

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2010**

**Bc. Jiří Řehulka**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Proteomické profilování nádorové buněčné linie CEM  
ošetřené triterpenoidními látkami s protinádorovou  
aktivitou**

Diplomová práce

**Bc. Jiří Řehulka**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2010**

**Vedoucí práce: MUDr. Petr Džubák, Ph.D.**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a uvádím veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne 11. 5. 2010

.....

## Poděkování

Děkuji MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D. za odborné vedení a věnovaný čas. Rád bych poděkoval také Mgr. Dušanu Holubovi, Mgr. Tomáši Oždianovi, Bc. Anně Janošťákové, Mgr. Soně Šálkové, Kateřině Mikové, Mgr. Lence Radové, Ph.D. a Doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. Zvláštní poděkování patří Msc. Madhu Kollareddymu a Mgr. Ivo Frydrychovi, Ph.D.

Tato práce byla řešena v Laboratoři experimentální medicíny při Dětské klinice, LF UP v Olomouci v rámci projektu 301/09/P433 GAČR s názvem Deriváty kyseliny betulinové, identifikace mechanismů protinádorového účinku pomocí expresního profilování.

## Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřena na identifikaci molekulárních cílů potenciálních protinádorových léčiv metodami expresní proteomiky. Kyselina betulinová je triterpenoidní látka s cytotoxickými účinky namířenými specificky proti nádorovým buňkám. Některé její uměle připravené deriváty vykazují silnější cytotoxické účinky a schopnost blokovat buněčný cyklus. Teoretická část této práce popisuje základní mechanismy apoptózy i buněčného cyklu. Shrnuje také přístupy expresního profilování a hmotnostní spektrometrie proteinů. V experimentální části práce jsem studoval aktivaci kaspáz 3 a 7 v reálném čase vybranými deriváty kyseliny betulinové. Z naměřených dat byl stanoven optimální čas pro expozici buněčné linie T-lymfoblastické leukemie testovanému derivátu JS3.786. Relativní kvantifikace proteinů ošetřené a kontrolní populace buněk byla provedena metodou metabolického značení s následnou hmotnostně spektrometrickou analýzou. V populaci buněk ošetřených J3.786 byla nepřímo zjištěna aktivace proteinu „BH3 interacting domain death agonist“, došlo také ke zvýšení exprese podjednotky kofaktoru a chaperonu tubulinu.

## Summary

This study used an expression proteomics approach to identify molecular targets of potential anticancer drugs. Betulinic acid is a cytotoxic compound with the specific effect to tumor cells and some of its derivatives block the cell cycle progression. First part of this thesis contains basic information about the apoptosis and the cell cycle as well as about the proteomics and the mass spectrometry. In the experimental part of my thesis I studied caspase 3 and caspase 7 activation by tested compounds to determine the period of apoptosis induction. I used metabolic labeling combined with mass spectrometry to quantify changes in protein levels between cells treated by JS3.786 derivative and the control cells. JS3.786 treatment caused BH3 interacting domain death agonist activation and increase in tubulin chaperone cofactor A, chain A expression.

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	7
<b>2. Současný stav řešené problematiky</b> .....	8
2.1 Apoptóza .....	8
2.2 Apoptóza a buněčný cyklus .....	14
2.3 Buněčný cyklus .....	14
2.4 Kyselina betulínová.....	16
2.5 Molekulární cíle biologicky aktivních látek.....	16
2.6 Proteomika .....	17
<b>3. Cíle práce</b> .....	22
<b>4. Materiál a metody</b> .....	23
<b>5. Výsledky</b> .....	31
<b>6. Diskuze</b> .....	40
<b>7. Závěr</b> .....	43
<b>8. Literatura</b> .....	44
<b>9. Seznam použitých zkratk a symbolů</b> .....	50

