010**, 1-6. DOI: 10.1155/2010/840518. ISSN 1110-7243. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/840518/>

ZUBAREV, Roman, 2013. The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. *PROTEOMICS*. **13**(5), 723-726. DOI: 10.1002/pmic.201200451. ISSN 16159853. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201200451>

7 ZOZNAM OBRÁZKOV:

- Obr. 1: Komplexita proteómu ako dôsledok početných faktorov, (Harper a Bennett, 2016, upravené). 9
- Obr. 2: Skupina voľného thiolu môže byť modifikovaná malými molekulami, reakciu so sírovodíkom tzv. „S-sulphydration“ za vzniku persulfidovej väzby R-SSH, S-nitrozyláciou, S-glutathionyláciou a sulfenyláciou peroxidom vodíka. Ďalšími reverzibilnými modifikáciami sulfénovej kyseliny sú vznik disulfidovej väzby, S-glutathionylácia a vznik sulfenylamidu. So zvýšenou koncentráciou ROS vznikajú ireverzibilné modifikácie: sulfínová a sulfónová kyselina, (Chung et al., 2013, upravené). 11
- Obr. 3: Metionínsulfoxid, metionínsulfón 12
- Obr. 4: V prvom kroku je tyrozín oxidovaný radikálmi $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{OH}$, alebo $\text{CO}\cdot^{-3}$. Následná nitrácia prebieha prostredníctvom dvoch hlavných dráh. Reakciu s peroxyinitritom $\text{ONOO}\cdot$ ktorý vzniká promptnou reakciou radikálov oxidu dusnatého a superoxidu. Či reakciu s radikálom oxidu dusičitého $\cdot\text{NO}_2$ vzniknutým reakciou peroxidu vodíka a dusitanu v prítomnosti hemoperoxidázy (Corpas et al., 2013, upravené). 13
- Obr. 5: Rôzne podoby karbonylácie aminokyselín v proteínoch, (Dalle-Donne et al., 2003), upravené. 14
- Obr. 6: Vznik Schiffovej bázy – imínu reakciou karbonylovej a aminoskupiny..... 15
- Obr. 7: Schéma vzniku pokročilých produktov glykácie AGE (Busch et al., 2010, upravené). 15
- Obr. 8: Schéma deamidácie Asn cez medziprodukt sukcinimid s prevalentným výsledným produktom – asparágovou kyselinou..... 16
- Obrázok 9: Typy iónov, ktoré môžu vzniknúť fragmentáciou peptidového reťazca. Využívané pri de-novo sekvenovaní peptidov (proteínov). Pretože peptidy sú v pozitívnom móde protonované, vzniknuté fragmenty sú tiež katióny..... 18
- Obr. 10: Schéma princípu hmotnostného spektrometru s trojitým kvadrupólom, upravené podľa Wikimedia Commons 21
- Obr. 11: Zastúpenie (vzájomných pomerov) jednotlivých peptidov by na rozdiel od intenzity, ktorá sa medzi jednotlivými vzorkami môže líšiť, malo zostať zachované. V prípade, že je pozorovaný pomer odlišný, možno usudzovať, že na peptide, ktorého miera zastúpenia sa odlišuje došlo k PTM (Černá et al., 2015)..... 30
- Obr. 12: Náhľad cielenej analýzy dobre detekovateľných peptidov Serpínu-Z4 separované na C18 kolóne Agilent LC pomocou nelineárneho gradientu ACN 2-35 %. 31
- Obr. 13 : Serpín-Z4. (A) Vizualizácia sekvencia a výsledkov z prevedenej SRM analýzy (UniProt, PeptideRank, Protter); (B) Podiel jednotlivých peptidov na celkovej zmeranej intenzite. 32
- Obr. 14: Model Serpínu-Z4 (The Phyre2; Kelley et al. 2015) a zvýraznenie relatívnej abundancie peptidov. Peptidy, ktoré ubývali (zelená) počas analýzy teplotného stresu (grafy vľavo) a počas analýzy vplyvu peroxidu (vpravo, uvedená koncentrácia H_2O_2). Peptid s vynechaným miestom za Arg, ktorého modifikovaná forma (deamidácia Asn)

bola detekovaná v teplotnej analýze, vykazoval opačné tendencie v teplotnej a peroxidovej analýze (červená). 35

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK:

ACN	acetonitril
AGE	konečné produkty pokročilej glykácie
Asn	asparagín
CE	kolízna energia
CID	kolíziou indukovaná disociácia (collision induced dissociation)
Cys	cysteín
EDTA	etyléndiamíntetraoctová kyselina
ESI	elektrosprejová ionizácia
FAO	Organizácia pre výživu a hospodárstvo
FAOSTAT	Štatistická databáza Organizácie pre výživu a hospodárstvo
FTMS/ FT(ICR)MS	analyzátor založený na Fourierovej transformácii iónovej cyklotrónovej rezonancie (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer)
Gln	glutamín
ICAT	Izotopovo kódované afinitné značky (Isotope-Coded Affinity Tag)
iTRAQ	Izobarické značky pre relatívnu a absolútnu kvantifikáciu (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification)
izoAsp	izoaspartát
LC-MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria v spojení s kvapalnou chromatografiou
LPP	produkty oxidácie lipidov hydroxylovým radikálom
MALDI	matricou asistovaná laserová desorpcia/ionizácia
Met	metionín
MRM	monitorovanie viacerých reakcií
MS	hmotnostná spektrometria

MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
PTM	posttranslačná (/ -é) modifikácia (/ -e) proteínu (/ -ov)
PAGE	polyakrylamidová gélová elektroforéza
qTOF	hmotnostný spektrometer typu kvadrupólu v spojení s analyzátorom rýchlosti doletu
RNS	reaktívne formy dusíka
ROS	reaktívne formy kyslíka
SILAC	značenie stabilnými izotopmi aminokyselín v bunečnej kultúre (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture)
DS	dodecylsírán sodný
SRM	monitorovanie vybranej reakcie
TCA	trichlóroctová kyselina
TMT	Tandemové hmotnostné značky (Tandem Mass Tags)
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometán
Tyr	tyrozín