



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ**

**ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## **ČIPOVÁ A KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA PRO VÝZKUM RAKOVINY**

ON-CHIP AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR CANCER RESEARCH

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**TEREZA HÁJKOVÁ**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**prof. Ing. IVO PROVAZNÍK, Ph.D.**

BRNO 2011



VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

**Biomedicínská technika a bioinformatika**

**Studentka:** Tereza Hájková

**ID:** 119703

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2010/2011

## NÁZEV TÉMATU:

**Čipová a kapilární elektroforéza pro výzkum rakoviny**

## POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Seznamte se s problematikou analýzy proteinů moderními biofyzikálními metodami. Práce bude zaměřena na studium proteinů použitelných jako nádorové ukazatele a bude probíhat na pracovišti Mendelovy univerzity. Seznamte se s klasickou kapilární elektroforézou a mikrofluidní čipovou elektroforézou a proveďte základní experiment pro ověření metod.

Navrhněte postup ověření využitelnosti metod elektroforézy pro detekci proteinů a proveďte příslušná měření. Výsledky zpracujte pomocí vybraných postupů, proveďte porovnání a vyhodnocení.

## DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] KRIZKOVA, S.; ADAM, V.; KIZEK, R. Study of metallothionein oxidation by using of chip CE. *Electrophoresis* 2009, 30, 4029-4033.

[2] ECKSCHLAGER, T.; ADAM, V.; HRABETA, J.; FIGOVA, K.; KIZEK, R. Metallothioneins and cancer. *Current Protein and Peptide Science* 2009, 10, 360-375.

**Termín zadání:** 7.2.2011

**Termín odevzdání:** 27.5.2011

**Vedoucí práce:** prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

## UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

# Abstrakt

Práce se zabývá problematikou nádorového onemocnění a jeho vznikem. Karcinom prostaty je druhý nejzávažnější karcinom u mužů, je důležité zaměřit se na včasnou detekci. Tato práce pojednává o proteinech, které jsou nebo by mohly být využity jako potenciální nádorové markery. Například v současnosti běžně používaný prostatický specifický antigen, ale nově i metalothionein. Metalothionein je protein vyskytující se v rostlinné i v živočišné říši ve čtyřech základních isoformách. Existuje předpoklad, že obsah jednotlivých isoforem, případně jejich vzájemný poměr, má určitý diagnostický potenciál, který by mohl být využitelný v praxi. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny a studovány metody pro specifickou a citlivou analýzu jednotlivých isoforem. V této práci je pro separaci isoforem využita kapilární elektroforéza a jsou diskutovány vlivy jednotlivých parametrů (druh základního elektrolytu, jeho pH, velikost separačního napětí a tak dále) na výslednou separaci.

## Klíčová slova

Nádorová onemocnění, karcinom prostaty, prostatický specifický antigen, metalothionein, isoformy metalothioneninu, kapilární elektroforéza, čipová elektroforéza.

## **Abstract**

The thesis deals with cancer disease and its genesis. The prostate cancer is the second most dangerous disease in male population. It is very important to detect it in early stage. This thesis deals with the proteins which are or could be used as potential cancer markers. For example in current commonly used the prostate-specific antigen and newly the metallothionein. Metallothionein is a protein occurring in fauna and flora in four basic isoforms. There is a hypothesis that the isoform content or/and their ratio may have a diagnostic implication and could be used in clinical practise. For this reason they are studied and developed methods for specific and sensitive analysis of individual isoforms. In this work, capillary electrophoresis is used for the separation of the isoforms. The influence of the parameters such as type of background electrolyte, its pH and separation voltage etc. on the final separation are discussed.

## **Keywords**

Cancer diseases, prostate cancer, prostate-specific antigen, metallothionein, metallothionein isoforms, capillary electrophoresis, on-chip electrophoresis.

HÁJKOVÁ, T. *Čipová a kapilární elektroforéza pro výzkum rakoviny*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2011. 64 s, 1 příloha. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D..

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Čipová a kapilární elektroforéza pro výzkum rakoviny jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne .....

.....

podpis autorky

## Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Ivo Provazníkovi, Ph.D., konzultantce Mgr. Markétě Ryvolové, Ph.D. a Ing. Heleně Škutkové za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce.

V Brně dne .....

.....

podpis autorky

# Obsah

1 Úvod.....	10
2 Teoretická část .....	11
2.1 Nádorové onemocnění .....	11
2.1.1 Vznik nádorového onemocnění .....	11
2.2 Karcinom prostaty .....	12
2.2.1 Vznik a diagnostika .....	13
2.3 Prostatický specifický antigen .....	13
2.3.1 Vylučování PSA .....	14
2.3.2 Stanovení hladiny PSA .....	14
2.4 Další markery.....	14
2.5 Metalothioneiny.....	16
2.5.1 Struktura MT .....	16
2.5.2 Exprese .....	17
2.5.3 Isoformy.....	18
2.5.4 Metody stanovení MT.....	19
2.6 Kapilární elektroforéza .....	22
2.6.1 Vývoj kapilární elektroforézy.....	22
2.6.2 Základní komponenty .....	23
2.6.3 Způsoby detekce .....	24
2.6.4 Separace isoform metalothioneinu kapilární elektroforézou .....	25
2.7 Čipová elektroforéza.....	27
2.7.1 Typy čipů.....	28
2.7.2 Aplikace.....	28
2.7.3 Separace metalothioneinu na čipu .....	29
3 Cíle práce .....	31
4 Experimentální část.....	32

4.1 Materiály a metody .....	32
5 Výsledky a diskuze .....	33
5.1 Bioinformatické zhodnocení isoform MT .....	33
5.1.1 Fylogenetické stromy.....	33
5.1.2 Zarovnání sekvencí.....	34
5.2 CE analýza standardů MT .....	36
5.2.1 Optimalizace metody .....	36
5.2.2 Vliv koncentrace elektrolytu na migraci isoform .....	38
5.2.3 Kalibrační křivky .....	40
5.2.4 Vliv tepelné denaturace .....	43
5.3 Separace biologických vzorků .....	45
5.3.1 Porovnání s výsledky z Brdičkovy reakce.....	46
5.4 CE s laserem indukovanou fluorescenční detekcí .....	47
5.4.1 Schéma derivatizace .....	47
5.4.2 Studium výtěžku derivatizační reakce .....	48
5.4.3 Vybrané elektroferogramy.....	49
6 Závěr .....	52
Seznam literatury.....	54
Seznam zkratk.....	59
Seznam příloh.....	60
Příloha 1: Optimalizace CE metody - separace standardů .....	61



## Seznam obrázků

Obrázek 1: Terciární struktura metalothioneinu. [15].....	17
Obrázek 2: Expres metalothioneinu. [19].....	18
Obrázek 3: Základní uspořádání kapilární elektroforézy. [26].....	24
Obrázek 4: Elektroferogram ladderu. [Experion Pro260 Analysis Kit, Instruction Manual] .....	30
Obrázek 5: Fylogenetický strom sekvencí pro králičí isoformy MT. [20].....	34
Obrázek 6: Fylogenetický strom sekvencí pro lidské isoformy MT. [51].....	34
Obrázek 7: Lokalizace lidských MT na chromosomu 16. [52].....	34
Obrázek 8: Zarovnání sekvencí králičích isoform MT. [20].....	35
Obrázek 9: Zarovnání sekvencí lidských isoform MT. [51].....	35
Obrázek 10: Schéma derivatizace MT. ....	48

## Seznam grafů

Graf 1: Časový vývoj incidence a mortality u karcinomu prostaty v České republice. [6].	13
Graf 2: Negativně nabitě aminokyseliny v sekvencích králičích isoform. [20] .....	36
Graf 3: Negativně nabitě aminokyseliny v sekvencích lidských isoform. [51].....	36
Graf 4: Analýza standardního roztoku směsi MT ve 300mM borátu (c = 1 mg/ml), pH 9,5, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50 µm, 10 kV.....	38
Graf 5: Analýza standardního roztoku isoformy MT-1 ve 20 mM borátu, c = 1 mg/ml....	39
Graf 6: Analýza standardního roztoku isoformy MT-2 ve 20 mM borátu, c = 1 mg/ml....	39
Graf 7: Analýza standardního roztoku isoformy MT-1 ve 300 mM borátu, c = 1 mg/ml... 40	
Graf 8: Analýza standardního roztoku isoformy MT-2 ve 300 mM borátu, c = 1 mg/ml... 40	
Graf 9: Kalibrační křivka isoformy MT-1.....	41
Graf 10: Kalibrační křivka isoformy MT-2.....	42
Graf 11: Kalibrační křivka směšného roztoku isoform MT-1 a MT-2.....	42
Graf 12: Analýza nedenateurovaného směšného roztoku isoformy MT-1 a MT-2, c = 2,5 mg/ml.....	43
Graf 13: Analýza denatureovaného směšného roztoku isoformy MT-1 a MT-2, c = 2,5 mg/ml.....	44

Graf 14: Analýza nedenanturovaného směsného roztoku isoformy MT-1 a MT-2, $c = 0,078$ mg/ml.....	44
Graf 15: Analýza denaturovaného směsného roztoku isoformy MT-1 a MT-2, $c = 0,078$ mg/ml.....	45
Graf 16: Analýza supernatantu z krevního séra.....	46
Graf 17: Porovnání obsahu metalothioneinu ve vzorku supernatantu z krevního séra. ....	47
Graf 18: Kalibrační křivka derivatizační reakce mezi MT a FITC. ....	49
Graf 19: Analýza roztoku MT-1 ( $c = 1$ mg/ml) + FITC ( $c = 0,1$ mg/ml), před analýzou ředěno 100x 300 mM borátem.....	50
Graf 20: Analýza roztoku MT-2 ( $c = 1$ mg/ml) + FITC ( $c = 0,1$ mg/ml), před analýzou ředěno 100x 300 mM borátem.....	50
Graf 21: Analýza roztoku MT-1 ( $c = 0,01$ mg/ml) + FITC ( $c = 0,1$ mg/ml), před analýzou neředěno.....	51
Graf 22: Analýza roztoku MT-2 ( $c = 0,01$ mg/ml) + FITC ( $c = 0,1$ mg/ml), před analýzou neředěno.....	51

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Markery karcinomu prostaty. [10].....	15
Tabulka 2: Detekční metody. [27].....	24
Tabulka 3: Vhodné separační podmínky. ....	27
Tabulka 4: Souhrn podmínek podle J. H. Beattie. [34].....	37
Tabulka 5: Rozlišení.....	38
Tabulka 6: Optimalizované podmínky. ....	38
Tabulka 7: Hodnoty pro roztoky jednotlivých isoform. ....	41
Tabulka 8: Hodnoty pro směsný roztok isoform MT-1 a MT-2.....	41
Tabulka 9: Porovnání výsledků obsahu metalothioneinu.....	46
Tabulka 10: Hodnoty pro roztok standardní isoformy MT-1.....	48

# 1 Úvod

Rakovina patří k nejzávažnějším onemocněním na světě. V roce 2004 to bylo 7,4 milionů úmrtí, což odpovídá 13% všech úmrtí. [1] V Evropě se úmrtnost a počet nemocných řadí na druhé místo po kardiovaskulárních chorobách. I přesto je úmrtnost na rakovinu 20 - procentní a zahrnuje 3 miliony nových případů ročně, z toho smrtí končí 1,7 milionů ročně. Předpokládá se neustále zvyšující se počet výskytu onemocnění. V roce 2030 se odhaduje 12 milionů úmrtí. [2] Rakovina se vyskytuje v populaci jak vyspělých zemí, tak i rozvojových. K více než 70% všech úmrtí na rakovinu došlo v rozvojových zemích. V pořadí podle počtu globálních úmrtí jsou nejčastějšími typy rakoviny u mužů rakovina plic, žaludku, jater, tlustého střeva, jícnu a prostaty. U žen to jsou rakovina prsu, plic, žaludku, tlustého střeva a děložního čípku. [1]

Velký důraz je kladen na včasnou detekci nádorových onemocnění. Proto jsou neustále rozvíjeny nové technologie a postupy, kterými by se dalo rozvoji onemocnění zabránit. Využívá se však i již existujících postupů. Tato práce je zaměřena na využití analytických metod, konkrétně kapilární a čipové elektroforézy, pro detekci proteinu metalothioneinu. Bylo prokázáno, že zvýšený výskyt metalothioneinu v buňkách souvisí s výskytem nádoru v těle.

V teoretické části práce bude rozebrána problematika samotného onemocnění, to zahrnuje vysvětlení pojmů, vznik nádorového bujení a proliferující buňky. Podrobněji bude popsán karcinom prostaty u mužů. Ve stručnosti budou shrnuty také nejčastěji používané markery jako například prostatický specifický antigen. Bude následovat popis proteinu metalothionein, jeho výskyt, biologické funkce a isoformy. Budou vysvětleny obě elektroforetické metody – kapilární a čipová elektroforéza, jejich princip, vlastnosti a využití.

Praktická část bude zaměřena na ověření metod pro analýzu markerů karcinomu prostaty. Cílem práce je optimalizace metody pro separaci isoform metalothioneinu, určení obsahu metalothioneinu v krevním séru pacientů trpících karcinomem prostaty, identifikace jednotlivých isoform a porovnání s výsledky získanými z Brdičkovy reakce.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Nádorové onemocnění

Maligní (zhoubné) nádory nejsou novým onemocněním, jejich výskyt je datován do doby před několika miliony lety. Byly objeveny změny v kostře dinosaura, u egyptských mumií byly zjištěny nádory močového měchýře a kostí. Název nemoci je odvozen z řeckého slova *karkinos* (= rak), *onkos* (= krab), a z latiny *cancer* (= rak). Termín rakovina je však laický a je nesprávně používán pro označení všech typů zhoubných nádorů, ale označuje jen jednu kategorii, a to karcinomy povrchového nebo žláзовého epitelu.

Zhoubné nádorové onemocnění lze charakterizovat jako chorobný stav. Jedná se o nekoordinovaný růst abnormálních buněk, které se postupně rozšiřují do okolních tkání a postihují vzdálené orgány. Šíření probíhá průnikem buněk do mízního systému a krevního řečiště. [3] Růst nádorových buněk však neprobíhá plně autonomně bez regulačních zásahů organismu. Nádorové buňky zřetelně reagují na změnu krevního zásobení a na sycení krve kyslíkem. Zpomalení či zrychlení růstu je závislé také na úrovni glykémie, na hladině hormonů a cytosinů. Vliv má i případná infekce nebo odolnost tkáně hostitele. [4] Organismus hostitele je ve výsledku ochuzován o energetické a nutriční zásoby. Díky těmto vlastnostem dochází k rychlému růstu nádorových buněk a jejich počet velice brzy převyšuje počet normálních buněk ve tkáni.

Nádorové onemocnění však nemůžeme chápat jako jednu jedinou chorobnou jednotku. Jde o celou skupinu onemocnění s rozdílným klinickým průběhem. Typy nádorů se nejčastěji dělí z biologického hlediska na nádory benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Maligní nádory můžeme dále dělit podle typu tkáně, kde vznikají (epitel, pojivo, krevtovorná a lymfatická tkáň, nervový systém, zárodečné buňky) na karcinomy, sarkomy, lymfomy a germinální nádory. [3]

#### 2.1.1 Vznik nádorového onemocnění

Nádorové onemocnění vzniká ve více stupních a je důsledkem působení několika faktorů, jak vnitřních, tak vnějších. Tento proces nazýváme kancerogeneze, neboli přeměna normální buňky na nádorovou. Na molekulární úrovni se jedná o změnu (mutaci) v deoxyribonukleové kyselině (DNA), která kóduje lidský genom. Mutaci DNA nejčastěji způsobují vnější faktory, které působí na buněčné jádro. Mezi tyto faktory patří ionizující záření, kancerogeny (látky podporující vznik nádorového bujení) a některé viry.

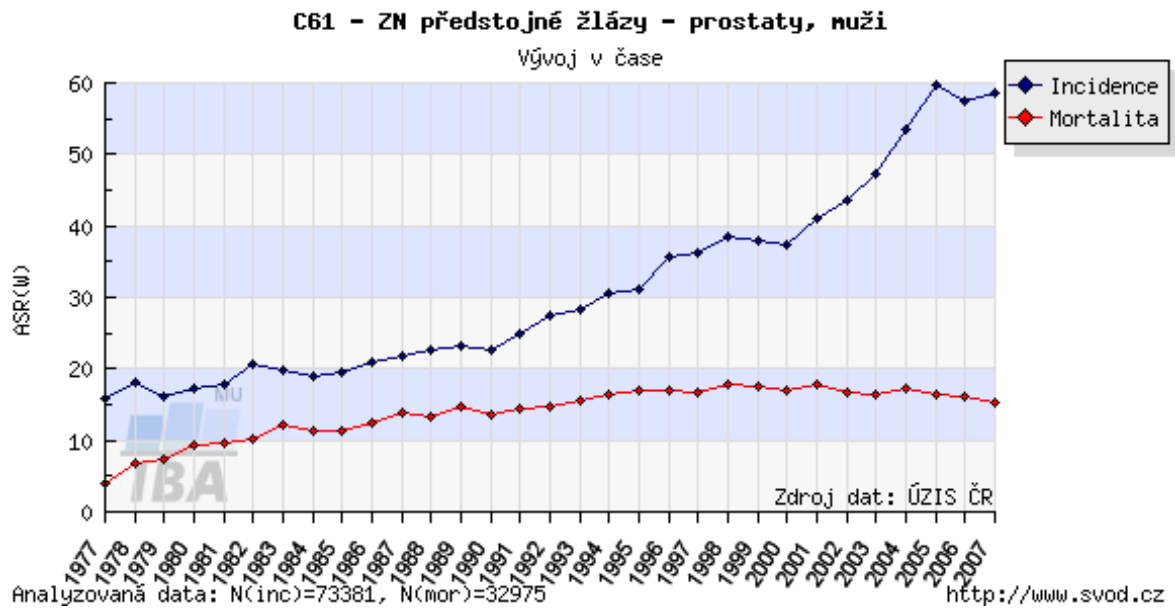
U dědičných nádorů se pomocí germinálních buněk přenáší mutace z generace na generaci. Mutace také mohou vzniknout samovolně při replikaci DNA v průběhu buněčného cyklu. Během života dochází k neustálému dělení buněk, kdy z mateřských buněk vznikají dceřiné. V organismu je nutné udržovat rovnováhu mezi vznikem a zánikem buněk, tuto funkci zastávají buňky regulující apoptózu (programová buněčná smrt).

Vznik a vývoj nádorového onemocnění zahrnuje tři fáze: iniciaci, promoci a progresi. Ve fázi iniciace jsou buňky vystaveny působení různých kancerogenních faktorů a dochází k první genetické změně, která dává podklad vzniku nádorové transformace. Během promoce se prohlubují změny v již kancerogenně iniciovaných buňkách, tím dochází ke změnám genetické informace, které vedou k nezvratnému rozvoji nádorového onemocnění. Fáze progresu je výsledkem genetické nestability, nekontrolovatelného růstu transformovaných buněk a plného rozvoje nádorového onemocnění. [3]

## **2.2 Karcinom prostaty**

Adenokarcinom prostaty je běžný nádor u mužů. Buňky prostaty jsou cílem mnoha hormonálních a chemických látek, které řídí proliferaci žlázy a biologické chování. Tento vliv vyplývá jak z orgánů nacházejících se blízko prostaty (varlata, kůra nadledvin), tak ze vzdálených orgánů (hypofýza a hypotalamus). [5]

V České republice patří karcinom prostaty k nejzávažnějším onemocněním u mužů. Jeho výskyt se neustále zvyšuje, incidenci a mortalitu ukazuje graf 1. V roce 2007 byla incidence téměř 60% a mortalita 15%. [6] Za zvyšující se počet úmrtí může především pozdní odhalení nemoci, většinou již v pokročilém stádiu, protože vývoj karcinomu prostaty může být asymptotický. Výskyt karcinomu prostaty je ovlivněn několika faktory. V dnešní době jsou patrné jisté genetické předpoklady, vlivy vnějšího prostředí, ale i obezita a promiskuita mají určitý podíl na vzniku a rozvoji onemocnění. [7]



Graf 1: Časový vývoj incidence a mortality u karcinomu prostaty v České republice. [6]

### 2.2.1 Vznik a diagnostika

Ve většině případů vzniká karcinom prostaty v periferní žláze v zadním laloku. Přes pouzdro se šíří do dalších částí prostaty, prorůstá do semenných váčků a na spodinu močového měchýře. V některých případech může dojít až k proniknutí do rekta a pánevního dna. Karcinom má schopnost šířit se také lymfatickou a hematogenní cestou. Metastázy směřují do kostí, nejčastěji žeber a pánve. Nemocný může mít také metastázy v orgánech (plíce, játra, ledviny, nadledviny).