## 1. Úvod

Náhodné testování cytotoxicity rostlinných extraktů je možným přístupem k hledání nových biologicky aktivních sloučenin. Jednou z takto objevených látek s protinádorovou aktivitou je kyselina betulinová. Dr. Šarkem a jeho skupinou byla záměnou různých substituentů připravena celá řada jejich účinnějších derivátů. U některých nově syntetizovaných derivátů byla prokázána nejen schopnost indukce apoptózy při velmi nízkých koncentracích, ale také narušení buněčného cyklu nádorových buněk. Součástí dalšího výzkumu je přesné popsání mechanismu, jakým studovaná látka interaguje s nádorovou buňkou a indukuje její apoptózu. Hlavním cílem této práce bylo zjistit změny genové exprese na proteinové úrovni po ovlivnění derivátem JS3.786, který podle předchozího výzkumu blokuje růst buňky v G2/M fázi buněčného cyklu. Vzhledem ke složitosti buněčné signalizace a amplifikaci pro-apoptotického stimulu byly experimenty zaměřeny na časnou fázi mezi prvotní indukci apoptózy a úplnou aktivaci kaspázové kaskády. Aktivita kaspáz 3 a 7 byla analyzována u šesti derivátů kyseliny betulinové JS8, JS3.695, JS3.698, JS3.723, JS3.768, JS3.786.

## 2. Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Apoptóza

Apoptóza nebo-li programovaná buněčná smrt, je proces udržující homeostázu buněčných populací v tkáních. Uplatňuje se také během embryonálního vývoje a v obranných mechanismech, kdy jsou jejím prostřednictvím odstraňovány poškozené buňky. Nesprávný průběh apoptózy je důležitým faktorem při vývoji chorob člověka. Její nadměrná aktivace je příčinou neurodegenerativních chorob a ischemického poškození. Naopak její patologická inhibice je typická pro mnoho typů nádorů a autoimunitních poruch. Na rozdíl od dalšího typu buněčné smrti, nekrózy, probíhá apoptóza vysoce koordinovaným, regulovaným a energeticky závislým mechanismem. Apoptotické buňky vykazují oproti buňkám normálním typické morfologické a biochemické změny. Dochází ke smrštění buněk a zahušťování jejich obsahu, kondenzaci chromatinu, tvoří se apoptotická tělíška, avšak integrita membrán zůstává zachována (Rastogi *et al.*, 2009). Na molekulární úrovni dochází k degradaci DNA a štěpení cytoskeletálních i jaderných proteinů kaspázami. Apoptóza může být indukována vnější dráhou aktivací receptorů, vnitřní (mitochondriální) dráhou nebo prostřednictvím T-lymfocytů perforin/granzymovou dráhou, přičemž se tyto dráhy můžou vzájemně podporovat (Elmore, 2007).

#### 2.1.1 Vnější dráha

Apoptóza iniciovaná vnější dráhou probíhá přes transmembránové receptory patřící do rodiny TNF (tumor necrosis factor) receptorů. Jejich společným znakem je extracelulární doména bohatá na cystein a cytoplazmatická doména složená z 80 aminokyselin tzv. death domain. Tato doména je důležitá pro přenos vnějšího signálu do nitrobuněčných signálních drah. Mezi nejznámější ligandy a jejich receptory patří FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3 a Apo2L/DR4. Signální dráha zahrnuje dvě hlavní skupiny adaptorových proteinů: TRAF (TNF receptor -associated factor) a DD (death domain) proteiny. Signalizace je velmi rychlá a specifická. Po navázání Fas ligandu na Fas receptor dochází k asociaci adaptorových proteinů TRADD a FADD s prokaspázou-8. Jejich spojením vzniká death-inducing signaling complex (DISC) a prokaspáza-8 se autokatalyticky aktivuje. Aktivní kaspáza 8 spouští výkonnou část apoptózy, kterou zajišťují efektorové kaspázy-3, -6, -7 pro vnitřní dráhu i pro perforin/granzym B dráhu společně (Locksley *et al.*, 2001; Elmore, 2007).

### 2.1.2 Perforin/granzymová dráha

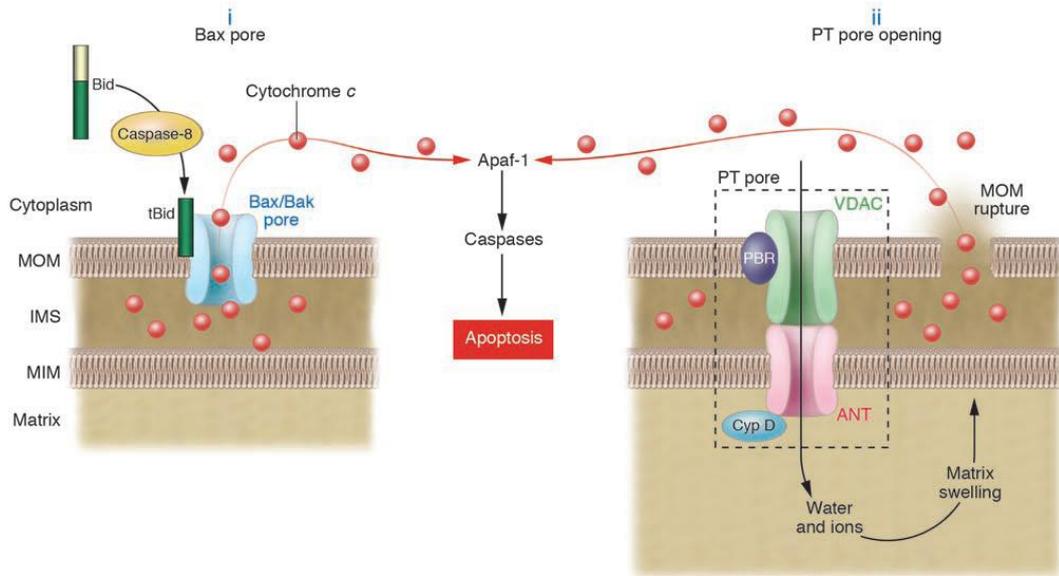
Perforin/granzymová dráha je zvláštní dráha, kterou využívají cytotoxické T-lymfocyty k navození apoptózy cílových buněk. Perforiny a serinové proteázy granzymy jsou akumulovány v cytotoxických granulích cytotoxických T-lymfocytů a NK buněk. Po rozpoznání cílových buněk jsou cytotoxická granula uvolněna do synapse s cílovou buňkou. V membráně cílových buněk jsou perforinem vytvořeny póry, kterými do cytosolu prochází cytotoxická granula. Uvolnění granzymu B aktivuje nejen prokaspázy-10, -3 a -7, ale i Bid, který spouští mitochondriální dráhu apoptózy. Granzym a aktivuje na kaspázách nezávislou dráhu vedoucí k degradaci DNA a chromatinové struktury (Cullen *et al.*, 2010).

### 2.1.3 Vnitřní (mitochondriální) dráha

Spuštění vnitřní apoptotické dráhy vede ke změnám vnitřní mitochondriální membrány, ztrátě membránového potenciálu a uvolnění dvou hlavních skupin pro-apoptotických proteinů z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytosolu. Do první skupiny se řadí cytochrom c, který aktivuje na kaspázách závislou mitochondriální dráhu, a také Smac/DIABLO a Omi/HtrA2, které působí jako antagonisté IAP proteinů. Cytochrom c vytváří za účasti dATP komplex s Apaf-1 a prokaspázou-9 tzv. apoptozom, ve kterém je aktivována kaspáza-9. Druhá skupina pro-apoptotických proteinů AIF, endonukleáza G a CAD je během apoptózy translokována do jádra, kde způsobuje fragmentaci DNA a kondenzaci chromatinu. Vnitřní dráha může být spuštěna řadou stimulů např. toxiny, hypoxií, volnými radikály, hypertermií, radiací, virovou infekcí nebo naopak v důsledku nedostatku růstových faktorů, hormonů a cytokinů (Elmore, 2007).

#### Mechanismus permeabilizace mitochondriální membrány

Existují dva modely vysvětlující permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. První předpokládá regulaci permeabilizace PT póry, ve druhém modelu mohou proteiny bcl2 rodiny zprostředkovat nebo naopak bránit permeabilizaci mitochondriální membrány (Bouchier *et al.*, 2005).