Při podezření na karcinom prostaty se provádí mnoho vyšetření, počínaje vyšetřením *per rectum* (přes konečník), konče transrektální biopsií. V rámci laboratorního vyšetření se stanovuje hladina prostatického specifického antigenu (PSA). Normální hodnoty mírně kolísají v závislosti na věku nemocného a koncentrace PSA je ovlivněna velikostí (objemem) prostaty. [7]

## 2.3 Prostatický specifický antigen

Prostatický specifický antigen (PSA) je glykoprotein s hmotností 33 kDa a patří do skupiny lidských kalikreinů. Je tvořen 237 aminokyselinami a má jedno známé glykosylované místo, které se nachází na asparaginovém zbytku (N45). PSA má třídimenzionální strukturu, kterou zajišťuje pět disulfidických můstků. [9]

### **2.3.1 Vylučování PSA**

Tvorba PSA je závislá na vylučování androgenů a nachází se v prostatické tkáni, přičemž v lumen má nejvyšší koncentraci. Nízké koncentrace PSA však můžeme nalézt i v dalších orgánech, například v ledvinách nebo endometriu. PSA se vylučuje přes epitel, epiteliální výstelky a kanály. Děj probíhá ve spermiích a funkce spočívá ve zkapalnění ejakulátu. Za účelem vstoupit do krevního oběhu se musí PSA pohybovat přes bazální membránu prostaty, stroma, kapilární bazální membrány a kapilární epiteliální buňky. V krevním séru se pak nachází dvě formy PSA, volná a vázaná na 1-antichymotripsin nebo 2-makroglobulin. [10]

### **2.3.2 Stanovení hladiny PSA**

Testování hladiny PSA spočívá ve stanovení celkového množství PSA v krevním séru nebo také stanovení poměru volného a vázaného PSA. Za všeobecně uznávanou normální koncentraci je považováno 4 ng/ml. Při zjištění vyšší hodnoty je pacient doporučen k bioptickému vyšetření. [10]

Rozmezí od 4-10 ng/ml se nazývá šedá zóna, je charakteristické falešně pozitivními nebo negativními výsledky. U mnoha mužů, kteří měli hladinu PSA v tomto rozmezí a kteří podstoupili biopsii, nebyl karcinom prostaty objeven. [11] Také bylo zjištěno několik případů, kdy hladina PSA byla menší než 2 ng/ml a přesto pacient trpěl karcinomem prostaty. Hladina PSA může být ovlivněna několika dalšími onemocněními, například akutní retencí nebo prostatitidou. Koncentrace PSA je také závislá na věku, čím starší muž, tím vyšší hodnoty. Jedním z dalších parametrů spojovaných s hladinou PSA je body mass index (BMI), obezita snižuje koncentraci PSA v krevním séru. [10]

## **2.4 Další markery**

Na základě výše zmíněných znalostí je jasné, že nebude stačit pouze jedna hraniční hodnota koncentrace PSA. Dále je vidět jistá nespolehlivost tohoto vyšetření, proto jsou neustále zkoumány nové látky, které bychom mohli použít jako markery karcinomu prostaty. Nyní je známo 91 markerů, které souvisí s karcinomem prostaty a nacházejí se v lidských tělních tekutinách. Tento seznam zveřejnil v roce 2004 Tricoli a kolektiv. [12] Tabulka 1 zobrazuje některé markery, které jsou spjaty s karcinomem prostaty.

Z důvodu nespolehlivosti PSA je poslední dobou mnoho pozornosti soustředěno na thiolové proteiny, konkrétně metalothionein. Zvýšená hladina thiolových proteinů je

důsledek nádorového onemocnění a je spjata s metabolismem zinku (ionty  $Zn^{2+}$ ). Nádorové buňky se vyznačují ne příliš jasnými mechanizmy, které slouží k zachování úrovně  $Zn^{2+}$ . A právě prostatická tkáň je bohatá na zinečnaté ionty, jejich množství je zde až desetkrát vyšší v porovnání s ostatními tkáněmi. [13]

Stanovení hladiny metalothioneinu by se mohlo využívat jako doplňkový marker karcinomu prostaty. Byla by zajištěna vyšší spolehlivost diagnózy bez nutnosti invazivní biopsie.

<b>Marker</b>		<b>Typ markeru</b>
A2M	alfa(2)-makroglobulin	Diagnostický
Akt-1	gen pro kinázy serin/threonin	Prognostický
AMACR	alfa-methylacyl-koenzym-A	Diagnostický a prognostický
DD3/PCA3	prostatický nádorový gen 3	Diagnostický
EPCA	brzký prostatický nádorový antigen	Diagnostický
GRN-A	granin-A	Mohl by být diagnostický a prognostický
GSTP-1	enzym pro glutathion S-transferázu	Diagnostický
HSP27	protein tepelného šoku	Náhradní biomarker
Ki67	proliferační antigen	Prognostický
KLK2	lidský kalikrein 2	Prognostický
p53	nádorový supresorový gen	Prognostický pro výsledek po radikální prostatektomii
PAP	prostatické kyselé fosfatázy	Diagnostický
PIM-1	gen pro kinázy serin/threonin	Diagnostický a prognostický
PSA	prostatický specifický antigen	Diagnostický a prognostický
PSCA	antigen prostatických kmenových buněk	Progresivní biomarker
PSGR	prostatický specifický G-protein	Diagnostický biomarker
PSMA	prostatický specifický membránový antigen	Diagnostický biomarker
PSP94	prostatický sekreční protein	Progresivní biomarker
PTGS2	prostaglandin H syntáza 2	Diagnostický a prognostický
TMPRSS2	gen pro serin 2, transmembrální proteáza regulovaná androgenem	Diagnostický biomarker
Trp-p8	přechodný potenciální receptor p8	Diagnostický biomarker pro vysoký stupeň karcinomu prostaty

Tabulka 1: Markery karcinomu prostaty. [10]



## 2.5 Metalothioneiny

V roce 1957 byly poprvé objeveny metalothioneiny (MT). Margoshes a Vallee je izolovali z koňských ledvin. [14] S velkou mírou homologie se vyskytují jak v živočišné, tak i v rostlinné říši. Metalothioneiny byly popsány v bakteriích, houbách a rostlinách. [13]

Jedná se o nízkomolekulární proteiny (6-7 kDa), jsou bohaté na cysteiny, tvoří téměř 30% celkové hmotnosti metalothioneinu, a neobsahují aromatické aminokyseliny. Metalothioneiny jsou termostabilní, nedochází k denaturaci molekuly při změnách teploty. [15]

Hlavní funkcí metalothioneinů je schopnost vázat kovy a následně je transportovat k buňkám, dále udržování oxidačně-redukčních podmínek v organismu a regulace vlastní exprese. Uplatňují se mimo jiné i v ochraně nukleových kyselin a fosfolipidových membrán. Nejčastěji se nacházejí v intracelulárním prostoru, jako jsou cytoplazma, lysosomy, mitochondrie a jádro buňky. Vysoká míra syntézy byla zjištěna v rychle proliferujících buňkách, ale jistou roli hraje i stádium buněčného cyklu. Největší cytoplazmatická koncentrace se vyskytuje v pozdní G1 a G1/S fázi. [13, 15]

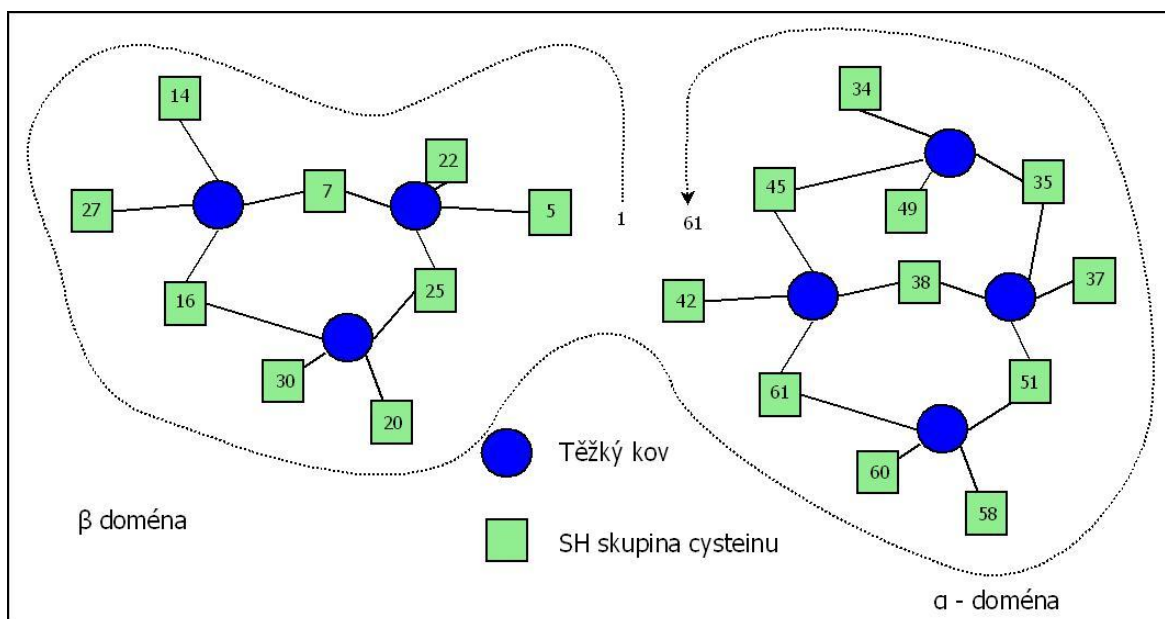
Koncentrace metalothioneinu je parametrem pro lokalizaci nádoru, stádium onemocnění a prognostické vyhlídky. U některých nádorů je zvýšená koncentrace známkou horší prognózy nebo pokročilejšího stádia nemoci. [15]

### 2.5.1 Struktura MT

Savčí metalothioneiny jsou skupina jedno-řetězcových polypeptidů, nejčastěji obsahují 61 aminokyselin. Zhruba třetinu tvoří cysteiny, které se v řetězci nacházejí v určitém seskupení, a to Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys a Cys-X-Cys-Cys. X reprezentuje aminokyselinový zbytek bazických aminokyselin a serinu. Cysteinu náleží 20 poloh ve struktuře. Díky sulfhydrylovým skupinám se na metalothionein mohou vázat ionty kovů a tvořit cysteinyl-thiolátové klastry s charakteristickým prostorovým uspořádáním, nejčastěji tetraedrickým. [16]

Metalothionein má největší afinitu k iontům mědi ( $\text{Cu}^+$ ), kadmia ( $\text{Cd}^{2+}$ ) a zinku ( $\text{Zn}^{2+}$ ), ale není schopen navázat ionty  $\text{Cu}^{2+}$ . Metalothionein je schopen celkově vázat 18 známých iontů, ale k uvolnění  $\text{Zn}^{2+}$  dochází pouze při navázání iontů  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Bi}^{2+}$ . Celkově může metalothionein vázat 7 divalentních (dvojmocných) nebo 12 monovalentních (jednomocných) iontů. Terciární strukturu tvoří dvě domény,  $\alpha$  a  $\beta$ ,

přičemž  $\alpha$ -doména je stabilnější, protože má 4 vazebná místa, zatímco  $\beta$ -doména má pouze 3. [17]



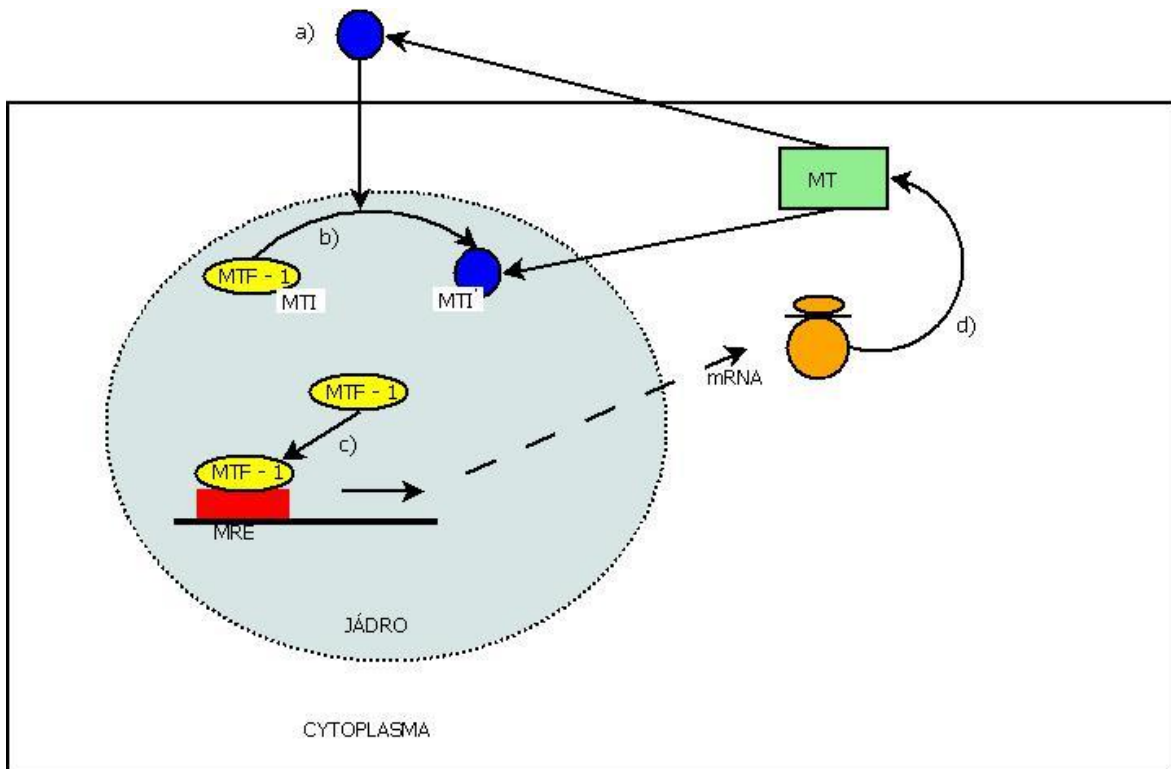
Obrázek 1: Terciární struktura metalothioneinu. [15]

## 2.5.2 Exprese

Geny pro metalothionein jsou seskupeny blízko sebe a lokalizovány na chromozomu 16q12-22 u lidí a na chromozomu 8 u myši. [13] Exprese je řízena pomocí regulačního úseku DNA, který se nazývá MRE (metal responsive element). Teprve po navázání transkripčního faktoru na sekvenci MRE může být exprese zahájena. Zatím nejlépe zmapovanou cestou je transkripční faktor MTF-1 (metal-regulatory transcription factor-1). MTF-1 se v buňce nachází v inaktivovaném stavu a je vázán na inhibitor MTI. Ion kovu se po vstupu do intracelulárního prostoru naváže na inhibitor, tím uvolní MTF-1 a aktivuje ho. Aktivovaný MTF-1 se naváže na MRE, tento komplex může zahájit transkripci metalothioneinu.

Známe několik iontů, které jsou schopny zahájit transkripci metalothioneinu přes MRE, jsou to například Zn, Cd, Cu, Hg, Au a Bi. Zinek však jako jediný dokáže aktivovat MTF-1. MRE je dále schopno reagovat s několika dalšími proteiny a tím regulovat expresi metalothioneinů. [15]

Obrázek 2 graficky zobrazuje výše popsanou expresi metalothioneinů.



Obrázek 2: Expres metalothioneinu. a) Ion těžkého kovu vstupuje do buňky přes cytoplazmatickou membránu, transport zajišťují iontové kanály nebo speciální přenašeče. b) Po vstupu do intracelulárního prostoru reaguje iont s faktorem MTF-1 a inhibítor MTI, na který se naváže. c) MTF-1 se uvolní a může se navázat na regulační sekvenci DNA zvanou MRE. d) Gen zodpovědný za syntézu MT je transkribován. mRNA je přeložena do MT. [19]

### 2.5.3 Isoformy

U savců byly objeveny čtyři hlavní isoformy (MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4). Kromě těchto známých forem bylo u lidí popsáno nejméně třináct dalších proteinů, které úzce souvisí s metalothioneiny. Geny metalothioneinů jsou těsně propojeny a skládají se minimálně z jedenácti MT-1 genů (MT-1A, -B, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K, -L a -X), které kódují RNA, a jednoho genu pro každou z ostatních isoform (MT-2A gen, MT-3 gen, MT-4 gen).

Po chemické stránce si jsou jednotlivé isoformy velmi podobné, biologické funkce a výskyt mají však odlišný. MT-1 a MT-2 se vyskytují téměř ve všech tkáních, nejčastěji v játrech, slinivce břišní, střevech a ledvinách a zajišťují ochranu proti kovové toxicitě. MT-3 se nachází v mozkové tkáni, ve svalech a reprodukčních orgánech a hraje roli v homeostáze zinku v neuronech. MT-4 je prozatím nejméně prozkoumána, ale je známo, že se nachází v epiteliálních buňkách. [13]

Existuje i forma bez navázaného iontu kovu, apo-MT, a vyskytuje se v buňkách, které trpí nedostatkem zinku. Apo-MT byl také objeven v nádorových buňkách a díky své

vysoké afinitě je schopen odebrat zinek ze zinkových prstů (Sp-1) a transkripčních faktorů. Tento mechanismus jako jeden z mnoha přispívá k proliferaci nádorových buněk. [18]

#### 2.5.4 Metody stanovení MT

Identifikace, kvantifikace a strukturní charakterizace MT představují důležitý příspěvek k objasnění specifických rolí těchto metaloproteinů v organismu. V poslední době je mnoho studií zaměřeno na identifikaci jednotlivých isoform ve vzorcích, jejich strukturu a reakce. Zkoumají se možné role ve vztahu k vnějším faktorům, jako je výskyt těžkých kovů. Taktéž se sleduje individuální chování  $\alpha$  a  $\beta$  domény. Z těchto důvodů jsou neustále zlepšovány metodiky pro kvantifikaci metalothioneinů. [28] Metody pro stanovení MT můžeme rozdělit na několik skupin: metody nepřímé a přímé, imunologické, elektrochemické a separační.

Jelikož samotný metalothionein neobsahuje ve své molekule jedinou aromatickou aminokyselinu, jsou nepřímé metody založené na měření množství iontu kovu, který je navázán na molekulu metalothioneinu. Množství navázaného kovu je úměrné koncentraci MT v analyzovaném vzorku za předpokladu celkového nasycení molekuly ionty kovu. MT má různou afinitu k různým iontům kovů, největší má ovšem ke kadmium (Cd), které v molekule MT nahradí zinek. Ve většině chromatografických metod je proto používáno kadmium, například Cd-Chelex test. [28, 29] Již v roce 1987 Engel a Roesijadi využili různou afinitu k iontům Cd a Hg pro detekci metalothioneinu. [30]

Na počátku devadesátých let byla nejčastěji používána nízkotlaká chromatografie, kdy docházelo k dělení podle velikosti, a anion-výměnná chromatografie. V poslední době se ve většině případů používá atomová absorpční spektrometrie (AAS), indukovaná plazmatická atomová emisní spektrometrie (ICP-AES) samostatně nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií (ICP-MS). AAS bývá také kombinována s grafitovou kyvetou (GPC-AAS). Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s AAS (HPLC-AAS) bylo poprvé použito Suzukim již v roce 1980. [21, 28, 29, 30]

Nepřímé metody kvantifikace MT nabízí výhodu vysoké citlivosti, kterou disponují detekční systémy. Nicméně celková saturace molekuly ionty kovů může představovat problém, což by mohlo vést ke změnám koncentrace metalothioneinu. Nepřímé metody jsou vhodné pro analýzu obsahu MT v různých tkáních, ale ne v biologických tekutinách, kde jsou koncentrace MT nízké. [28]

Metody založené na analýze sulfhydrylových zbytků v molekule metalothioneinu patří taktéž k nepřímým metodám. Během této analýzy je snaha pomocí

ethanol/chloroformových frakcionací izolovat částečně čisté frakce metalothionenu ze vzorku. Využívá se chemické modifikace Ellmanovým činidlem (DTNB-5, poprvé použil Ellman v roce 1958), která umožňuje detekovat MT pomocí absorpce UV záření nebo fluorescence. Stanovení MT založené na detekci SH skupiny umožňuje více selektivní vyhodnocení díky vysokému obsahu cysteinu v molekule MT. Ethanol/chloroformová frakcionace dokáže odstranit rozpustné thioly s nízkou molekulární hmotností, které reagují s DTNB, ale na druhé straně umožňuje částečné čištění koncentrace MT, která je v reálných vzorcích nízká. Praktickým problémem při použití této metody je volba standardu a může docházet k různým výsledkům koncentrace. [30]

Čtvrtou skupinu tvoří metody imunologické, využívají přítomnost protilátek a tvorbu komplexu antigen-protilátka. Do této skupiny se řadí radioimunoanalýza (RIA), průtoková cytometrie (FC) a enzyme-linked immunosorbent assai (ELISA).

Průtoková cytometrie byla použita pro měření relativní buněčné úrovně MT v lidských lymfocytech z periferní krve léčených ex vivo s kadmíem. Jako primární protilátka byla použita MT specifická monoklonální protilátka a jako konjugát fluorescenční isothiokyanát (FITC).

Dále došlo ke zlepšení techniky ELISA při stanovení MT v plazmě a moči. V důsledku polymerace, která je vyvolaná oxidací, docházelo k nepřesnostem při měření. Aby se tomu zabránilo, je do vzorku před analýzou přidán merkaptoethanol. Výhodou této metody je, že se zkrátí čas celkové analýzy, v některých případech až na třetinu času původního. Kompetitivní ELISA (cELISA) je nadstavbou klasické ELISY a také byla aplikována na kvantifikaci MT v lidském séru a tkáních. Byly použity polyklonální protilátky a křenová peroxidáza jako konjugát.