Obr. 1: Schéma vzniku bax póru a PT póru. MOM- vnější mitochondriální membrána, IMS- mezimembránový prostor, MIM-vnitřní mitochondriální membrána (Bouchier *et al.*, 2005)

### Permeability transition

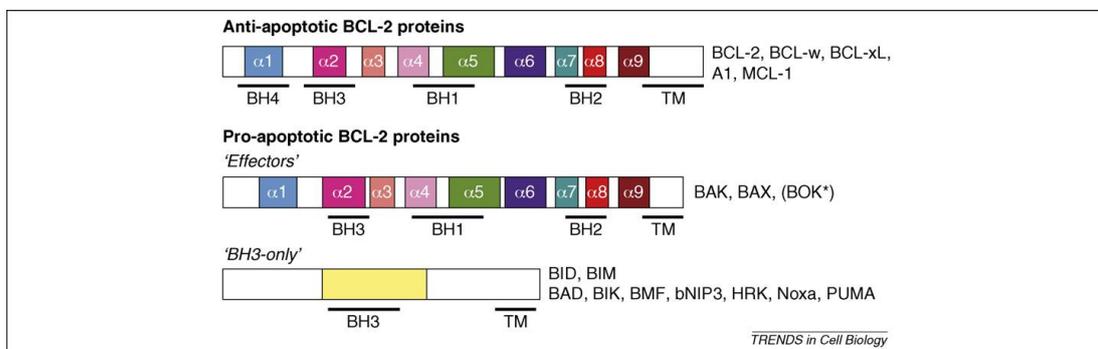
První model je založen na jevu známém jako permeability transition (PT). Dynamika tvorby PT je zakončena vytvořením proteinového komplexu spojujícího prostor mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou. Komplex je tvořen VDAC (voltage dependent anion channel) ve vnější mitochondriální membráně, cylofilinem D a adenin nukleotid translokásou (ANT) ( Bouchier *et al.*, 2005). Tvorba PTP může být indukována přebytkem  $Ca^{2+}$  nebo reaktivními kyslíkovými radikály (Vercesi *et al.*, 2006). Jeho otevření vede ke ztrátě membránového potenciálu mitochondrií a roztržení mitochondriální membrány následkem neregulovaného příjmu tekutin (Tsujiimoto *et Shimizu*, 2007).

### Permeabilizace zprostředkovaná pro-apoptotickými členy Bcl-2 rodiny

Ve zdravých buňkách se nachází Bax (Bcl-2 associated x protein) v cytosolu jako monomer nebo volně na membránách. Bak (Bc-l2 antagonist killer 1) je integrován v mitochondriální membráně. Uvolnění z negativní regulace 14-3-3ε umožňuje Bax translokaci do vnější mitochondriální membrány. Interakce s tBid (truncated BH3 interacting domain death agonist) stimuluje konformační změnu Bax nebo Bak, inzerce do vnější mitochondriální membrány a tvorbu oligomerů (Donovan *et Cotter*, 2004). Po vytvoření póru ve vnější mitochondriální membráně dochází k uvolnění cytochromu c a dalších proteinů do cytosolu (Parone *et al.*, 2002).