Obecně platí, že imunologické metody jsou velmi citlivé a schopné měřit MT v tělních tekutinách, jako jsou moč a krevní sérum, které, jak již bylo řečeno, obsahují nízké hladiny MT. Ke snížení detekční účinnosti by mohly vést imunogenita MT, riziko polymerace a možná ztráta navázaných iontů kovu. [28]

Další skupina metod je založena na analýze mRNA. Geny pro MT jsou si velmi podobné a jsou seskupeny blízko sebe na chromozomu 16. [13] Je důležité studovat expresi každého jednotlivého genu a k tomu nejlépe slouží metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). [22] Tato technika má nahradit například metodu Northern blotting, během které se přímo manipuluje s mRNA, a ta je velmi nestabilní. Při PCR slouží mRNA jako výchozí bod a je okamžitě převedena do cDNA, což minimalizuje manipulaci s mRNA během analýzy.

Pro analýzu MT je možné použít i reverzní transkripci, vznikla tak technika polymerázové řetězové reakce s reverzní transkriptázou (RT-PCR). Je důležité volit speciální primery a vhodně nastavovat podmínky pro danou analýzu. Hodnocení je možné provádět buď semi-kvantitativně, nebo přímou kvantifikací. Pomocí přímé kvantifikace je dosaženo lepších výsledků díky kontrole účinnosti reakce RT. Přímá kvantifikace je řešena dvěma způsoby, výpočet scintilace radioaktivních pásem pomocí radioaktivního značení nebo denzitometrická analýza signálu. [28]

Hojně využívané jsou i elektrochemické metody. Mezi ně patří například Brdičkova reakce, která je založena na vzniku signálu katalytického vodíku v přítomnosti kobaltu a sulfhydrylové skupiny, a používá se pro stanovení celkového obsahu MT. Během analýzy je nutná polarografická reakce, která probíhá bez ohledu na typ navázaného iontu kovu. Brdičkova reakce vznikla přibližně před 70 lety a od té doby došlo k poměrně hodně modifikacím této metody různými autory. [23, 28]

Jednou z modifikací je spojení s diferenční pulsní voltametrií nebo chronopotenciometrií za účelem zvýšení citlivosti. SH skupiny mají vysokou molekulovou hmotnost, proto je důležité tyto skupiny z molekuly odstranit. Pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV) byl stanoven obsah kadmia v izolovaných MT. [28] Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza je metoda, která hodnotí pík H, který je také založen na vzniku signálu katalytického vodíku. Výsledkem je křivka elektrodového potenciálu závislá na čase. [24]

Ostatní elektrochemické metody byly použity pouze na čisté komerčně vyráběné vzorky MT. Katodická rozpouštěcí voltametrie v režimu diferenční pulsní voltametrie byla použita pro kvantifikaci iontů Cd a Zn v metalothioneinu. Měď byla použita k posunutí kovů vázaných k MT, měď tvoří povrchově vysoce aktivní měďnatý komplex na cysteinových částech MT. Byly také navrženy senzory pro detekci nízkých koncentrací metalothioneinu. Snímače jsou z čištěného MT, který je navázán na pracovní elektrody tvořené zlatem.

Elektrochemické metody jsou vysoce citlivé na celkové stanovení koncentrace MT. Nicméně je nutné zvýšení čistoty vzorku z důvodu obsahu řady elektroaktivních sloučenin v molekule MT, které by mohly zasahovat do průběhu analýzy. [28]

Poslední skupina zahrnuje metody separační, kdy dochází k rozdělení jednotlivých isoform metalothioneinu. Mezi nejpoužívanější patří permeační chromatografie na gelu (nejčastěji Sephadex G-75). Při separaci vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

(HPLC) ve spojení s hmotností spektrometrií byly jednotlivé isoformy identifikovány již v roce 1998. [25]

V poslední době patří mezi nejvíce diskutované metody kapilární elektroforéza (CE) a její zmenšená verze, mikrofluidní čipová elektroforéza (MCE). CE se stala nejprogresivnější analytickou metodou. Především je to dáno vhodnými vlastnostmi metody, jsou to například vysoká separační účinnost, rychlost a jednoduchost provedení. Další výhodou je nízká spotřeba vzorku a chemikálií. Kapilární elektroforéza se vyskytuje v mnoha modifikacích. [16] Jsou to například kapilární zónová elektroforéza (CZE), gelová kapilární elektroforéza, izoelektrická fokusace a další.

## **2.6 Kapilární elektroforéza**

Elektroforéza je definována jako rozdíl pohybu nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. Elektroforéza jako separační metoda byla poprvé představena Tiseliiem roku 1937. Umístěním směsi proteinů do zkumavky se základním elektrolytem (background electrolyte, BGE) a použitím elektrického pole zjistil, že jednotlivé komponenty vzorku migrují určitou rychlostí, která je dána jejich nábojem a mobilitou. Za práci v oblasti vědy získal Tiselius Nobelovu cenu.

Účinnost separace ve volném roztoku, jak ji představil Tiselius, byla omezena tepelnou difuzí a konvekcí (šířením tepla). Z tohoto důvodu byla tradiční elektroforéza převedena na nekonvekční média, jako jsou například polyakrylamidový nebo agarozový gel. Gely na desce nebo ve formátu trubice byly použity především pro separaci biologických makromolekul (nukleové kyseliny a proteiny). Toto uspořádání má však mnoho nevýhod, jako jsou například příliš dlouhá separace, nízká účinnost nebo obtížnost detekce. Alternativou je separace v úzkých otevřených trubicích nebo kapilárách. Úzké kapiláry mají nízkou vodivost, vytvářejí jen malé množství tepla a v principu jsou nekonvekční. [26]

### **2.6.1 Vývoj kapilární elektroforézy**

Elektroforézu v otevřených trubicích poprvé popsal Hjertén v roce 1967. V té době byly k dispozici pouze milimetrové kapiláry, proto je Hjertén začal otáčet podélně kolem jejich osy, aby minimalizoval účinky konvekce. Později Virtanen a pak také Mikkers a Lukacs provedli elektroforézu v kapilárách o vnitřním průměru (id) 200  $\mu\text{m}$ , které byly vyrobeny ze skla a teflonu. Na počátku 80. let 19. století vylepšili tuto techniku Jorgenson

a Lukacs použitím 75  $\mu\text{m}$  širokých kapilár z křemenného skla. Jorgenson také objasnil teorii, popsal vztahy mezi provozními parametry a kvalitou separace a ukázal potenciál kapilární elektroforézy (CE) jako analytické metody.

V posledních desetiletích se kapilární elektroforéza vyvinula natolik, že své zastoupení má nejen v laboratořích, ale i při mnoha praktických aplikacích v nejrůznějších oblastech. Využívá se například ve farmaceutických, forenzních, klinických, potravinářských, chemických a biochemických analýzách. Trendem je propojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (CE-MS), ale také její miniaturizace (mikrofluidní elektroforéza na čípech). Modernizace CE je však závislá na současných, ale i budoucích pokrocích v analytických metodách a instrumentaci.

V dnešní době je stále nejčastěji používaná CE v kapilárním formátu, typický vnitřní průměr kapiláry se pohybuje v rozmezí 25-150  $\mu\text{m}$  a obvykle jsou plněny jen elektrolytem. Kapilára s malým vnitřním průměrem má mnoho výhod, například v ohledu na dobrý odvod Jouleova tepla, díky velkému poměru povrchu a objemu, nebo při vysoké separační účinnosti. [26]

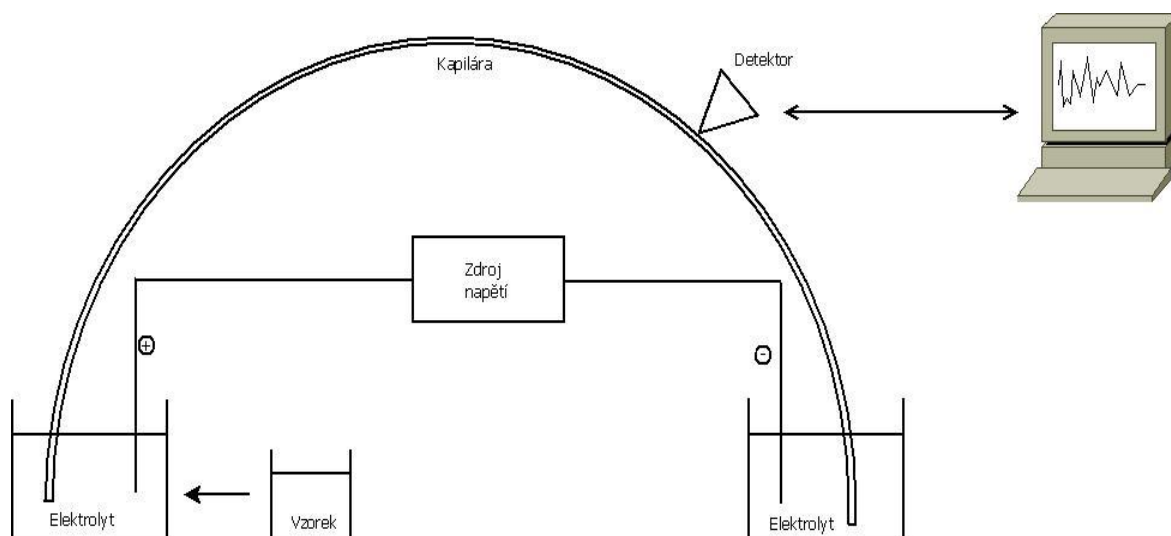
## **2.6.2 Základní komponenty**

Kapilární elektroforéza se skládá z přístroje, který tvoří kazeta s kapilárou, nádobky se základním elektrolytem a vzorky, zdroj napětí, elektrody a detektor. Přístroj je napojen na počítač, pomocí kterého bývá ovládán.

Konce kapiláry jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem, stejný elektrolyt vyplňuje i kapiláru. V nádobkách jsou také umístěny elektrody, které zajišťují elektrický kontakt mezi zdrojem vysokého napětí a kapilárou. Toto uspořádání je na obrázku 3.

Vzorek je do kapiláry nastříknut tak, že je nádobka s elektrolytem nahrazena na přesně definovaný čas nádobkou se vzorkem a je aplikován tlak, který nastříkne do kapiláry krátkou zónu vzorku. Následně je konec kapiláry opět ponořen do nádobky s elektrolytem a je aplikováno vysoké napětí. Detekce probíhá na druhém konci kapiláry přímo přes její stěnu. [26]





Obrázek 3: Základní uspořádání kapilární elektroforézy. [26]

### 2.6.3 Způsoby detekce

V důsledku malých rozměrů kapiláry je kladen důraz na použití vhodné detekční techniky. Ačkoli je možné vyžadovat pouze malé množství vzorku, často je potřeba, aby byl poměrně hodně koncentrovaný. Při řešení tohoto problému byly používány různé způsoby detekce. V dnešní době je nejvíce používanou metoda absorpční v UV/VIS oblasti a metoda fluorescenční. [26] Tabulka 2 shrnuje detekční techniky, koncentrační limity, výhody a nevýhody.

Metoda	Detekční limit (mol)	Koncentrační detekční limit (mol/l)	Výhody/Nevýhody
UV/VIS absorbance	$10^{-12} - 10^{-5}$	$10^{-5} - 10^{-7}$	Univerzální, poskytuje spektrální informaci
Fluorescence	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$	Citlivá, vyžaduje derivatizaci vzorku
LIF <sup>1</sup>	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-9} - 10^{-12}$	Extrémně citlivá, drahá
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$	Citlivá, selektivní pro elektroaktivní látky
Vodivostní	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-6} - 10^{-7}$	Univerzální
MS <sup>2</sup>	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$	Citlivá, poskytuje strukturální informaci

Tabulka 2: Detekční metody. <sup>1</sup> laserem indukovaná fluorescence, <sup>2</sup> hmotnostní spektrometrie [27]

#### 2.6.4 Separace isoform metalothioneinu kapilární elektroforézou

Největší rozmach ve zkoumání isoform metalothioneinu kapilární elektroforézou nastal v 90. letech 20. století, s čímž souvisí množství vydaných publikací v tomto období. Na počátku 21. století zájem opadl, z důvodu rozvoje nových metod.

V roce 1993 vydali J. H. Beattie a M. P. Richards článek, ve kterém srovnávají techniky CZE a RP - HPLC pro separaci isoform metalothioneinu. Analyzované vzorky isoform MT byly zakoupeny od různých komerčních zdrojů nebo byly izolovány z gelu (obsahovaly isoformy z králíčích, kuřecích, krysích a lidských jater, a koňských ledvin). Během studie zjistili, že rychlost migrace isoform je závislá na celkovém náboji molekuly a na pořadí jednotlivých aminokyselin v sekvenci DNA kódující metalothionein. MT-2 je pravděpodobně více záporně nabitá, proto migruje pomaleji než isoforma MT-1. U všech analyzovaných vzorků bylo zjištěno, že signály se liší v závislosti na hodnotě pH (např. v počtu píků nebo migračním čase) a taktéž záleží na tom, z jakého orgánu byly isoformy izolovány. [39]

O rok později publikuje M. P. Richards práci, ve které k separaci isoform MT používá křemennou kapiláru, jejíž vnitřní povrch je pokryt polyaminy. Autor uvádí, že vnitřně pokrytá kapilára zvyšuje separační účinnost, zlepšuje kvantifikaci isoform MT, přispívá k udržení přirozené struktury MT a obsah kovu v molekule je zachován. Důvodem dosažení lepších výsledků mohou být specifické interakce mezi elektrolytem a povrchem kapiláry, které zpomalují elektroosmotický tok směrem k anodě a ovlivňují mobilitu jednotlivých isoform. [40]

V roce 1996 Virtanen a kolektiv studovali vliv teploty, koncentrace elektrolytu, jeho složení, pH a hodnotu aplikovaného napětí na separaci MT. Jako vzorek byly použity isoformy z králíčích jater a koňských ledvin. Během experimentu zjistili, že se vzrůstající teplotou klesá migrační čas a roste mobilita částic, tento fakt souvisí s viskozitou roztoku. Dále zjistili, že pH elektrolytu silně ovlivňuje separaci a to u každého vzorku jinak, důvodem mohou být změny ve struktuře, v náboji nebo distribuci aminokyselinových zbytků. [41]

O dva roky později stejní autoři zkoumali vliv přídavku methanolu (MeOH) do elektrolytu. Jako vzorek opět použili isoformy z králíčích jater a koňských ledvin. Přídavek MeOH zvýšil viskozitu elektrolytu, bylo dosaženo větší separace a byly získány bližší informace o heterogenitě jednotlivých isoform. Rovněž byla prokázána vyšší teplotní

závislost separace po přidavku MeOH. [42] O pár let později zkoumali jako elektrolyt čistý tricine. [43]

Ve stejném roce T. Minami a kolektiv využívali kapilární elektroforézu pro separaci MT z myších jater. Jako vzorek použili játra z 6 - týdnů staré myši (druh ddY), která byla rozdělena do několika částí a z každé byla vytvořena homogenizovaná směs s různými druhy médií. Byly porovnávány separace supernatantů z tepelně neupravovaných, tepelně upravovaných a ethanolem vysrážených vzorků. Isoforma MT-2 byla úspěšně separována, zatímco MT-1 byla těžko identifikovatelná. Autoři na závěr konstatují, že CE s polyakrylamidem pokrytou kapilárou při neutrálním pH je vhodná metoda pro detekci MT isoform v surové frakci jaterního cytosolu. [44]

Kubo a kolektiv v roce 1999 používali pro identifikaci MT isoform přidavek protilátek anti-MT do vzorku izolovaného z myších jater a o rok později metodu pozměnili, místo přidavku protilátek vzorek inkubovali po různou dobu s činidlem EDTA. Jak po přidání anti-MT, tak s činidlem EDTA, klesly výšky píků charakteristických pro isoformy MT. Inkubace s činidlem EDTA je užitečná pro separaci MT, ovšem tato reakce je stále nejasná. [45, 46] V jejich dalším pokusu používali vzorky izolované z myších jater a slinivky břišní, byly to frakce z jádra, mitochondrií, cytosolu a frakce mikrosomální. Do vzorků v tomto případě nebyl přidáván jakýkoliv detergent. Zjistili, že MT-2 je mnohem více distribuována než MT-1 ve frakci z jádra, například v porovnání s frakcí z cytosolu. [47]

V roce 2002 T. Minami a kolektiv vydali článek, ve kterém hodnotí efektivitu separace isoform při různých způsobech detekce. Zabývali se detektory typu Proton-induced X-ray emission (PIXE), Inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP – MS) a ICP – isotope dilution (ID) – MS. Při použití těchto detektorů ve spojení s kapilární elektroforézou by mohlo být do budoucna možné realizovat separaci isoform ve větším detailu. [48]

T. W. Wilhelmsen a kolektiv v roce 2004 zkoumali vliv přidavku cyklodextrinu (CD) do elektrolytu a došli k následujícímu: přítomnost CD v elektrolytu výrazně zlepšuje separaci MT v rámci oddělitelnosti jednotlivých píků, výšky píků a stability jednotlivých forem MT přítomných ve vzorcích z koňských ledvin. [49]

Tabulka 3 zobrazuje souhrn dílčích podmínek separací isoform MT publikovaných ve výše jmenovaných člancích.

<b>Vzorek</b>	<b>Kapilára [cm]</b>	<b>Elektrolyt</b>	<b>pH</b>	<b>U</b>	<b>Reference</b>
<b>Koncentrace</b>	<b>ID [<math>\mu\text{m}</math>]</b>			<b>[kV]</b>	
	<b>Vnitřní povrch</b>				
králíčí játra	57/50	10 mM fosfát	2,5	30	[39]
1 mg/ml	75				
různé	57/50	100 mM fosfát	7,0	20	[40]
1 mg/ml	50				
	polyaminy				
králíčí játra	57/50	110 mM Tris – 110 mM borát	6,9	10	[41]
koňské ledviny	50 nebo 75				
1 mg/ml					
králíčí játra	57/50	150 mM Tris – 150 mM	7,75	10	[42]
koňské ledviny	50	tricine + 30-40% MeOH			
1 mg/ml					
reálná myši játra	42/34	25 mM HEPES - Tris	7,4	25	[44]
	75				
	polyakrylamidy				
reálná myši játra/ + protilátky anti-	33/25	50 mM HEPES - Tris	7,4	20	[45, 46, 47]
MT/ + EDTA	75	polyakrylamidy			

**Tabulka 3: Vhodné separační podmínky.**

## 2.7 Čipová elektroforéza

V roce 1992 byla Harrisonem a kolektivem poprvé představena kapilární elektroforéza v mikrofluidním formátu na čipu (micro-chip based capillary electrophoresis, MCE). Jako mikrofluidní formát označujeme manipulaci s tekutinami v mikrokanálech o rozměrech 10 – 100  $\mu\text{m}$ .

Elektroforéza sama o sobě může být provedena daleko efektivněji na mikrofluidním formátu. Odvod tepla v rámci čipu je mnohem lepší než v rámci kapiláry, i přesto, že se jedná o stejný materiál. Kanál, ve kterém probíhá separace je taktéž kratší a může být aplikována vyšší intenzita elektrického pole, tím je i celá separace rychlejší. Další výhodou je nižší spotřeba vzorku a ostatních chemikálií.

Elektroforéza zůstala hlavním zdrojem separace na mikrofluidních čípech, například chromatografie je využívána mnohem méně. Za prvé, hnací silou elektroforézy je elektrické pole, které může být aplikováno prostřednictvím kontaktu elektrod se

základním elektrolytem bez použití vysokého tlaku jako je třeba v případě chromatografie. Za druhé, v některých modifikacích elektroforézy (CZE, MEKC, IEF), je separační účinnost dána velikostí napětí. Při elektroforéze na čipu je možné dosáhnout vysoké účinnosti při aplikaci vysokého napětí, přestože je separační kanál krátký.

Obecně platí, že všechny tyto vlastnosti vedou ke zjednodušení obsluhy mikrofluidní čipové elektroforézy, snižuje se cena každého čipu a dochází k jeho miniaturizaci a zvýšení mobility. Chromatografie se běžně neprovádí, protože materiály, jako jsou sklo a plasty, nemohou vydržet tlak, který je zde třeba. [31]

### 2.7.1 Typy čipů

Většina mikročipů pro MCE byla vyrobena ze skla nebo křemene pomocí fotolitografie, mokřím leptáním nebo tepelným lepením. Nicméně jejich použití je omezeno z důvodu vysokých nákladů, škodlivých a komplikovaných postupů výroby, a geometrických modifikací kanálů na čipu. Proto se polymery stávají nejslibnějšími materiály pro výrobu čipů. Polydimethylsiloxan (PDMS) a polymethylmethakrylát (PMMA) se staly nejvíce běžně používanými polymery pro výrobu čipů, protože jsou levné, lehce se vyrobí a mají vynikající optickou transparentnost.

PDMS čipy byly nejčastěji vyráběny měkkou litografií. Některé čipy však byly vyrobeny technikou *in situ* polymerace, laserovou ablací, vtisknutím nebo injekčním litím. Mezi rutinně používané typy detekcí se řadí detekce optická, elektrochemická (ECD) nebo hmotnostní spektrometrie. [32]

### 2.7.2 Aplikace

Čipová elektroforéza získala v poslední době hodně pozornosti díky své všestranné využitelnosti. Vyvinutí této metody je výhodné pro mnoho odvětví, jako je monitorování životního prostředí, biomedicínské a farmaceutické analýzy, klinická diagnostika a forenzní šetření. [32]

Existuje mnoho modifikací elektroforézy, jsou to například kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), izoelektrická fokusace (IEF) a kapilární gelová elektroforéza (CGE). Toto jsou nejčastěji využívané módy kapilární elektroforézy a byly převedeny do mikrofluidního čipového formátu. [33]

Duffy a kolektiv zkoumali separaci na mikrofluidním systému v PDMS. Pro separaci použili aminokyseliny, kladně a záporně nabitě proteiny a DNA fragmenty ve vodných roztocích, a došli ke srovnatelným výsledkům jako v případě klasické křemenné

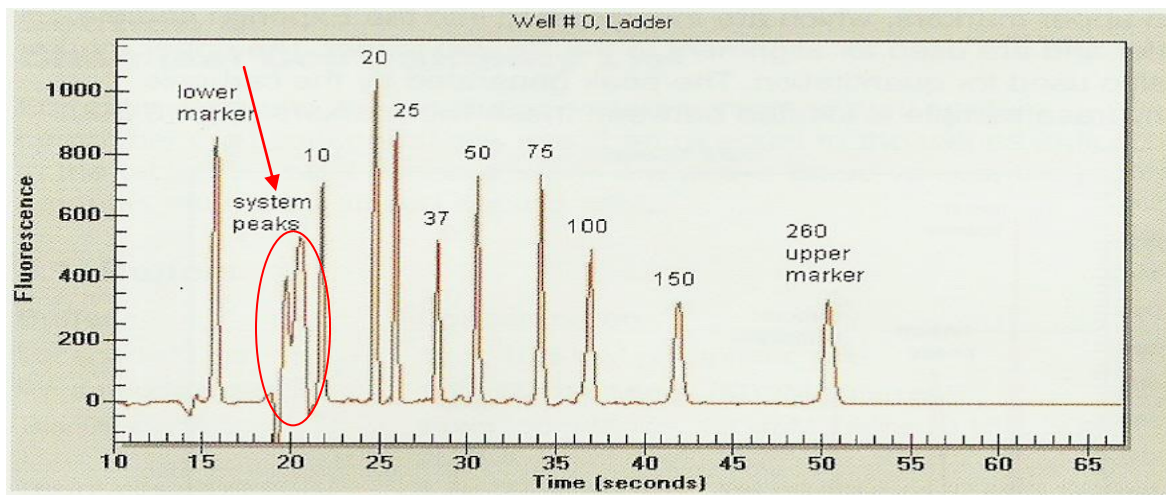
kapiláry. [35] Hofmann a kolektiv jako první provedli miniaturizaci IEF na skleněné mikročipy. Tato metoda byla použita také pro provedení příčné IEF v mikrofluidních kanálech pro nepřetržité spojení a frakcionaci bílkovin. [36] Trockmorton a kolektiv vyvinuli skleněný čip, jehož kanály jsou plněny monolitem, a který se využívá pro reverzní elektrochromatografii. [37]

Taktéž je možné sestavit dvourozměrnou elektroforézu (2D-CE) pomocí propojení dvou separací z jiných módů. Ovšem tato spojení vyžadují mnoho preciznosti a sestavení 2D elektroferogramu je obtížné. Jako příklad je možné uvést spojení MEKC s vysoko-rychlostní elektroforézou v otevřeném kanálu, MEKC-CZE nebo IEF-GE. [33]

### **2.7.3 Separace metalothioneinu na čipu**

Mapování peptidů je důležitou metodou pro identifikaci a charakterizaci proteinové sekvence a jejich funkce. Křížková a kolektiv ve své práci studovali redukovaný a neredukovaný metalothionein a vliv dílčích podmínek na jeho oxidaci pomocí čipové elektroforézy. Zjistili, že signál pro metalothionein v redukovaných podmínkách je vyšší ve srovnání s neredukovanými podmínkami analýzy, přičemž zaznamenali největší odezvu u molekulových hmotností 12 630 Da a 52 120 Da. Tyto hmotnosti odpovídají shlukům molekul MT, v prvním případě se jedná o dimer a ve druhém případě o tetramer. [38]

V případě jedné molekuly metalothioneinu, jejíž hmotnost se pohybuje v rozmezí 6 000 – 7 000 Da, je použití čipové elektroforézy nevhodné. Jedním z důvodů je délka separačního kanálu, je příliš krátký, dochází i ke zkrácení času separace a jednotlivé isoformy metalothioneinu se nemohou oddělit. Dalším důvodem je právě molekulová hmotnost metalothioneinu, na obrázku 4 je znázorněn elektroferogram ladderu (Experion Pro260 Analysis Kit) z přístroje Experion od firmy Bio-Rad. Jednotlivá čísla nad píky znamenají molekulovou hmotnost a je vidět, že signál pro metalothionein by se kryl se systémovým píkem. Pro separaci isoform metalothioneinu je vhodnější klasická kapilární elektroforéza, a proto je v experimentální části věnována pozornost tomuto typu metody.



Obrázek 4: Elektroferogram ladderu. [Experion Pro260 Analysis Kit, Instruction Manual]

### 3 Cíle práce

Cílem práce je zjistit, zda je kapilární elektroforéza vhodnou metodou pro separaci jednotlivých isoform metalothioneinu a zda je možné tuto metodu aplikovat na reálné vzorky krevního séra od pacientů postižených nádorovým onemocněním (konkrétně karcinomem prostaty). Dalším cílem je identifikace jednotlivých isoform a porovnání s výsledky získanými z Brdičkovy reakce. Po úspěšné charakterizaci a validaci metody je možné uvažovat o začlenění kapilární elektroforézy do praktického využití v rámci diagnostiky karcinomu prostaty i jiných druhů nádorových onemocnění. Pořizovací náklady jsou sice relativně vysoké, ale proti tomu stojí všestranná využitelnost kapilární elektroforézy, jednoduchost obsluhy a relativně rychlý čas analýzy.



## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiály a metody

V práci byl použit přístroj CE Beckman PACE 5500, křemenná kapilára o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , délky 47/40 cm pro UV detekci a 37/30 cm pro LIF detekci (laserem indukovaná fluorescence). Pro UV detekci byla měřena absorbance vzorku při 214 nm, pro LIF detekci byl vzorek excitován  $\text{Ar}^+$  laserem (488 nm) a bylo snímáno emitované záření při 530 nm. Chemikálie byly v acs čistotě zakoupeny u firmy Sigma Aldrich a rozpuštěny v MiliQ vodě. Vzorky se dávkovaly po dobu 18 sekund tlakem 3,4 kPa.

Hodnoty pH byly nastavovány pH metrem. V případě denaturace byly vzorky zahřívány v termobloku po dobu 20 minut při teplotě 99°C a centrifugovány po dobu 10 minut při 14 000 otáčkách a při 4°C.

V případě fluorescenční detekce byl jako derivatizační činidlo použit fluorescein isothiokyanát (FITC) rozpuštěný v acetonu na koncentraci 0,1 mg/ml. Vzorky byly ředěny v poměru 1:1 s FITC a derivatizovány po dobu 4 hodin při 50°C.

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Bioinformatické zhodnocení isoform MT

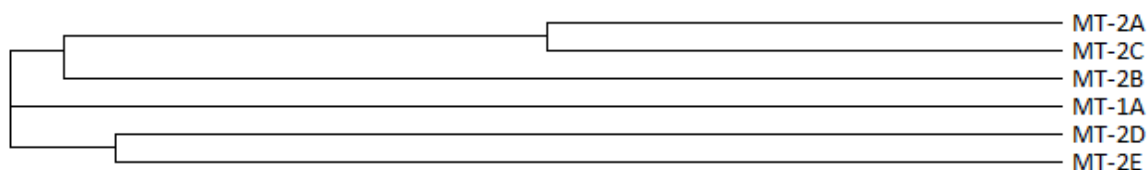
V rámci bioinformatického zpracování isoform byly jednotlivé sekvence kódující metalothionein zarovnány a jsou uvedeny fylogenetické stromy. Zkoumány byly isoformy králičí a lidské a jsou zhodnoceny biochemické vlastnosti související se separací kapilární elektroforézou. Analýza jednotlivých sekvencí byla provedena pomocí proteinové databáze The Univesal Protein Resource (UniProt), která umožňuje rozpracování proteinových sekvencí.

#### 5.1.1 Fylogenetické stromy

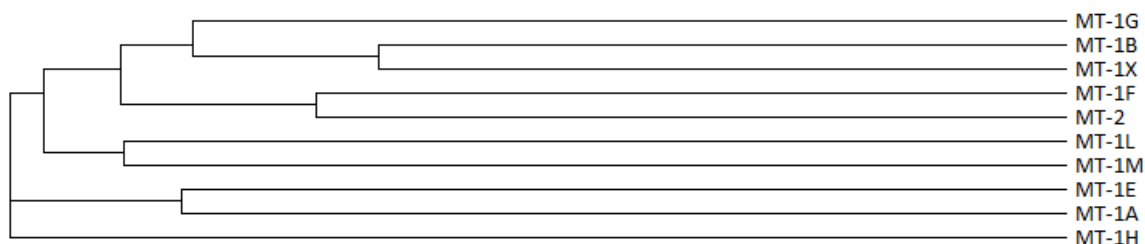
Fylogenetika je věda zabývající se studiem příbuzenských vztahů mezi organismy, analyzuje vznik a vývoj jednotlivých vývojových linií (taxonů), rekonstruuje pořadí a způsob větvení taxonů během evoluce. Vychází se z předpokladu, že všechny známé druhy organismů žijící na Zemi vznikly v průběhu fylogeneze ze společného předka. Existují tři základní metody konstrukce fylogenetických stromů, jsou to minimální evoluce, maximální parsimonie a vyhledávání „nejlepšího možného“ stromu. [8]

Jak u králíků, tak u lidí byly objeveny čtyři základní isoformy, v této práci bude pozornost soustředěna na dvě hlavní (MT-1 a MT-2). V králičí DNA je MT-1 kódována pouze jednou sekvencí (MT-1A), zatímco MT-2 je kódována pěti sekvencemi (MT-2A – MT-2E). V lidské DNA je MT-1 kódována osmi sekvencemi a MT-2 pouze jednou. Délka sekvencí u obou organismů se pohybuje v rozmezí 60-62 aminokyselin. [20, 51] Na obrázku 5 je znázorněn fylogenetický strom sekvencí pro králičí isoformy, na obrázku 6 pro lidské isoformy. Na obrázku 7 je znázorněna lokalizace sekvencí lidských MT na chromosomu 16, kde je vidět, že isoformy jsou seskupeny blízko sebe a jejich vzájemné odlišnosti jsou minimální.

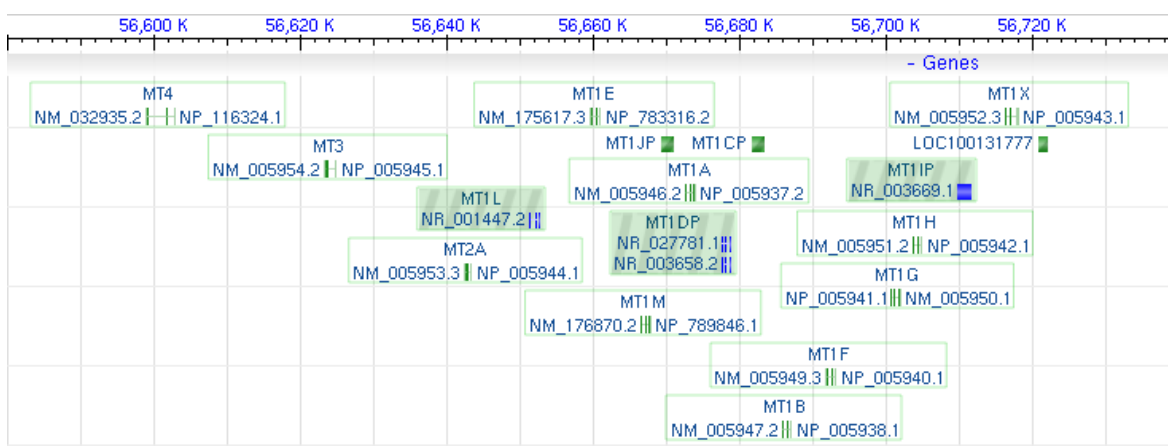
K vytvoření stromu se používá matice podobností a metoda spojování sousedů (Neighbor Joining), která patří mezi metody minimální evoluce. Pokud dvě nebo více sekvencí sdílí větev stromu, může to znamenat evoluční vztah mezi sekvencemi. Délka větve značí stupeň divergence sekvence. [50]



Obrázek 5: Fylogenetický strom sekvencí pro králičí isoformy MT. [20]



Obrázek 6: Fylogenetický strom sekvencí pro lidské isoformy MT. [51]



Obrázek 7: Lokalizace lidských MT na chromosomu 16. [52]

### 5.1.2 Zarovnání sekvencí

Existuje mnoho zarovnávacích algoritmů pro zarovnávání více sekvencí najednou, například metoda sumy párů, v případě databáze UniProt jsou sekvence zarovnávány metodou Clustalw. Clustalw je progresivní metoda, při níž nejdříve dochází k zarovnávání ve všech sekvencích „pár po páru“, aby byly zjištěny nejvíce podobné sekvence, a dále se progresivně přidávají méně podobné. [50]

Na obrázcích 8 a 9 je znázorněno zarovnání králičích a lidských isoformem. Symboly pod zarovnáním ukazují míru homologie všech sekvencí, hvězdička značí shodu a tečka neshodu, přičemž počet teček udává váhu neshody (čím více teček, tím větší rozdíl). Další značení je barevné, modrá označuje aminokyseliny schopné vázat kov, červeně jsou

zobrazeny negativní aminokyseliny a zeleně pozitivní. V případě lidských sekvencí je označena aminokyselina histidin, která obsahuje aromatické jádro. [20, 51]

Jak je vidět ze zarovnání, metalothioneiny jsou schopné vázat kov přes cysteiny, to se děje pomocí jejich SH skupiny. Dále lze potvrdit fakt zmíněný v teoretické části, že v sekvencích náleží cysteinu 20 poloh, což odpovídá téměř 30% obsahu všech aminokyselin v molekule MT. Negativní náboj distribuuje kyselina asparagová a glutamová (D a E), zatímco pozitivní náboj distribuuje arginin a lysin (R a K), v lidských sekvencích navíc ještě histidin (H).

V grafech 2 a 3 je znázorněno množství negativních aminokyselin v jednotlivých isoformách a subisoformách. Molekula MT-2 má v průměru více negativní náboj než molekula MT-1. V případě CE separace od anody ke katodě (plus k minus) bude MT-2 migrovat pomaleji v porovnání s MT-1, rozdíl ovšem nebude příliš markantní, jelikož se jedná o rozdíl pouze v jednom náboji.

```

MDPNCSCATR-DSCACASSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPAGCTKCAQGCICKGASDKCSCCA 61 MT-2D
MDPNCSCATR-DSCACASSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPAGCTKCAQGCICKGALDKCSCCA 61 MT-2E
MDPNCSCATG-NSCTCASSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPAGCTKCAQGCICKGASDKCSCCA 61 MT-1A
MDPNCSCATG-DSTCASSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPAGCTKCAQGCICKGASDKCSCCA 61 MT-2B
MDPNCSCAAAGDSTCANSCTCKACKCTSCKKSCCSCCPFGCAKCAQGCICKGASDKCSCCA 62 MT-2A
MDPNCSCATAGDSTCANSCTCKACKCTSCKKSCCSCCPFGCAKCAQGCICKGASDKCSCCA 62 MT-2C
*****: :*:*:*.**.* ** *****: :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

```

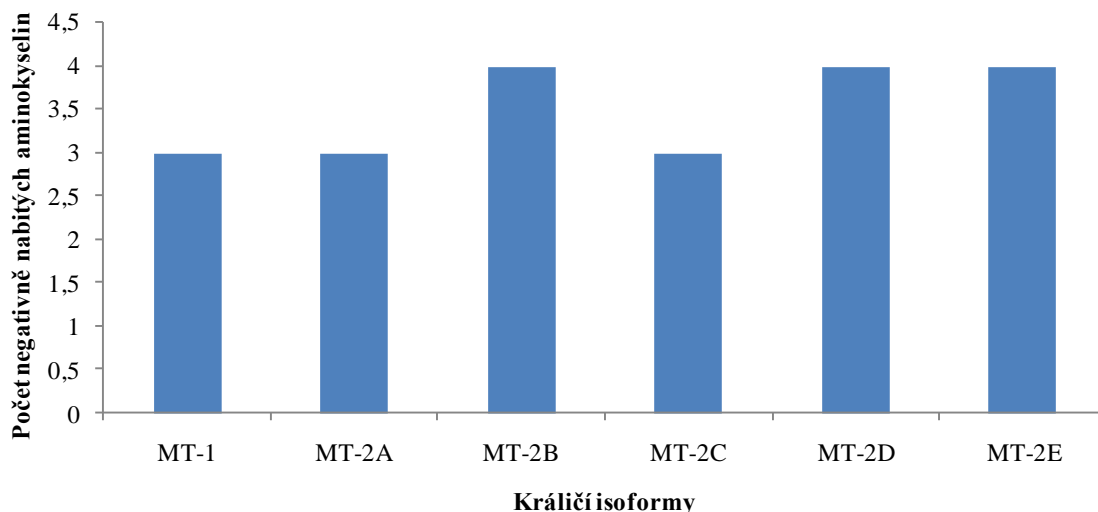
Obrázek 8: Zarovnání sekvencí králičích isoform MT. [20]

```

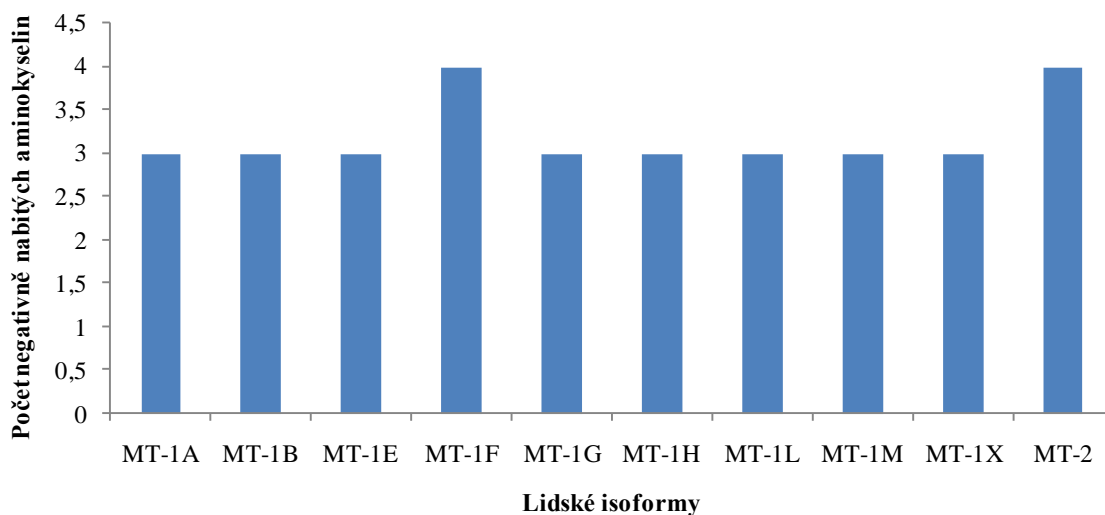
MDPNCSCATGG-SCTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPVGC AKCAQGC VCKGASEKCSCCA 61 MT-1E
MDPNCSCATGG-SCTCTGSCCKCKECKCTSCKKSCCSCCPMSCAKCAQGCICKGASEKCSCCA 61 MT-1A
MDPNCSCFAGG-SACAGSCKCKCKCKCTSCKKSCCSCCP LGCAKCAQGCICKGASEKCSCCA 61 MT-1H
MDPNCSCATGG-SSCASSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPMGCAKCAQGC VCKGASEKCSCCA 61 MT-1L
MDPNCSCITGV-SACTGSC TCKECKCTSCKKSCCSCCPVGC AKCA GCVCKGTLENCSCCA 61 MT-1M
MDPNCSCITGG-SACAGSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPVGC AKCAQGC VCKGSSEKCRCCA 61 MT-1B
MDPNCSCSPVG-SACAGSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPVGC AKCAQGCICKGTSDKCSCCA 61 MT-1X
MDPNCSCAAAGVSTCASSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPVGC AKCAQGCICKGASEKCSCCA 62 MT-1G
MDPNCSC-AAGVSTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPVGC SKCAQGC VCKGASEKCSCCD 61 MT-1F
MDPNCSC-AAGDSTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSCCPVGC AKCAQGCICKGASDKCSCCA 61 MT-2
***** :*:*:*.**.* ** *****: :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

```

Obrázek 9: Zarovnání sekvencí lidských isoform MT. [51]



Graf 2: Negativně nabité aminokyseliny v sekvencích králičích isoform. [20]



Graf 3: Negativně nabité aminokyseliny v sekvencích lidských isoform. [51]

## 5.2 CE analýza standardů MT

Pro všechny analýzy byla jako vzorek použita standardní směs isoform metalothioneinu z králičích jater (MT-1 a MT-2) o koncentraci 5 mg/ml, isoforma MT-1 a MT-2 z králičích jater (koncentrace 1 mg/ml). Během analýz byl zkoumán vliv elektrolytu, jeho pH a hodnota napětí.