## 2.1.4 Bcl2 rodina proteinů

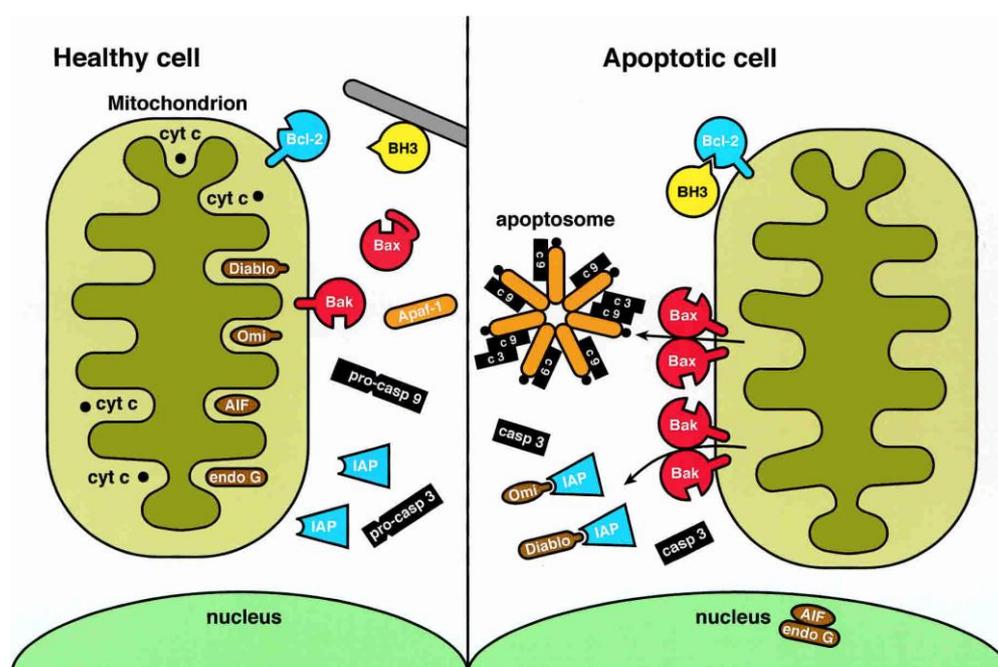
Na základě jejich homologie a funkce můžeme rodinu proteinů bcl2 rozdělit do tří skupin. Anti-apoptická Bcl2/bclX podrodina proteinů Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1 a MCL-1 sdílí sekvenční homologie v doménách BH1 – BH4. Proteiny podrodiny Bax/Bak jsou proapoptické a obsahují až na výjimky homologii v oblastech BH1, BH2, BH3. Nově však byla objevena i homologie v doméně BH4 (Kvansakul *et al.*, 2008). Třetí podrodinu tvoří proapoptické proteiny Bid, Bad, Bim, Bik, BMF, bNIP3, HRK, Noxa a PUMA se sekvenční homologií pouze v doméně BH3 také nazývané „BH3-only“ proteiny (Chipuk *et Green*, 2008).



Obr. 2: Členění Bcl2 rodiny proteinů. Ve schématu jsou znázorněny α-helisy hydrofobní karboxyl koncová doména (TM) (Chipuk *et Green*, 2008).

Charakteristickou vlastností rodiny Bcl-2 je schopnost tvořit homodimery a heterodimery. Heterodimerizací pro- a anti-apoptických členů rodiny dochází k inhibici biologických aktivit partnerů díky inzerci BH3 domény do hydrofobní kapsy tvořené doménami BH1, BH2 a BH3 anti-apoptického proteinu. Členové Bcl-2 rodiny mohou tedy působit ve dvou rovinách, samostatně svou nezávislou funkcí anebo heterodimerizací s ostatními členy (Tsujimoto, 1998). Proteiny Bcl-2 a Bcl-x<sub>L</sub> lokalizované v membránách mitochondrií, ale také endoplazmatického retikula a jádra, udržují BH3-only ve stabilních komplexech, předchází allosterické aktivaci Bax/Bak a tím brání uvolnění proapoptických faktorů cytochromu c a AIF z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytosolu (Cheng *et al.*, 2001). Proapoptické proteiny s homologní doménou BH3 Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) Bik (Bcl-2 interacting killer), HRK (Harakiri), Noxa, PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) jsou schopny vázat anti-apoptické členy Bcl-2 rodiny a neutralizovat jejich aktivitu. Zmíněné proteiny vážou kapacitu anti-apoptických

členů Bcl-2 a předchází tak inhibici Bid (BH3 interacting domain death agonist) a Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death), které přímo zprostředkovávají aktivaci Bax/Bak. Mohou vystupovat také jako derepresory, které uvolní jiné proapoptické členy z komplexu s anti-apoptickým (Chipuk *et al.*, 2010). Hladina Bid v buňce je regulována proteinem p53, avšak jeho aktivace zahmuje sérii posttranslačních modifikací (fosforylace, myristoylace), proteolytické štěpení a translokace do mitochondrií. Během apoptózy indukované přes death receptory, je Bid aktivován proteolytickým štěpením kaspázou 8 nebo 10 za vzniku štěpené formy t-Bid a následně translokován z cytosolu do mitochondrií, kde aktivuje bax/Bak. Díky zpětnovazebné smyčce na apoptozomu závislé apoptózy může být Bid aktivován také kaspázou 3, nebo kaspázou 2 při stresem indukované apoptóze. Dalšími aktivátory schopnými štěpit Bid jsou granzymy, calpainy a cathepsiny, avšak i něštěpený Bid může translokovat do mitochondrií (Köhler *et al.*, 2008).