### 5.2.1 Optimalizace metody

Při vlastním měření je důležité optimalizovat dílčí podmínky, tak aby bylo dosaženo co nejvyšší účinnosti metody. Je možné vycházet ze studií, které jsou zaměřeny

na separaci isoformem metalothioneinu pomocí kapilární elektroforézy. J. H. Beattie v roce 1998 publikoval článek s optimálními podmínkami pro separaci, ty jsou uvedeny v tabulce 4. [34]

Elektrolyt	pH	Délka kapiláry [cm]	id <sup>1</sup> [μm]	Napětí [kV]
150 mM fosfát	2,5	57	50	30
500 mM fosfát	2,0	27	20	15
110 mM tris-borát	6,9	57	50	20
500 mM borát	8,4	57	25	10
500 mM borát	10,4	57	25	10
100 mM fosfát	7,0	57	50	20
50 mM fosfát	7,0	37	50	18,5
300 mM borát	8,4	57	75	10
25 mM tris-hepes	7,4	33	75	15
500 mM fosfát	2,0	27	20	15
20 mM fosfát	7,0	57	75	20

**Tabulka 4: Souhrn podmínek podle J. H. Beattie. <sup>1</sup> vnitřní průměr [34]**

V této práci byl jako první typ elektrolytu použit 20 mM fosfát s pH 7,0 a bylo aplikováno napětí 20 kV. Separace isoformem byla neuspokojivá, byly pozorovány pouze velmi slabé signály s migračním časem 4 - 6 minut. Jako další byl testován 300 mM borát, jehož pH bylo 7,7, ovšem píky stále nebyly dostatečně oddělené, proto bylo při další analýze sníženo napětí na 10 kV. Nižší napětí zpomalilo migraci látek kapilárou.

Taktéž byl zkoumán vliv pH, v případě 300 mM borátového elektrolytu bylo zvýšeno pH na hodnotu 8,7 a poté na hodnotu 9,5. Bylo zjištěno, že vyšší pH je pro separaci vhodnější, píky byly více oddělené a zřetelné. Taktéž byla zkoumána koncentrace elektrolytu, byl zvolen 20 mM borát a bylo dosaženo dobrých výsledků. Dílčí elektroferogramy se nachází v příloze 1, elektroferogram směsi MT-1 a MT-2 je na grafu 4.

Pro jednotlivé parametry bylo vypočteno rozlišení podle vzorce

$$R = \frac{tr_2 - tr_1}{0,5(w_2 + w_1)}, \quad (1)$$

kde  $tr$  je migrační čas a  $w$  je šířka píky u základny.

Rozlišení je počítáno pro dva sousedící píky a udává míru účinnosti separace, čím vyšší číslo, tím je separace účinnější. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.

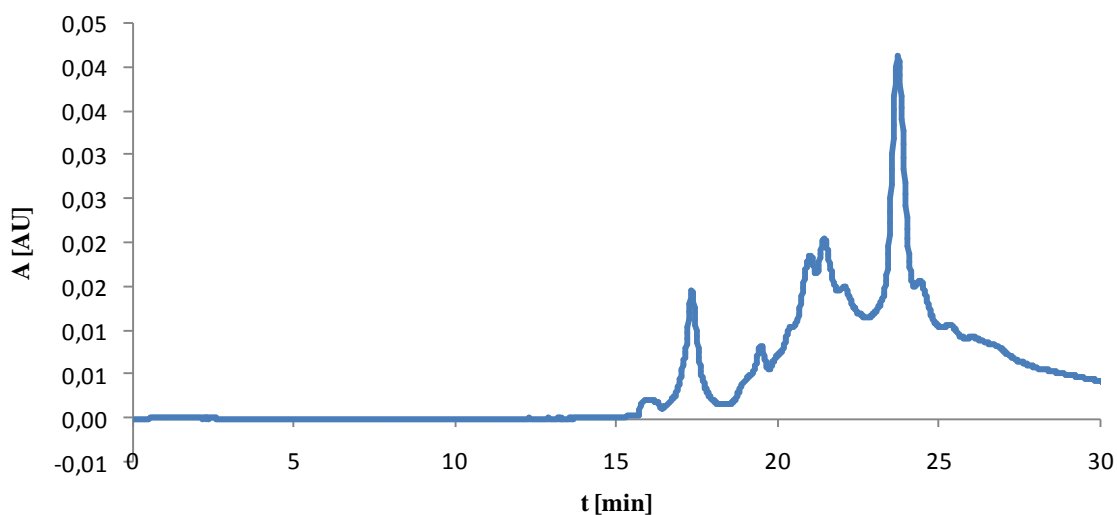
Vzorek	Elektrolyt	pH elektrolytu	U [kV]	Rozlišení
směsný roztok	20 mM fosfát	7,0	20	-
směsný roztok	300 mM borát	7,7	20	0,496
směsný roztok	300 mM borát	7,7	10	1,314
směsný roztok	300 mM borát	8,7	10	1,500
<b>směsný roztok</b>	<b>300 mM borát</b>	<b>9,5</b>	<b>10</b>	<b>1,792</b>
MT-1	300 mM borát	7,7	10	0,720
MT-1	300 mM borát	8,7	10	0,900
<b>MT-1</b>	<b>300 mM borát</b>	<b>9,5</b>	<b>10</b>	<b>1,680</b>
MT-1	20 mM borát	9,5	10	0,823
MT-2	20 mM borát	9,5	10	0,751

Tabulka 5: Rozlišení.

Během optimalizace byly zjištěny jako vhodné následující podmínky separace standardních vzorků králíčích MT:

Elektrolyt	pH	Kapilára	U [kV]	UV [nm]	Dávkování
300 mM borát	9,5	47/40 cm	10	214	18 s
20 mM borát		50 $\mu$ m			3,4 kPa

Tabulka 6: Optimalizované podmínky.

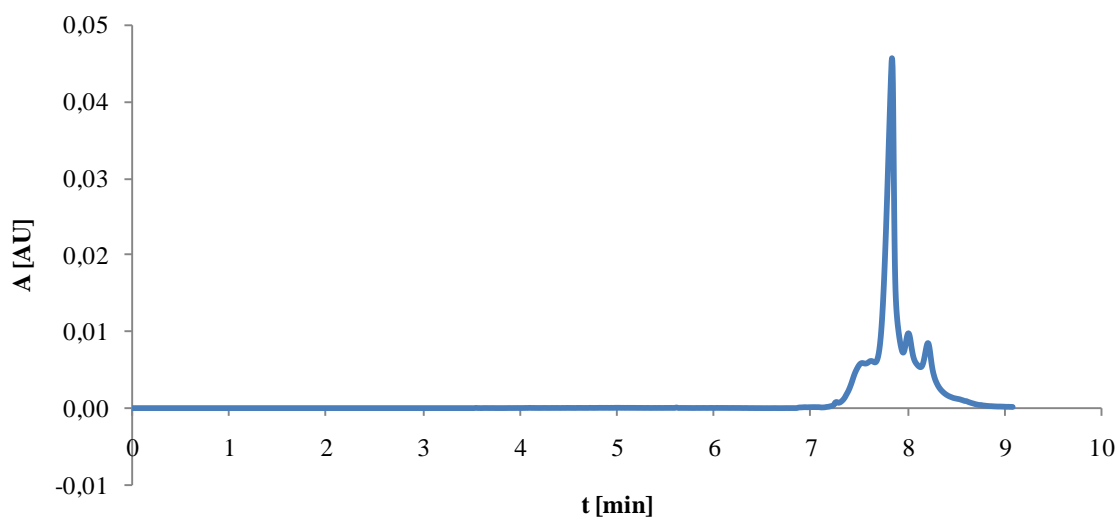


Graf 4: Analýza standardního roztoku směsi MT ve 300mM borátu ( $c = 1$  mg/ml), pH 9,5, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50  $\mu$ m, 10 kV.

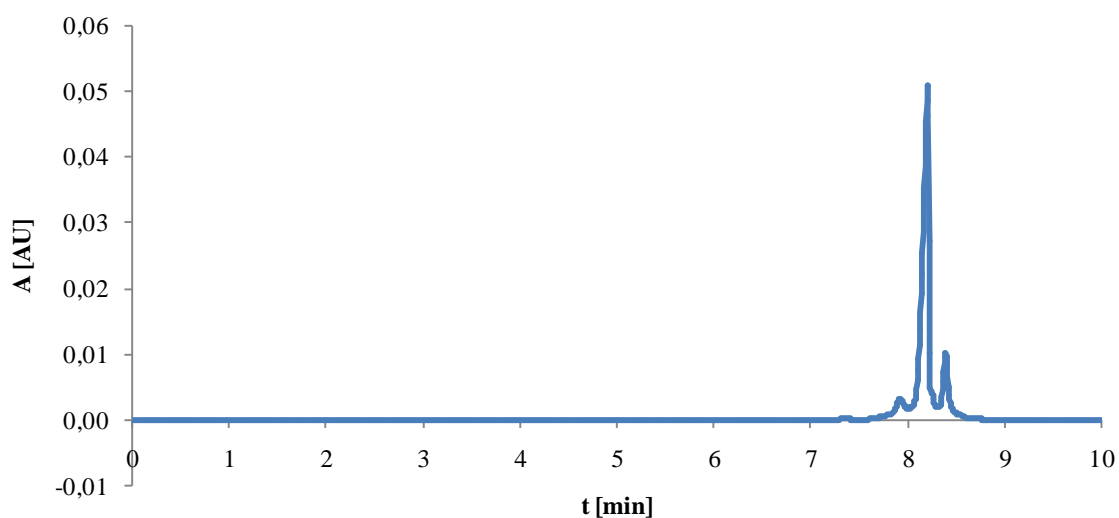
### 5.2.2 Vliv koncentrace elektrolytu na migraci isoform

V případě koncentrovanějšího elektrolytu (300 mM) migrují isoformy pomaleji než při separaci ve 20 mM borátu, separační čas se zhruba zdvojnásobí. Tento fakt je dán

vlivem koncentrace na elektroosmotický tok. V obou případech ovšem migruje nejdříve MT-1 a až po ní MT-2. To potvrzuje informaci o celkovém náboji molekul isoform zmiňovanou výše, MT-2 je více záporně nabitá, ke katodě se proto pohybuje kapilárou pomaleji, je přitahována menší silou než MT-1. Ale jedná se pouze o rozdíl jednoho náboje, proto migrují isoformy blízko za sebou. Na grafech 5 a 6 je separace ve 20 mM borátu a na grafech 7 a 8 ve 300 mM borátu, byly zvoleny podmínky získané optimalizací.

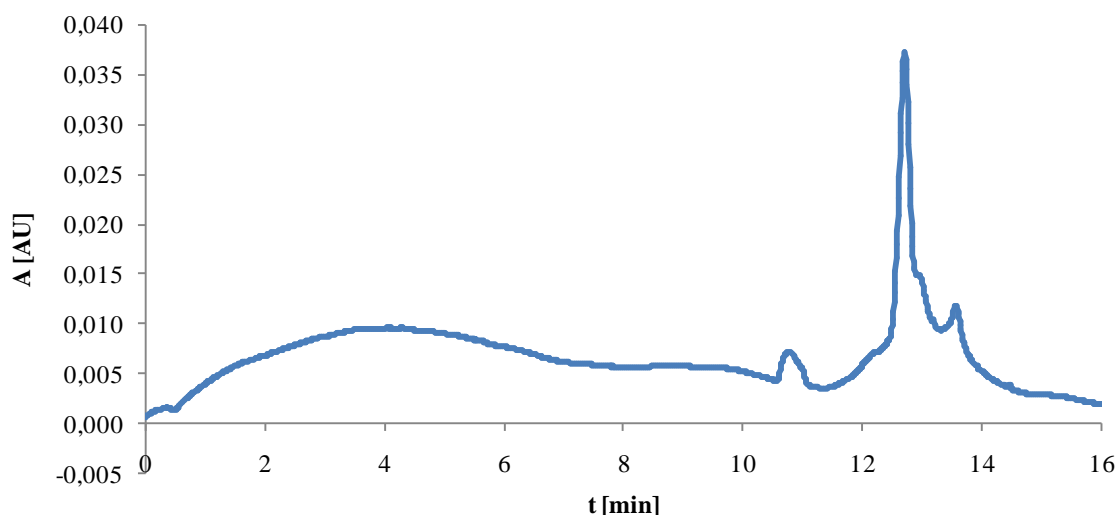


**Graf 5: Analýza standardního roztoku isoformy MT-1 ve 20 mM borátu, c = 1 mg/ml.**

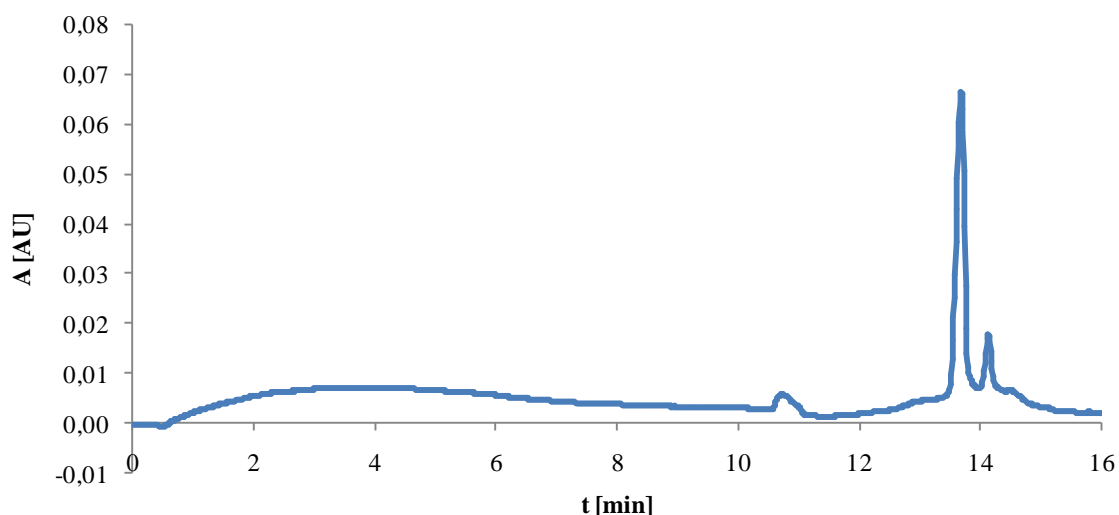


**Graf 6: Analýza standardního roztoku isoformy MT-2 ve 20 mM borátu, c = 1 mg/ml.**





Graf 7: Analýza standardního roztoku isoformy MT-1 ve 300 mM borátu,  $c = 1 \text{ mg/ml}$ .



Graf 8: Analýza standardního roztoku isoformy MT-2 ve 300 mM borátu,  $c = 1 \text{ mg/ml}$ .

### 5.2.3 Kalibrační křivky

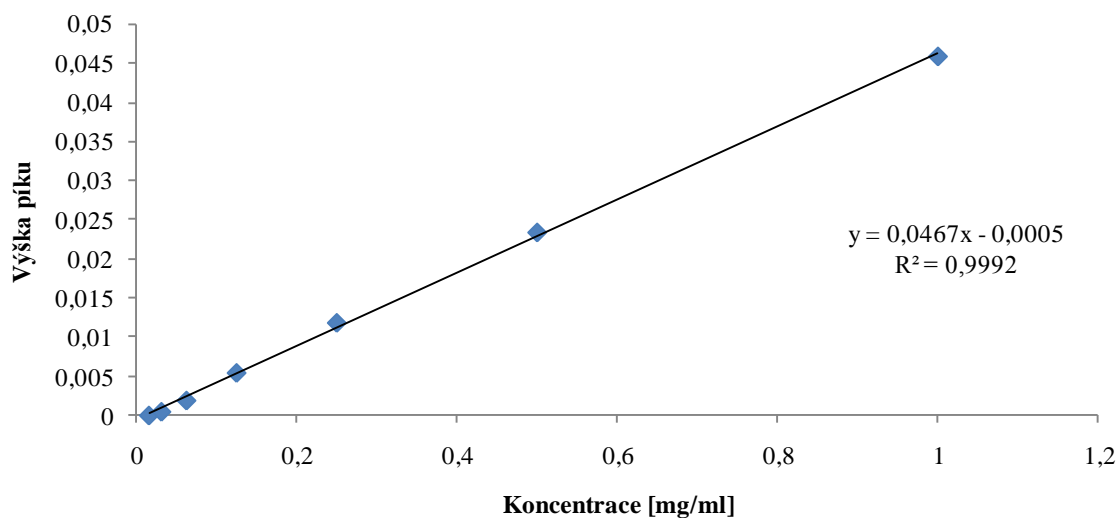
Pro vytvoření kalibračních křivek byly měřeny vzorky isoformy MT-1 a MT-2 o různých koncentracích uvedených v rozsahu 0,015 – 1 mg/ml. Taktéž byla sestrojena směšná kalibrační křivka, vzorek vznikl smícháním isoformy MT-1 a MT-2 v poměru 1:1 a byl postupně rozředěn na příslušné koncentrace 0,039 – 1,25 mg/ml. Každý ze vzorků byl měřen třikrát a kalibrační křivka je sestavena z průměrných hodnot. Pro separaci byly zvoleny podmínky získané optimalizací, jako elektrolyt byl vybrán 20 mM borát. Získané kalibrační křivky vykazují velmi dobrou linearitu s koeficienty  $R^2$  nad 0,99.

Koncentrace [ $\mu\text{M}$ ]	Koncentrace [mg/ml]	Výška píku MT-1	Výška píku MT-2
2,33	0,0156	0,0001	0,0006
4,66	0,0312	0,0006	0,0022
9,33	0,0625	0,0021	0,0051
18,66	0,125	0,0056	0,0116
37,31	0,25	0,0119	0,0259
74,63	0,5	0,0234	0,0467
149,25	1	0,0458	0,0509

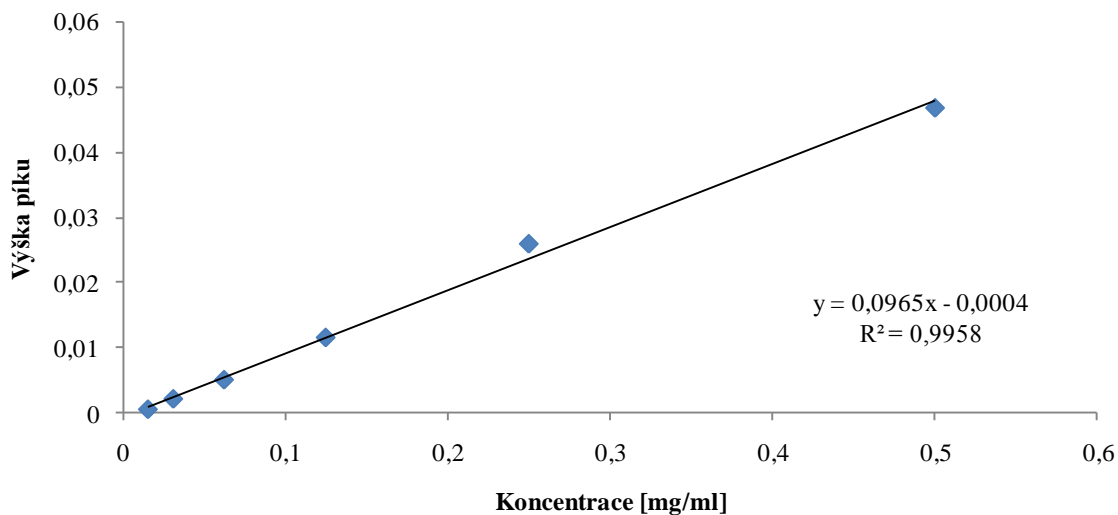
Tabulka 7: Hodnoty pro roztoky jednotlivých isoform.

Koncentrace [ $\mu\text{M}$ ]	Koncentrace [mg/ml]	Výška píku MT-1	Výška píku MT-2
5,83	0,0391	0,0003	0,0011
11,66	0,0781	0,0005	0,0032
23,32	0,1562	0,0039	0,0084
46,64	0,3125	0,0072	0,0181
93,28	0,625	0,0163	0,0297
186,56	1,25	0,0404	0,0616

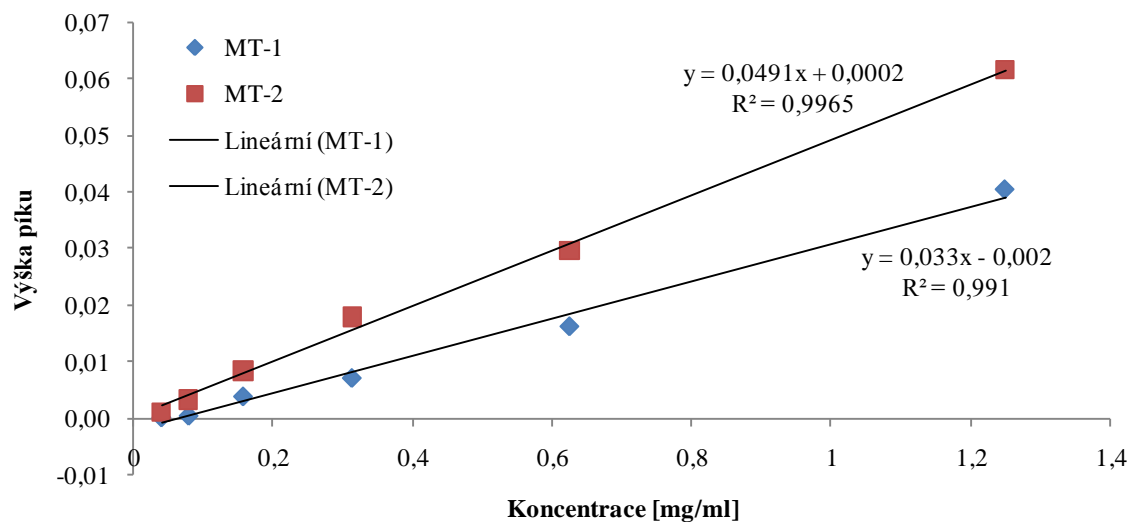
Tabulka 8: Hodnoty pro směsný roztok isoform MT-1 a MT-2.



Graf 9: Kalibrační křivka isoformy MT-1.



Graf 10: Kalibrační křivka isoformy MT-2.



Graf 11: Kalibrační křivka směsného roztoku isoform MT-1 a MT-2.

Limit detekce (LOD) byl vypočten podle vzorce

$$LOD = \frac{3s}{h} c, \quad (2)$$

kde  $s$  je směrodatná odchylka šumu,  $h$  je výška signálu a  $c$  je koncentrace vzorku.

LOD pro isoformu MT-1:

$$LOD = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}, \quad (3)$$

a pro isoformu MT-2:

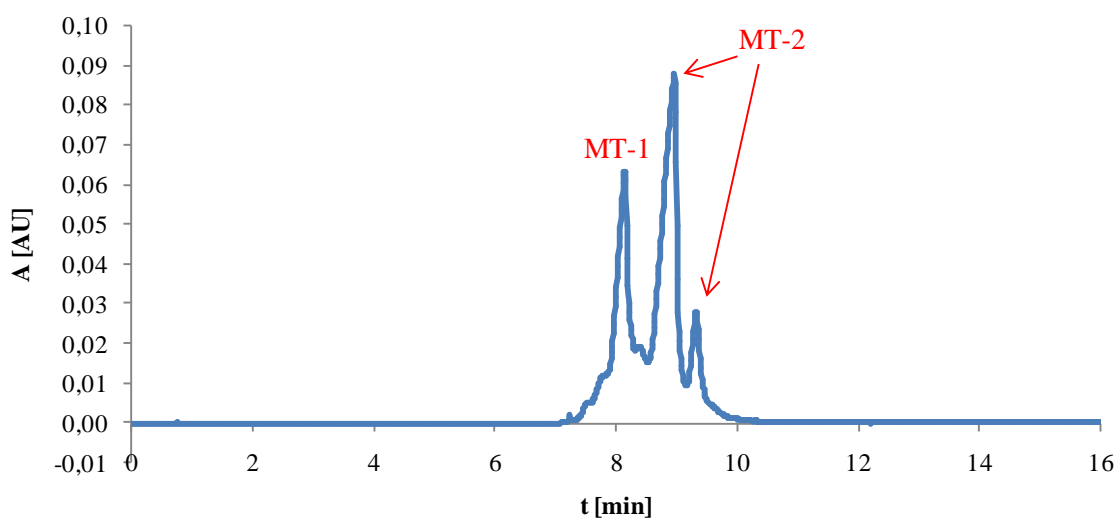
$$LOD = 8 \cdot 10^{-8} \text{ M}. \quad (4)$$

## 5.2.4 Vliv tepelné denaturace

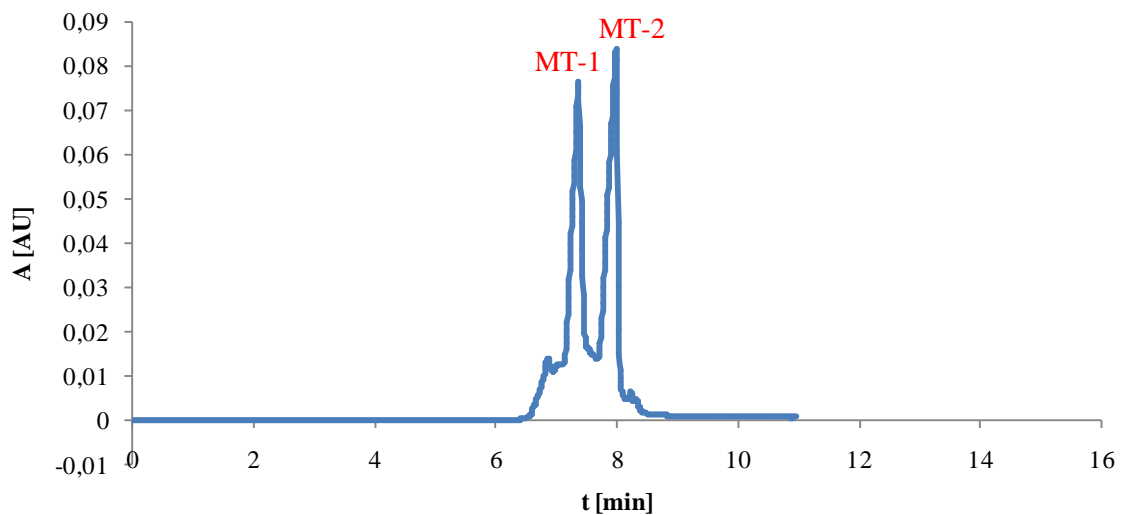
Z důvodu nutnosti denaturace krevního séra před analýzou (pro odstranění majoritních proteinů interferujících při stanovení) byl zkoumán vliv tepelné denaturace na separaci standardních isoform králíčích MT. Většina látek není termostabilní a ve vysokých teplotách se jejich molekuly rozpadají, zatímco metalothionein by měl vykazovat termostabilitu při různých změnách teploty.

Byl vytvořen směsný roztok isoformy MT-1 a MT-2 v poměru 1:1, následně byl rozředěn 300 mM borátem na koncentrace uvedené v tabulce 8. Vzniklý roztok byl zahříván v termobloku po dobu 20 minut při 99°C a poté byl centrifugován po dobu 10 minut při 4°C a otáčkách 14 000 rpm. Takto připravené roztoky byly analyzovány, elektrolyt byl 20 mM borát, ostatní podmínky zůstaly nezměněny.

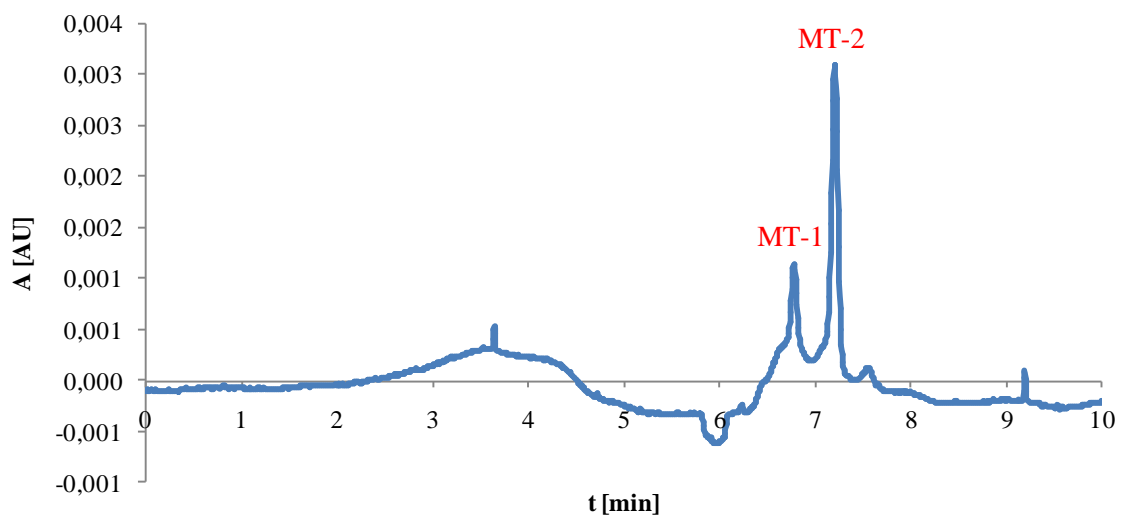
Na grafech 12 a 13 je porovnání nedenaturovaného standardu s denaturovaným v relativně vysokých koncentracích ( $c = 2,5$  mg/ml) a na grafech 14 a 15 v nízkých koncentracích ( $c = 0,078$  mg/ml). Bylo zjištěno, že ve vysokých koncentracích k výrazným změnám nedošlo, jednotlivé píky si jsou relativně podobné. I přes malý časový posun, lze jasně identifikovat MT-1 a MT-2. Ovšem v nízkých koncentracích měla denaturace na standardy velký dopad, není možné isoformy identifikovat a dochází ke vzniku píku 1. Vzniká pouze při nízkých koncentracích a pravidelně se opakuje, ale není možné píku 1 považovat za signál pro metalothionein a kvantifikovat podle něj obsah metalothioneinu v krevním séru.



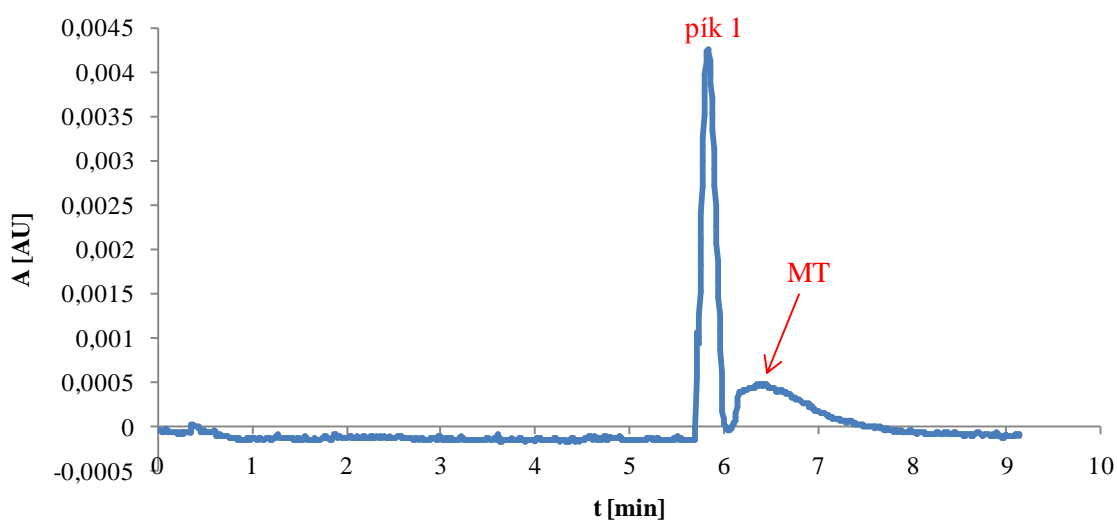
Graf 12: Analýza nedenaturovaného směsného roztoku isoformy MT-1 a MT-2,  $c = 2,5$  mg/ml.



Graf 13: Analýza denaturovaného směsného roztoku isoformy MT-1 a MT-2,  $c = 2,5$  mg/ml.



Graf 14: Analýza nedenaturovaného směsného roztoku isoformy MT-1 a MT-2,  $c = 0,078$  mg/ml.

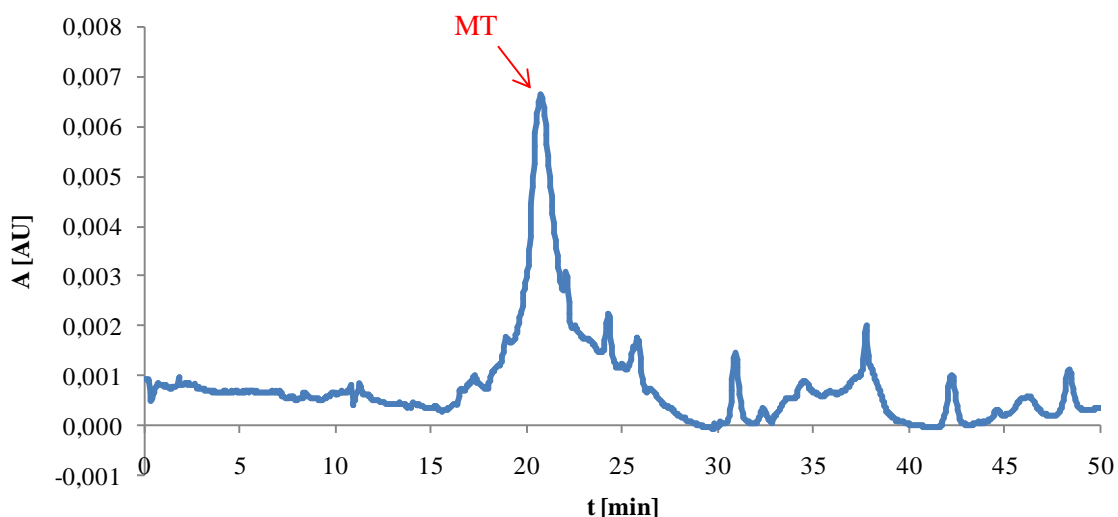


Graf 15: Analýza denaturovaného směsného roztoku isoformy MT-1 a MT-2,  $c = 0,078 \text{ mg/ml}$ .

### 5.3 Separace biologických vzorků

Pro analýzu biologických vzorků bylo použito krevní sérum pacientů s karcinomem prostaty v různém stádiu onemocnění. Krevní sérum bylo nejdříve ředěno 300 mM borátem v různém poměru, poté byl takto vzniklý roztok denaturován v termobloku a následně centrifugován. Byl odebrán supernatant, který sloužil jako analyzovaný vzorek, separace probíhala ve 300 mM borátu, aplikováno bylo napětí 20 kV, ostatní podmínky zůstaly stejné jako v případě analýzy standardů.

Na grafu 16 je elektroferogram supernatantu z krevního séra. Sérum bylo před denaturací a centrifugací ředěno 1:1 300 mM borátem, odebraný supernatant byl před analýzou ředěn znovu 1:1 300 mM borátem a takto vzniklý roztok byl měřen. Na elektroferogramu je patrné, který signál patří metalothioneinu, bohužel nebylo možné rozdělit a určit isoformy.



Graf 16: Analýza supernatantu z krevního séra.

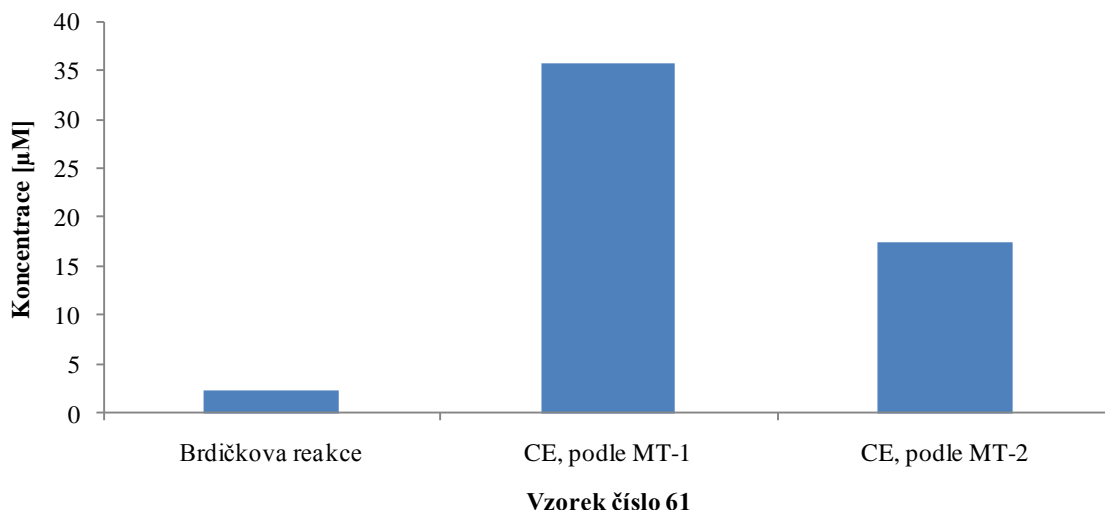
### 5.3.1 Porovnání s výsledky z Brdičkovy reakce

Taktéž byl stanoven obsah metalothioneinu v krevním séru pomocí Brdičkovy reakce. Pro analýzu byly použity stejné vzorky, denaturované, centrifugované a odebraný supernatant sloužil jako analyzovaný vzorek.

Tabulka 9 a graf 17 uvádí srovnání výsledků obsahu metalothioneinu ve vzorku číslo 61, jehož elektroferogram je zobrazen výše na grafu 16. Obsah metalothioneinu v krevním séru byl kvantifikován podle kalibrační křivky pro směsný roztok isoformy MT-1 a MT-2. Jelikož nebylo možné v krevním séru identifikovat jednotlivé isoformy, byl výsledný signál kvantifikován jednak podle MT-1, tak i podle MT-2. Když porovnáme molární koncentrace získané pomocí CE a Brdičkovy reakce, je výsledek z CE vyšší, a to v případě kvantifikace podle MT-1 zhruba 15x a v případě kvantifikace podle MT-2 7x. Bohužel nebylo k dispozici krevní sérum zdravého jedince a nebylo možné získané výsledky porovnat s obsahem metalothioneinu u zdravého člověka.

Číslo vzorku	Brdičkova reakce c [μM]	Kapilární elektroforéza kvantifikace podle MT-1		Kapilární elektroforéza kvantifikace podle MT-2	
		c [mg/ml]	c [μM]	c [mg/ml]	c [μM]
61	2,41	0,24	35,81	0,12	17,50

Tabulka 9: Porovnání výsledků obsahu metalothioneinu.



Graf 17: Porovnání obsahu metalothioneinu ve vzorku supernatantu z krevního séra.

## 5.4 CE s laserem indukovanou fluorescenční detekcí

Laserem indukovaná fluorescenční detekce kombinuje výhody mikrokolonové separace a nízké detekční limity. Fluorescence je jev, kdy molekula absorbuje určité množství energie, aby dosáhla vyšší energetické hladiny. Molekula po určité době emituje foton a vrátí se na původní energetickou hladinu. [26]

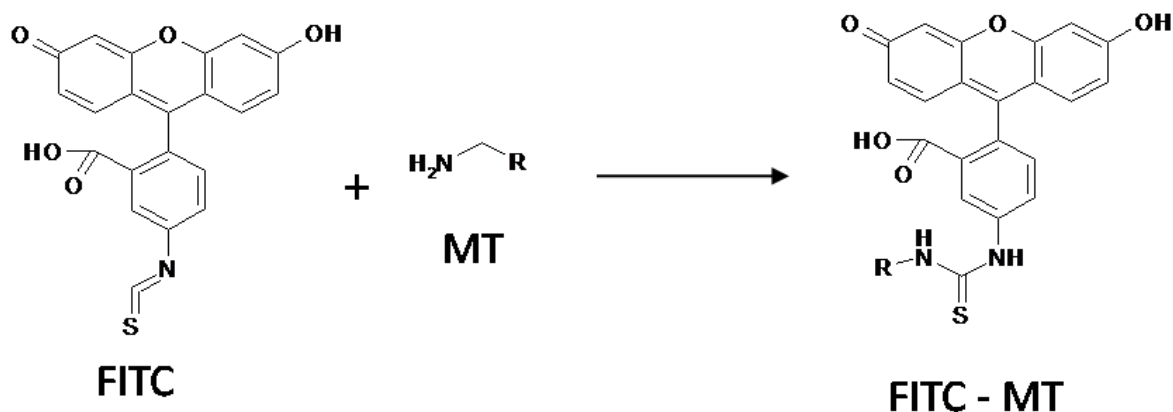
Fluorescenční detekce je citlivější než detekce absorpční v UV oblasti, limit detekce pro fluorescenci je o dva až čtyři řády nižší než pro UV (viz Tabulka 2). Proteiny samy o sobě nefluoreskují a proto je menší nevýhodou potřeba derivatizace vzorku, neboli obarvení vzorku fluorescenčním činidlem.

### 5.4.1 Schéma derivatizace

Derivatizace spočívá v navázání barvicího činidla na molekulu analytu, který sám o sobě není schopný vlastní fluorescence a detekuje se fluorescence barviva. Pro proteiny se nejčastěji používají isothiokyanáty a sukcinimidylestery.

Zde byl použit fluorescein isothiokyanát (FITC), který se navázal na molekulu MT pomocí koncové  $\text{NH}_2$  skupiny. Schéma reakce je na obrázku 10, R značí aminokyselinový řetězec MT. Reakce je velmi závislá na pH, protože aminoskupina analytu musí být deprotonována. Při derivatizaci N-koncových aminoskupin je vyžadováno pH zásadité, tedy alespoň 7,5 a vyšší.





Obrázek 10: Schéma derivatizace MT.