Obr. 3: Role permeabilizace mitochondriální vnější membrány a vznik apoptozomu (Adams, 2003).

### 2.1.5 Mechanismus vzniku apoptozomu

Před navázáním cytochromu c a zformováním apoptozomu je Apaf-1 monomer se svou CARD doménou (caspase recruitment domain) nepřístupnou prokaspáze-9 (Kim *et al.*, 2008). Po uvolnění z mezimembránového prostoru mitochondrií se cytochrom c váže na Apaf-1 a způsobuje hydrolyzu vázaného nukleotidu. Výměna dATP/ATP za nukleotid umožňuje oligomerizaci sedmi komplexů Apaf-1/cytochrom c

do charakteristického tvaru a CARD doména je zpřístupněna prokaspáze-9. Navázána k apoptozomu, se prokaspáza-9 autoaktivuje a proteolytickým štěpením aktivuje efektorové kaspázy. Vznik apoptozomu je regulován mnoha dalšími proteiny. Overexprese Hsp70 inhibuje vznik apoptozomu přímou vazbou Hsp70 k Apaf-1. Společně s PHAPI a CAS, Hsp70 naopak stimuluje vznik apoptozomu změnou konformace Apaf-1 a usnadněním výměny nukleotidu. Hsp90 $\beta$  inhibuje cytochromem c zprostředkovanou oligomerizaci Apaf-1 (Pérez-Payá *et al.*, 2010).

### 2.1.6 Kaspázy

Kaspázy jsou cysteinové proteázy exprimované ve formě neaktivního proenzymu. Rozštěpením na specifickém místě jsou aktivovány, stejným způsobem aktivují další kaspázy a umožňují amplifikaci proteázové kaskády. Některé kaspázy mohou být aktivovány transaktivací nebo autoaktivací. Jakmile je spuštěna kaspázová kaskáda, kaspázy štěpí buněčné proteiny za každým aspartátem a podílí se na vzniku fenotypu typického pro apoptotickou buňku. Kaspázy první skupiny (kaspáza-1, -4, -5, -12, -13, -14) se uplatňují při zrání cytokinů a při zánětlivých procesech. Druhá skupina kaspáz s dlouhou prodoménou (kaspáza -2, -8, -9, -10) je důležitá pro iniciaci apoptózy. Kaspázy třetí skupiny s krátkou prodoménou (kaspáza-3, -6, -7) vystupují jako efektorové kaspázy (Chowdury *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 1999). Aktivace kaspáz vede k inaktivaci reparačních mechanismů a k zastavení buněčného cyklu. Mezi substráty kaspáz patří široké spektrum proteinů: strukturální proteiny a proteiny cytoskeletu (aktin, lamin,  $\beta$ -katenin), proteiny buněčného cyklu a DNA replikace (topoizomeráza-I, Rb, p21, p27, Wee 1, cdc27, cyklin A), štěpení a reparace DNA (ICAD, PARP), proteinové kinázy a další (Bcl-2, Bid, Hsp90) (Stroh *et al.*, 1998).

### 2.1.7 Inhibitory apoptózy (IAP)

IAP (inhibitors of apoptosis) je rodina proteinů schopná inhibovat apoptózu vazbou své BIR (baculoviral IAP repeat) domény s některými kaspázami. Rodinu IAP savců tvoří proteiny XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, BRUCE, ML-IAP, ILP2 a Survivin. Nejlépe charakterizovaný protein XIAP inhibuje jak iniciační kaspázu-9, tak efektorové kaspázy -3 a -7. Proteiny c-IAP1 a c-IAP2 jsou vazebnými partnery s TNF-asociovanými proteiny. Antagonisty IAP proteinů jsou pro-apoptické proteiny Smac/DIABLO a Omi/HtrA2 uvolněné během permeabilizace vnější mitochondriální membrány z mezimembránového prostoru mitochondrií (Rajalingam *et al.*, 2008).