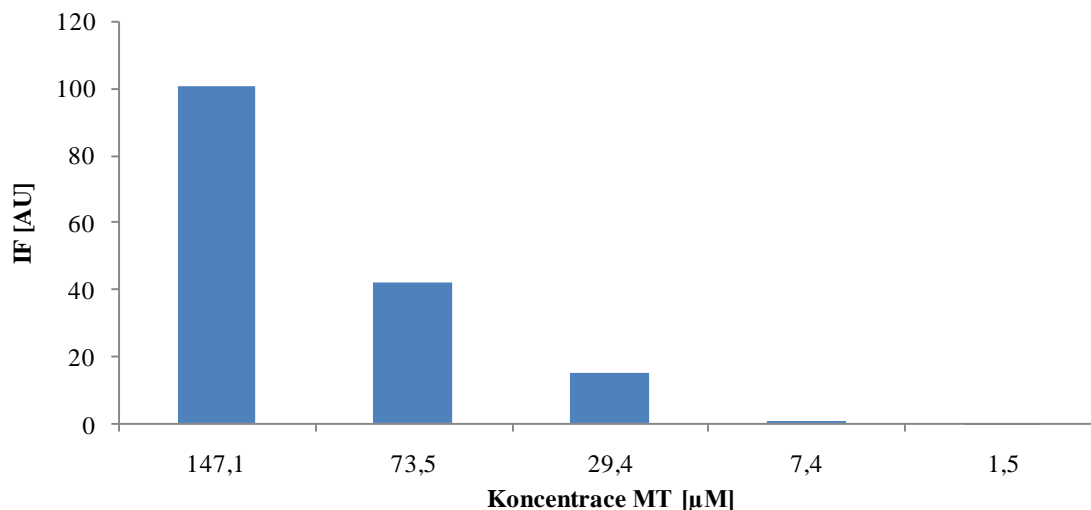
#### 5.4.2 Studium výtěžku derivatizační reakce

Vzhledem k tomu, že výtěžek derivatizační reakce je závislý na koncentraci analytu do ní vstupujícího, bylo nutné sestavit kalibrační závislost určující, jak nízké koncentrace MT lze derivatizovat. Pro sestavení kalibrační křivky byl použit roztok standardní isoformy MT-1 o koncentraci v rozsahu 0,01 – 1 mg/ml. Směs byla derivatizována pomocí FITC ( $c = 0,1$  mg/ml) a poté měřena. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10.

Pokud porovnáme rozsah koncentrací MT detekovatelných pomocí fluorescenční a absorpční detekce (viz Tabulka 7 a 8), zjistíme, že fluorescenční metoda je citlivější. Při měření absorpce v UV oblasti bylo obtížné kvantifikovat signál pro MT o koncentraci nižší než  $5 \mu\text{M}$  v případě směsného roztoku a nižší než  $2 \mu\text{M}$  v případě roztoků jednotlivých isoform. Při měření fluorescence byl signál pro MT detekován již při koncentraci  $1 \mu\text{M}$ . Koncentrace MT v biologických tekutinách je velice nízká, proto je potřeba dosáhnout extrémní detekční citlivosti. Obsah MT podle Brdičkovy reakce v krevním séru u pacientů trpících karcinomem prostaty se pohybuje v rozmezí  $1,5 - 2,5 \mu\text{M}$ , proto se fluorescenční detekce jeví jako vhodnější detekční technika pro analýzu MT.

Koncentrace MT [mg/ml]	Koncentrace MT [ $\mu\text{M}$ ]	Výška píku
1	147,06	101
0,5	73,53	42
0,2	29,41	15
0,05	7,35	1
0,01	1,47	0,25

Tabulka 10: Hodnoty pro roztok standardní isoformy MT-1.



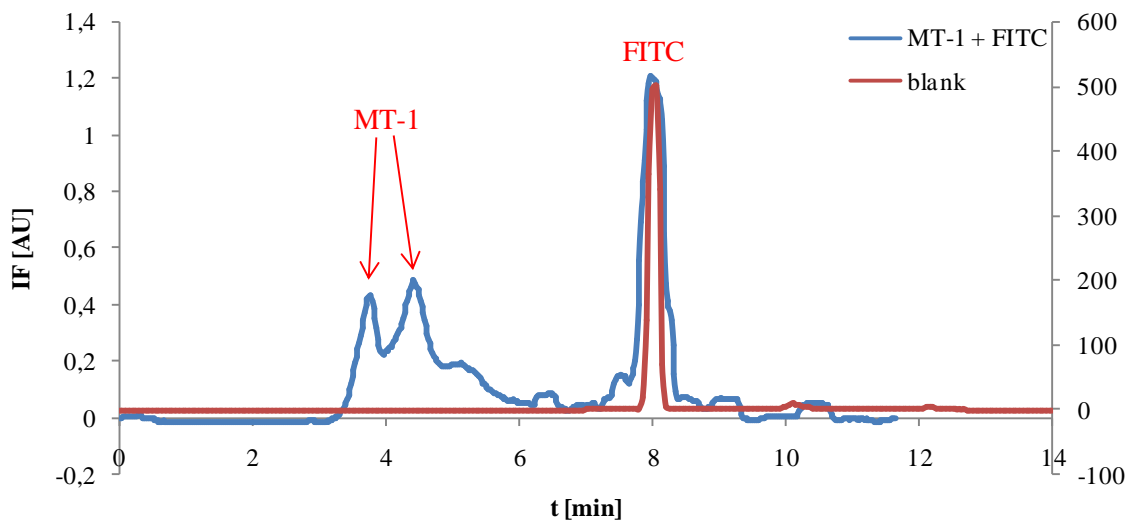
Graf 18: Kalibrační křivka derivatizační reakce mezi MT a FITC.

### 5.4.3 Vybrané elektroferogramy

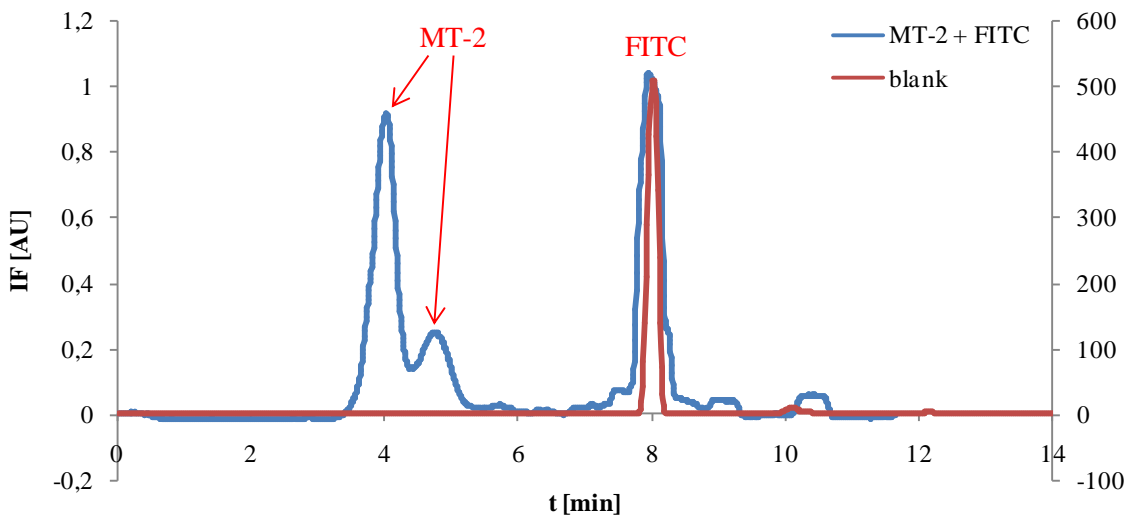
Pro měření byly použity různě koncentrované roztoky standardů MT-1 a MT-2, které byly v poměru 1:1 ředěny barvicím činidlem FITC o koncentraci 0,1 mg/ml. Takto vzniklé roztoky byly derivatizovány a poté analyzovány. Pro analýzu byl jako elektrolyt použit 300 mM borát, napětí 20 kV, kapilára 37/30 cm a ostatní podmínky zůstaly stejné jako v případě měření absorbance v UV oblasti.

Na grafech 19 – 22 jsou znázorněny elektroferogramy roztoků MT-1 a MT-2. Výsledné koncentrace roztoků jsou stejné ( $c = 0,01$  mg/ml), ale elektroferogramy se vzájemně odlišují, důvodem je různý způsob přípravy analyzovaného vzorku. V prvním případě (grafy 19 a 20) byly roztoky isoforem ředěny 300 mM borátem na koncentraci 1 mg/ml, poté byly smíchány v poměru 1:1 s FITC, derivatizovány a roztok byl ještě před analýzou ředěn 100x 300 mM borátem, tak byla získána koncentrace 0,01 mg/ml. V druhém případě (grafy 21 a 22) byly roztoky isoforem rozředěny na koncentraci 0,01 mg/ml a smíchány s FITC, derivatizovány a před analýzou ředěny nebyly.

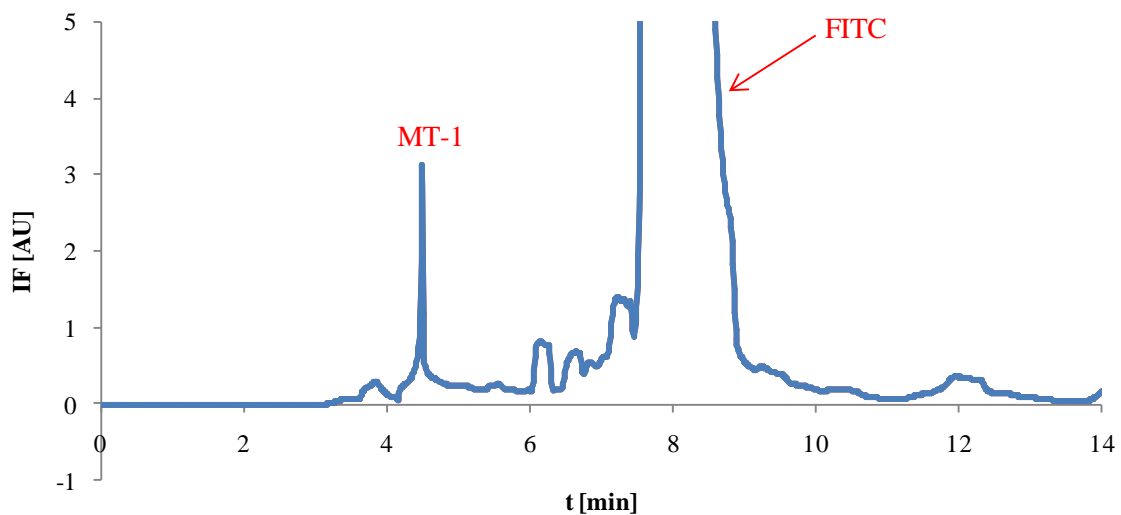
Jak je patrné z grafů, způsob přípravy má vliv na výsledné elektroferogramy. Blank je křivka odpovídající FITC bez přítomnosti MT.



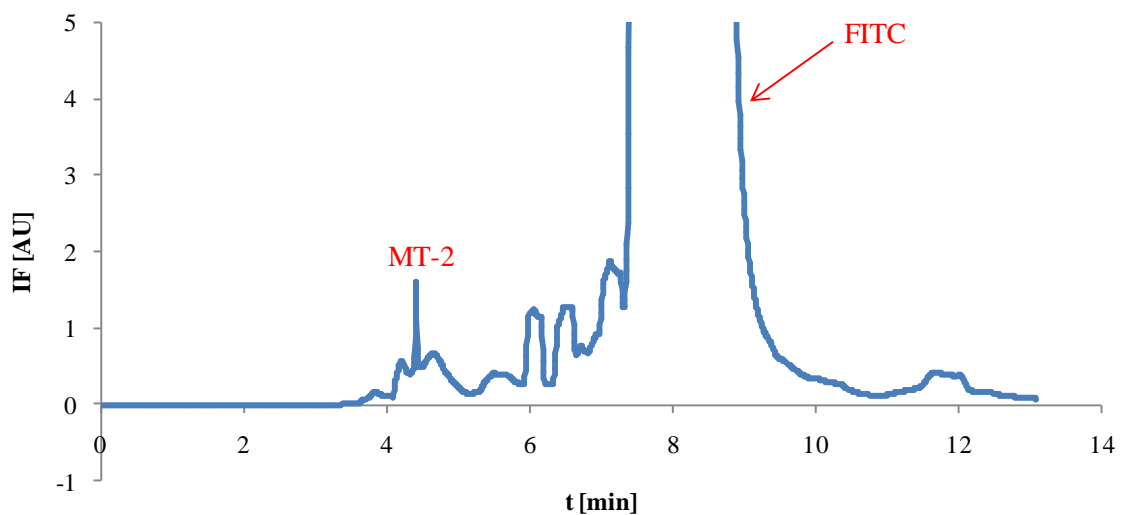
Graf 19: Analýza roztoku MT-1 ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ) + FITC ( $c = 0,1 \text{ mg/ml}$ ), před analýzou ředěno 100x 300 mM borátem.



Graf 20: Analýza roztoku MT-2 ( $c = 1 \text{ mg/ml}$ ) + FITC ( $c = 0,1 \text{ mg/ml}$ ), před analýzou ředěno 100x 300 mM borátem.



Graf 21: Analýza roztoku MT-1 ( $c = 0,01$  mg/ml) + FITC ( $c = 0,1$  mg/ml), před analýzou neředěno.



Graf 22: Analýza roztoku MT-2 ( $c = 0,01$  mg/ml) + FITC ( $c = 0,1$  mg/ml), před analýzou neředěno.

## 6 Závěr

Rakovina patří mezi civilizační choroby a ohrožuje mnoho lidí po celém světě. Není divu, že se vědci soustředí na vývoj nových postupů a objev nových markerů. Jedním z nich je protein metalothionein a kapilární elektroforéza je vhodná metoda pro jeho separaci.

Mobilita částic je silně závislá na složení základního elektrolytu a jeho pH. Během analýz bylo zjištěno, že vyšší pH u borátového elektrolytu je optimálnější než pH nižší. Při pH 9,5 došlo ke zpomalení migrujících částic (ionty molekuly MT), rozšíření píků a separace začala probíhat pomaleji.

Kapilární elektroforéza se vyznačuje možností aplikace vysokého napětí, až do 30 kV, procházející proud bývá v rozmezí od 200-300 mA. Během měření však bylo zjištěno, že nižší napětí je více adekvátní pro výslednou separaci. Hodnota aplikovaného napětí taktéž ovlivňuje rychlost separace jednotlivých látek, napětí 10 kV zpomalilo separaci a rychlost pohybu jednotlivých iontů molekuly MT.

Během analýzy isoformem MT bylo dosaženo nejlepších výsledků v borátovém elektrolytu o koncentraci 20 mM nebo 300 mM a pH 9,5. Aplikované napětí 10 kV a délka kapiláry 47/40 cm zajistili dostatek času pro separaci. Byl použit také fluorescenční detektor a optimální podmínky se lehce lišily, kapilára 37/30 cm a aplikované napětí 20 kV. Při separaci biologických vzorků bylo zvoleno napětí 20 kV.

Dále bylo zjištěno, že denaturace vzorku má na výslednou separaci velký dopad. Separace isoformem metalothioneinu v denaturovaných vzorcích může být spolehlivě provedena pouze v relativně vysokých koncentracích, a to 1 mg/ml a výše. V nízkých koncentracích je signál elektroferogramu deformován a není možné určit MT.

Je všeobecně známo, že v biologických tekutinách se metalothionein vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích, pomocí Brdičkovy reakce byly zjištěny v krevním séru koncentrace v rozmezí 1,5 – 2,5  $\mu\text{M}$ , při separaci kapilárou byly hodnoty přibližně 10x vyšší než z elektrochemické metody. Bohužel nebylo k dispozici krevní sérum zdravého jedince a nebylo možné naměřené výsledky porovnat s obsahem MT zdravého člověka.

Vyhledávání v bioinformatických databázích umožňuje zhodnocení látek po biochemické stránce a jsou vhodným nástrojem pro studium elektroforetických vlastností proteinů. Usnadňují optimalizaci CE metody a minimalizují počet potřebných experimentů.

Analýza isoform metalothioneinu na čipu nebyla provedena. Čipová elektroforéza je pro separaci isoform metalthioneinu nevhodná, jednak z důvodu krátkého separačního kanálu a jednak z důvodu molekulové hmotnosti MT.

## Seznam literatury

- [1] *World Health Organization* [online]. únor 2009 [cit. 2010-10-23]. Cancer. Dostupné z WWW: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>.
- [2] *World Health Organization/Europe* [online]. 2010 [cit. 2010-10-23]. Cancer. Dostupné z WWW: <<http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/diseases-and-conditions/cancer>>.
- [3] PETRUŽELKA, L.; KONOPÁSEK, B. *Klinická onkologie*. Praha : Karolinum, 2003. 274 s. ISBN 80-246-0395-0.
- [4] REJTHAR, A.; VOJTĚŠEK, B. *Obecná patologie nádorového růstu*. Praha : Grada Publishing, spol. s.r.o., 2002. 208 s. ISBN 80-247-0238-X.
- [5] DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. *Cancer : Principles & Practice of Oncology*. Philadelphia : J. B. Lippincott Company, 1989. 2489 s. ISBN 0-397-50840-9.
- [6] DUŠEK, L.; MUŽÍK, J.; KUBÁSEK, M.; KOPTÍKOVÁ, J.; ŽALOUDÍK, J.; VYZULA, R. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Verze 7.0 (2007). Masarykova univerzita, 2005 [cit. 2010-11-04]. Epidemiologické analýzy. Dostupné z WWW: <<http://www.svod.cz/?sec=analyzy>>. ISSN 1802–8861.
- [7] KLENER, P. *Klinická onkologie*. Praha : Galén, 2002. 686 s. ISBN 80-7262-151-3.
- [8] ŠKUTKOVÁ, H. *Fylogenetická analýza v proteomice*. Přednáška z předmětu Bioinformatika, obor Biomedicínská technika a bioinformatika, Vysoké učení technické v Brně. Brno 2010.
- [9] DONOHUE, M. J.; SATTERFIELD, M. B.; DALLUGE, J. J.; WELCH, M. J.; GIRARD, J. E.; BUNK, D. M. Capillary electrophoresis for the investigation of prostate-specific antigen heterogeneity. *Analytical Biochemistry*. 2005, 339, s. 318-327.
- [10] YOU, J.; COZZI, P.; WALSH, B.; WILLCOX, M.; KEARSLEY, J.; RUSSELL, P.; LI, Y. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2010, 73, s. 10-22.
- [11] JAMASPISHVILI, T.; KRAL, M.; KHOMERIKI, I.; STUDENT, V.; KOLAR, Z.; BOUCHAL, J. Urine markers in monitoring for prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2010, 13, s. 12-19.
- [12] TRICOLI, J.V.; SCHOENFELDT, M.; CONLEY, B.A. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clinical Cancer Research*. 2004, 10, s. 3943–3953.

- [13] ECKSCHLAGER, T.; ADAM, V.; HRABETA, J.; FIGOVA, K.; KIZEK, R. Metallothioneins and Cancer. *Current Protein and Peptide Science*. 2009, 10, s. 360-375.
- [14] MARGOSHES, M.; VALLEE, B. L. A Cadmium Protein from Equine Kidney Cortex. *Journal of the American Chemical Society*. 1957, 79, s. 4813-4814.
- [15] FABRIK, I.; KUKAČKA, J.; PRŮŠA, R.; ECKSCHLAGER, T.; ADAM, V.; KIZEK, R. *Stapro* [online]. únor 2008 [cit. 2010-11-27]. Metallothionein a jeho klinický význam. Dostupné z WWW: <<http://www.stapro.cz/bullfons/22008/lab03.pdf>>.
- [16] VODIČKOVÁ, H.; PACÁKOVÁ, V.; ŠESTÁKOVÁ, I.; MADER, P. Analytické metody pro stanovení metallothioneinů. *Chemické listy*. 2001, 95, s. 477-483.
- [17] NATH, R.; KAMBADUR, R.; GULATI, S.; PALIWAL, V. K.; SHARMA, M. Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1988, 27 (1), s. 41-85.
- [18] ZENG, J.; VALLEE, B. L.; KAGI, Jhr. Zinc transfer from transcription factor-iii fingers to thionein clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 1991, 88 (22), s. 9984-9988.
- [19] BEKLOVA, M.; FABRIK, I.; SOBROVA, P.; ADAM, V.; PIKULA, J.; KIZEK, R. Electrochemical determination of metallothionein in the domestic fowl. *Nat. Croat.* 31.12.2008, 17 (4), s. 283-292.
- [20] *The Universal Protein Resource (UniProt)* [databáze online]. 2011 [cit. 2011-04-19]. Align. Dostupné z WWW: <<http://www.uniprot.org/align/201104191GIBMEMJUX>>.
- [21] PETRLOVÁ, J.; SVOBODA, M.; BLAŠTÍK, O.; HORÁKOVÁ, Z.; BINKOVÁ, Z.; KRÍŽKOVÁ, S.; ADAM, V.; TRNKOVÁ, L.; KIZEK, R. *Linkos* [online]. 11.05.2006, 13.05.2009 [cit. 2010-12-04]. Databáze tuzemských onkologických konferenčních abstrakt, Přehled analytických metod pro stanovení metallothioneinu v tkáních. Dostupné z WWW: <[http://www.linkos.cz/odbornici/kongresy/abstrakta\\_vypis.php?ID=1182](http://www.linkos.cz/odbornici/kongresy/abstrakta_vypis.php?ID=1182)>.
- [22] HAYES, R. A.; REGONDI, S.; WINTER, M. J.; BUTLER, P. J.; AGRADI, E.; TAYLOR, E. W.; CHIPMAN, J. K. Cloning of a chub metallothionein cDNA and development of competitive RT-PCR of chub metallothionein mRNA as a potential biomarker of heavy metal exposure. *Marine Environmental Research*. 2004, 58 (2-5), s. 665-669.
- [23] RASPOR, B. Elucidation of the mechanism of the Brdička reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2001, 503 (1-2), s. 159-162.