## 2.2 Apoptóza a buněčný cyklus

Mnoho proteinů hrajících roli v procesu apoptózy má svou funkci i v průběhu buněčného cyklu. Základní buněčné procesy, mezi něž patří proliferace, transkripce a translace, buněčný cyklus a apoptóza, reguluje PI3K/Akt dráha. PI3K/Akt hraje hlavní úlohu nejen při růstu nádorových buněk, ale i v odpovědi na protinádorovou léčbu, proto je považována za jednu z hlavních drah rozhodujících o přežití buňky. Akt reguluje pomocí fosforylací funkci svých substrátů, které se přímo nebo nepřímo podílí na procesu apoptózy. Mezi nejdůležitější substráty Akt patří Bad, kaspáza-9, Mdm 2, FKHL 1 (FOXO3), IKK. Akt zprostředkovaná fosforylace proapoptického Bad na Ser 136 vede k přežití buňky. Fosforylace Ser 196 kaspázy-9 má za následek ztrátu její proteolytické aktivity. Fosforylace IKK $\alpha$  umožňuje degradaci inhibitoru I $\kappa$ B. Uvolnění NF $\kappa$ -B z jeho inhibice vede ke zvýšení transkripce antiapoptických genů Bcl-xL, Bcl2, c-IAP a c-FLIP. Naopak fosforylace transkripčního faktoru FKHL 1 inhibuje transkripci FasL, Bim a PUMA (Maddika *et al.*, 2007). Akt fosforylací zesiluje Mdm2 zprostředkovanou ubiquitinací p53 a zvyšuje jeho degradaci (Ogawara *et al.*, 2002).

## 2.3 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je složitý proces řídící růst a dělení buněk. Na jeho chodu se podílí množství regulačních proteinů, které vedou buňku postupně jednotlivými fázemi G1, S, G2 a M až k rozdělení na dvě buňky dceřinné. V S-fázi (syntetické fázi) dochází k replikaci jaderné DNA, zatímco v M-fázi probíhá mitóza. Mezi nimi jsou zařazeny fáze G1 a G2, ve kterých probíhá intenzivní syntéza proteinů a RNA. Do G0-fáze jsou zařazovány buňky aktivně necyklující (Shafer, 1998). Průchod jednotlivými fázemi buněčného cyklu regulují cyklin-dependentní kinázy (Cdks) a proteiny cykliny. Hladina cyklinů v buňce periodicky osciluje v důsledku regulace jejich degradace a exprese jejich genů, zatímco hladina CDKs zůstává stabilní. Cykliny můžeme rozdělit podle jejich funkce v jednotlivých fázích buněčného cyklu na G1 cykliny, G1/S cykliny, S a M cykliny. Cykliny vystupují jako regulační podjednotka, kterou potřebují příslušné Cdks ke své aktivaci, udávají jim také substrátovou specifitu. Ve většině případů je k plné aktivaci Cdks nutná i fosforylace cdk-aktivující kinázou (CAK). Na regulaci aktivity Cdk se podílí také Wee1 a Cdc25. Wee1 ji inhibuje fosforylací a Cdc25 opět aktivuje defosforylací. Cdks přenáší fosfátovou skupinu z ATP na serin nebo threonin cílových

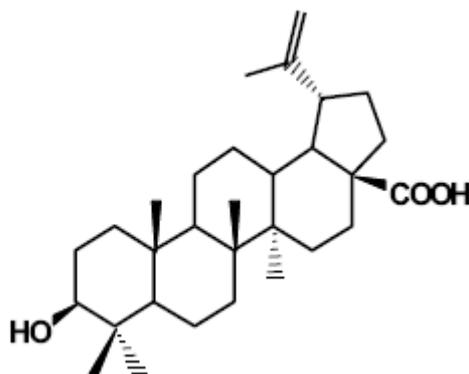
proteinů a způsobují tak změny v jejich struktuře nebo enzymové aktivitě. Cdk's jsou evolučně velmi konzervované, cyklin dependentní kináza kvasinek je vysoce homologní s Cdk1 člověka. Na regulaci buněčného cyklu lidské buňky se podílí také Cdk2, Cdk4 a Cdk6, avšak existují i další Cdk's hrající úlohu v jiných buněčných procesech (Morgan, 2007).