- [24] TRNKOVÁ, L.; KIZEK, R.; VACEK, J. Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. *Bioelectrochemistry*. 2002, 56 (1-2), s. 57-61.
- [25] CHASSAIGNE, H.; LOBINSKI, R. Characterization of metallothionein isoforms by reversed-phase high-performance liquid chromatography with on-line post-column acidification and electrospray mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1998, 829 (1-2), s. 127-136.
- [26] LAUER, H. H.; ROZING, G. P. *High Performance Capillary Electrophoresis*. Germany : Agilent Technologies, 2010. 174 s. 5990-3777EN.
- [27] EWING, A. G.; WALLINGFORD, R. A.; OLEFIROWICZ, T. M. Capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1989, 61 (4), s. 292A-303A.
- [28] DABRIO, M.; RODRÍGUEZ, A. R.; BORDIN, G.; BEBIANNO, M. J.; DE LEY, M.; ŠESTÁKOVÁ, I.; VAŠÁK, M.; NORDBERG, M. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2002, 88, s. 123–134.
- [29] RICHARDS, M. P.; BEATTIE, J. H. Comparison of different techniques for the analysis of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical applications*. 1995, 669, s. 27-37.
- [30] VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*. 1997, 44 (1), s. 69-84.
- [31] WU, D.; QIN, J.; LIN, B. Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1184, s. 542–559.
- [32] CHEN, G.; LIN, Y.; WANG, J. Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*. 2006, 68, s. 497–503.
- [33] FENG, X.; DU, W.; LUO, Q.; LIU, B. Microfluidic chip: Next-generation platform for systems biology. *Analytica Chimica Acta*. 2009, 650, s. 83–97.
- [34] BEATTIE, J. H. Strategies for the qualitative and quantitative analysis of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis. *Talanta*. 1998, 46, s. 255–270.
- [35] DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*. 1998, 70, s. 4974-4984.

- [36] HOFMANN, O.; CHE, D. P.; CRUICKSHANK, K. A.; MULLER, U. R. Adaptation of capillary isoelectric focusing to microchannels on a glass chip. *Analytical Chemistry*. 1999, 71, s. 678–686.
- [37] THROCKMORTON, D. J.; SHEPODD, T. J.; SINGH, A. K. Electrochromatography in microchips: reversed-phase separation of peptides and amino acids using photopatterned rigid polymer monoliths. *Analytical Chemistry*. 2002, 74, s. 784–789.
- [38] KRŮŽKOVÁ, S.; ADAM, V.; KIZEK, R. Study of metallothionein oxidation by using of chip CE. *Electrophoresis*. 2009, 30, s. 4029-4033.
- [39] RICHARDS, M. P.; BEATTIE, J. H. Characterization of metallothionein isoforms, Comparison of capillary zone electrophoresis with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1993, 648, s. 459-468.
- [40] RICHARDS, M. P. Application of a polyamine-coated capillary to the separation of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 1994, 657, s. 345-355.
- [41] VIRTANEN, V.; BORDIN, G.; RODRIGUEZ, A. R. Separation of metallothionein isoforms with capillary zone electrophoresis using an uncoated capillary column, Effects of pH, temperature, voltage, buffer concentration and buffer composition. *Journal of Chromatography A*. 1996, 734, s. 391-400.
- [42] VIRTANEN, V.; BORDIN, G. Isoform separation of metallothioneins by capillary zone electrophoresis with Tris-tricine buffer in the presence or absence of methanol. *Analytica Chimica Acta*. 1998, 372, s. 231-239.
- [43] VIRTANEN, V.; BORDIN, G. Tricine buffer for metallothionein isoform separation by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. 1999, 402, s. 59–66.
- [44] MINAMI, T.; YOSHITA, Ch.; TANAKA, M.; KUBO, K.; OKABE, N.; OKAZAKI, Y. Separation of metallothionein isoforms of mouse liver cytosol by capillary zone electrophoresis. *Talanta*. 1998, 46, s. 347–354.
- [45] KUBO, K.; SAKITA, Y.; OKAZAKI, Y.; OTAKI, N.; KIMURA, M.; MINAMI, T. Identification of metallothionein isoforms on capillary zone electrophoresis by adding anti-metallothionein antibody. *Journal of Chromatography B*. 1999, 736, s. 185–190.
- [46] KUBO, K.; SAKITA, Y.; OTAKI, N.; KIMURA, M.; MINAMI, T. Rapid identification of metallothionein isoforms in liver cytosol fraction by capillary zone electrophoresis using EDTA. *Journal of Chromatography B*. 2000, 742, s. 193–198.
- [47] MINAMI, T.; KUBO, K.; ICHIDA, S. Determination of metallothionein-1 / metallothionein-2 ratios in the mouse liver and pancreas by capillary zone electrophoresis

using a polyacrylamide-coated capillary at neutral pH. *Journal of Chromatography B*. 2002, 779, s. 211–219.

[48] MINAMI, T.; ICHIDA, S.; KUBO, K. Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B*. 2002, 781, s. 303–311.

[49] WILHELMSSEN, T. W.; HANSEN, B. H.; HOLTEN, V.; OLSVIK, P. A.; ANDERSEN, R. A. Improved separation of metallothionein isoforms by the presence of cyclodextrin in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1051, s. 237–245.

[50] PROVAZNÍK, I. *Zarovňávání více sekvencí*. Přednáška z předmětu Bioinformatika, obor Biomedicínská technika a bioinformatika, Vysoké učení technické v Brně. Brno 2010.

[51] *The Universal Protein Resource (UniProt)* [online]. 2011 [cit. 2011-04-19]. Align. Dostupné z WWW: <<http://www.uniprot.org/align/201104192BU7QIZCU1>>.

[52] *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2011 [cit. 2011-04-19]. Gene, Genes and mapped phenotypes. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4494>>.

## Seznam zkratek

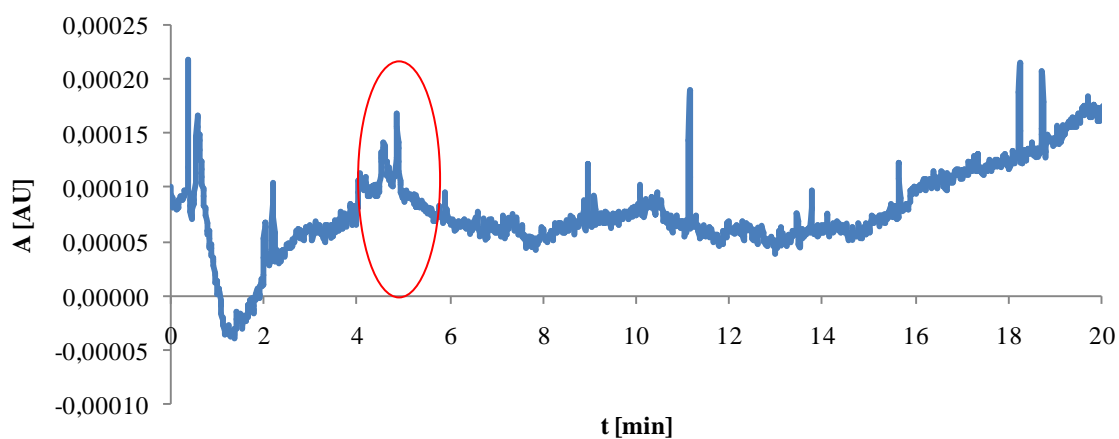
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PSA	prostatický specifický antigen
BMI	body mass index
MT	metallothionein
MRE	metal responsive element
MTF-1	metal-regulatory transcription factor
MTI	inhibitor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
MT-1 – MT-4	isoformy metalothioneinu
AAS	atomová absorpční spektrometrie
ICP	indukčně vázaná plazma
MS	hmotnostní spektrometrie
GPC	grafitová kyveta
SH	sulfhdrylová skupina
UV	ultrafialové spektrum
RIA	radioimunoanalýza
FC	průtoková cytometrie
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assai
FITC	fluorescein isothiokyanát
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT	reverzní transkriptáza
DPASV	anodická rozpouštěcí voltametrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RP – HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v reverzní fázi
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
VIS	viditelné spektrum
LIF	laserem indukovaná fluorescence
MCE	mikrofluidní kapilární elektroforéza na čipu

MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
IEF	isoelektrická fokusace
PDMS	polydimethylsiloxan
PMMA	polymethylmethakrylát
ECD	elektrochemická detekce
CGE	kapilární gelová elektroforéza
id	vnitřní průměr kapiláry
tricine	<i>N</i> -tris(hydroxymethyl)methylglycin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HEPES	kyselina <i>N</i> -2-hydroxy ethylpiperazin- <i>N'</i> -ethansulfonová
PIXE	protonem indukovaná emise záření X
ID	isotopové zředování

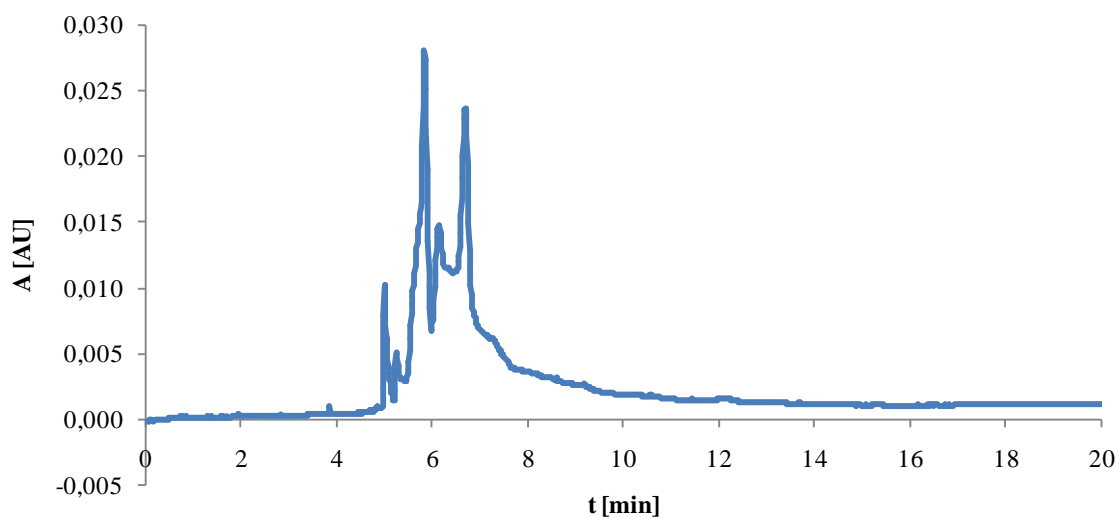
## Seznam příloh

Příloha 1: Optimalizace CE metody – separace standardů.....	61
---	----

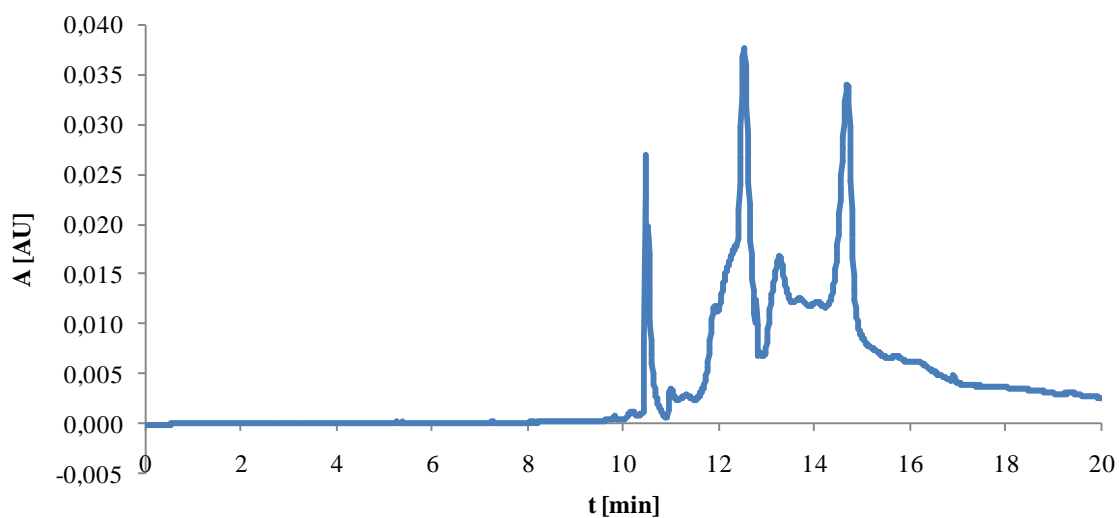
## Příloha 1: Optimalizace CE metody - separace standardů



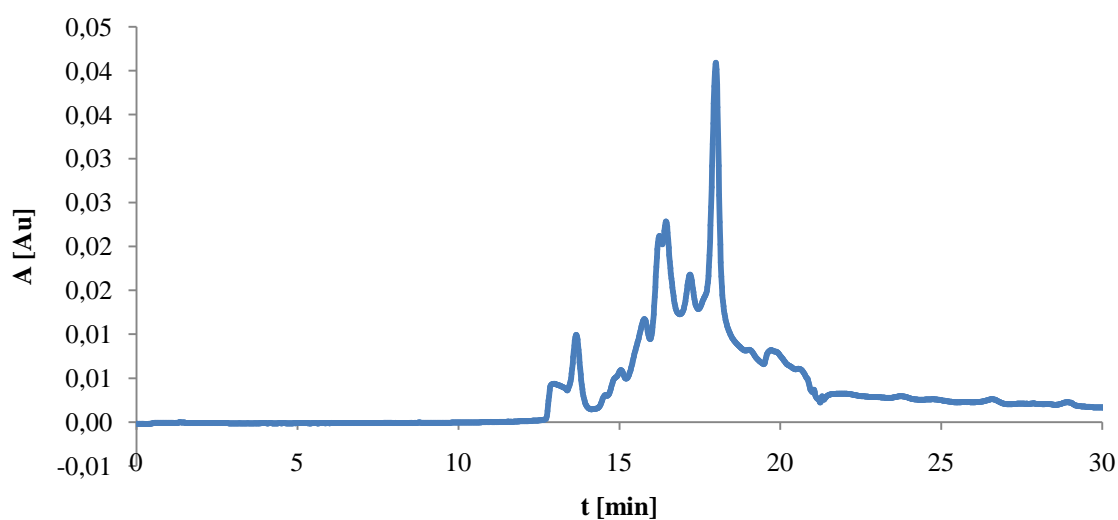
Graf 23: Elektroferogram 1. Směs MT-1 a MT-2 rozpuštěna ve vodě, **20mM fosfát, pH 7**, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50  $\mu$ m, 20 kV.



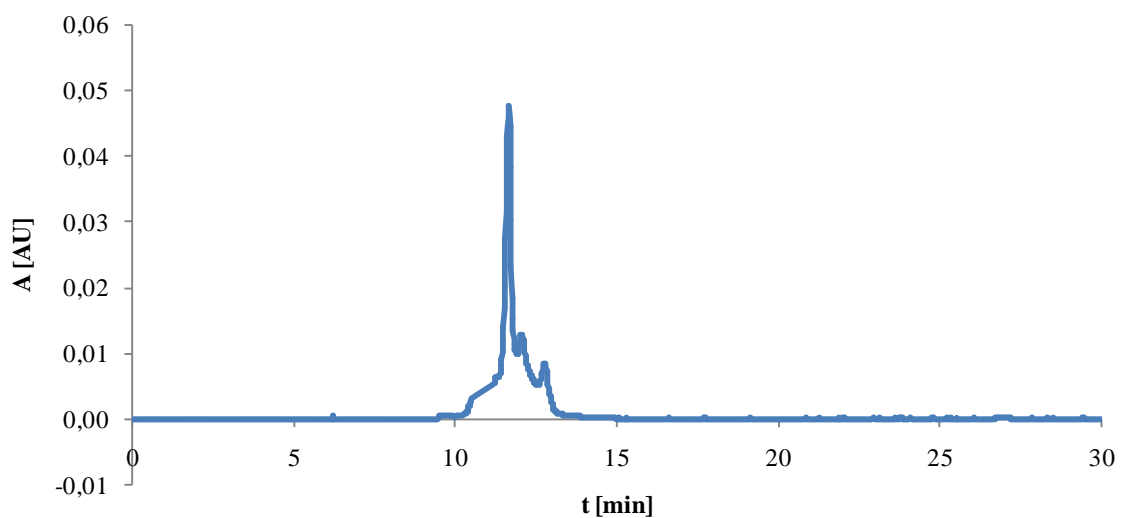
Graf 24: Elektroferogram 2. Směs MT-1 a MT-2 rozpuštěna ve vodě, **300mM borát, pH 7,7**, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50  $\mu$ m, 20 kV.



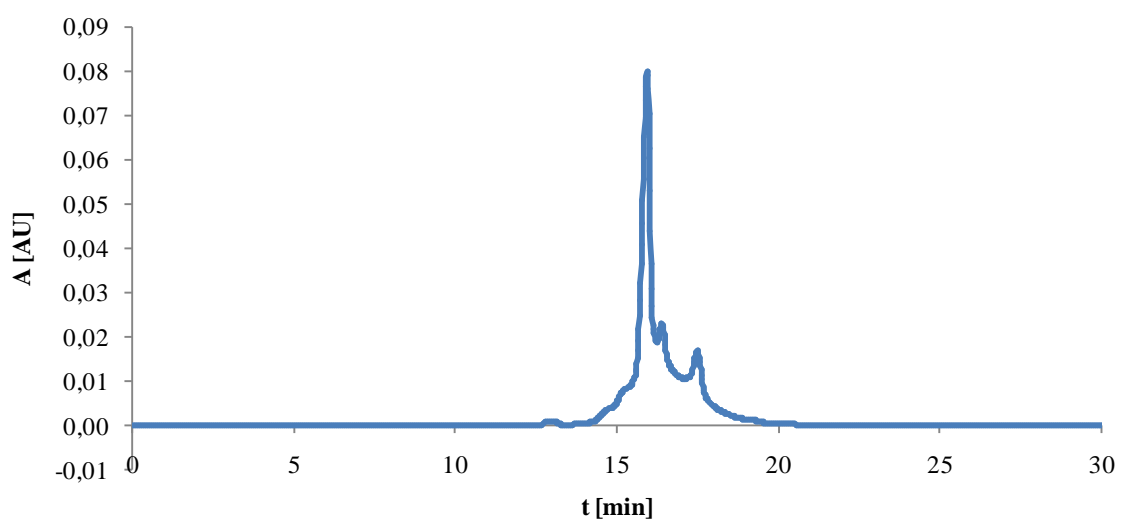
Graf 25: Elektroferogram 3. Směs MT-1 a MT-2 rozpuštěna ve vodě, 300mM borát, pH 7,7, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50  $\mu$ m, 10 kV.



Graf 26: Elektroferogram 4. Směs MT-1 a MT-2 rozpuštěna ve vodě, 300mM borát, pH 8,7, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50  $\mu$ m, 10 kV.

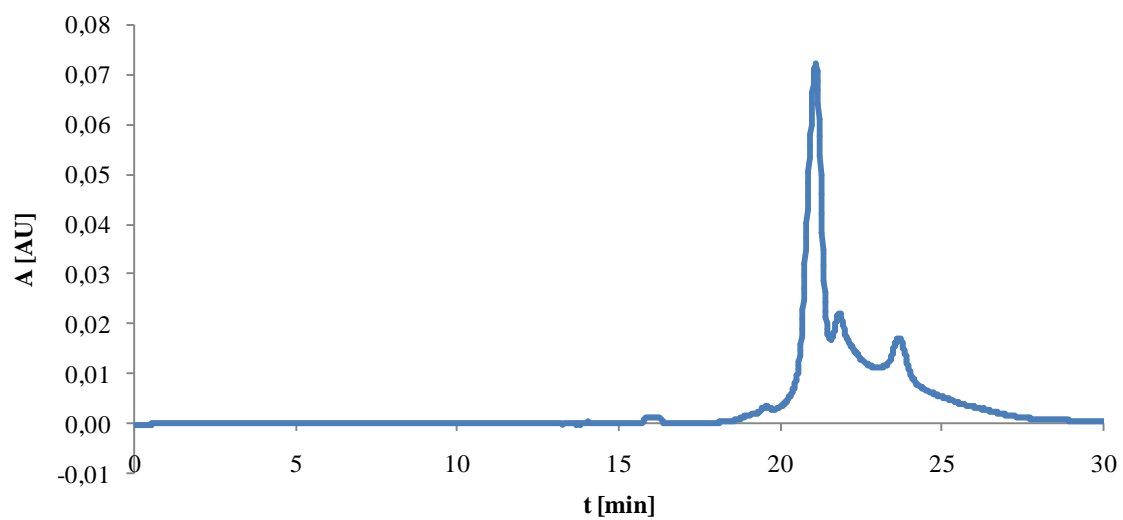


Graf 27: Elektroferogram 5. Isoforma MT-1 rozpuštená ve vodě, 300mM borát, pH 7,7, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50  $\mu$ m, 10 kV.



Graf 28: Elektroferogram 6. Isoforma MT-1 rozpuštená ve vodě, 300mM borát, pH 8,7, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50  $\mu$ m, 10 kV.





Graf 29: Elektroferogram 7. Isoforma MT-1 rozpuštená ve vodě, 300mM borát, pH 9,5, 18 s (3,4 kPa), 214 nm, 47/40 cm, 50  $\mu$ m, 10 kV.