### 2.3.1 Kontrola buněčného cyklu

Růstové faktory působí na buňku primárně jen v G1 a G0 fázi. Po překročení tzv. restriční bodu v pozdní G1 fázi, je již buňka nezávislá na přítomnosti vnějších faktorů a směřuje nenávratně k rozdělení buňky. Jestliže má však buňka nedostatek růstových faktorů ještě před dosažením restriční bodu, přechází do G0 fáze. Správnou souslednost biochemických procesů a jejich dokončení před vstupem do další fáze zajišťují tzv. kontrolní body. Kontrolní body a eliminace poškozených buněk apoptózou, udržují integritu mnohobuněčného organismu. Zastavení v kontrolním bodě může způsobit mnoho faktorů, zejména však poškození DNA. Zastavení v kontrolním bodě v G1 je závislé na proteinu p53 a umožňuje opravu poškozené DNA před její replikací v S-fázi. Protein p53 je schopen rozpoznat poškozenou DNA a v tomto případě stimuluje transkripci p21, který potom inhibuje G1 Cdk's (Shafer, 1998). Důležitým mechanismem je negativní zpětnovazebná smyčka, již p53 stimuluje transkripci onkogenu *mdm2*. Protein Mdm2 působí jako inhibitor transkripční aktivity p53 a vede k jeho ubiquitinaci a eliminaci proteolytickou degradací (Bar-Or *et al.*, 2000). V tomto mechanismu hraje svou roli i regulační protein p19 (ARF), který váže Mdm2 a upravuje tak míru proteolýzy p53. V případě rozsáhlejšího poškození DNA, stimuluje p53 apoptózu aktivací genů Bax, Fas a dalších (Vermuelen *et al.*, 2003). K úspěšnému vstupu do S-fáze je nutná aktivace genů regulačním proteinem E2F. Inhibitorem jeho aktivity je produkt tumor-supresorového genu Rb. Fosforylace Rb aktivními G1 Cdk's snižují jeho afinitu k E2F. Jako odpověď na poškozenou DNA však p53 stimuluje expresi proteinů rodiny p16, inhibitorů G1 Cdk's. Inhibice G1 Cdk's vede ke snížení fosforylace Rb, inhibici E2F a ve výsledku k zastavení progresu do S-fáze. Kontrolní bod v G2 fázi umožňuje opravu DNA před vstupem do mitózy. K průchodu G2/M kontrolním bodem je nezbytná aktivace Cdc25, která defosforyluje inhibiční fosforylace aktivního místa Tyr15 Cdk1 (DiPaola, 2002).

## 2.4 Kyselina betulinová

Terpeny patří spolu se steroly do skupiny isoprenoidů. Kyselina betulinová (kyselina 3 $\beta$ -hydroxylup-20(29)en-28ová) je pentacyklický triterpenoid s širokým spektrem biologických účinků. Vedle protinádorových, má také antimikrobiální, protivirové a protizánětlivé účinky (Yogeeswari *et Sriram*, 2005). Její výhodnou vlastností je specifický účinek na nádorové buňky, zatímco pro normální buňky je toxická až při vyšších dávkách (Zuco *et al.*, 2002). Kyselina betulinová spouští mitochondriální (vnitřní) dráhu apoptózy nádorových buněk permeabilizací vnější mitochondriální membrány (Fulda *et al.*, 1998). Indukuje také zvýšenou tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů a aktivuje kaspázovou dráhu nezávisle na p53 (Wick *et al.*, 1999).



Obr. 4: Strukturální vzorec kyseliny betulinové (Fulda, 2008)

## 2.5 Molekulární cíle biologicky aktivních látek

Pro identifikaci molekulárních cílů biologicky aktivních látek existuje několik strategií. Metody afinitní chromatografie jsou založeny na interakci studované látky s jejím cílem v proteinovém extraktu. Metody kvantitativní expresní proteomiky mohou objasnit molekulární mechanismy a vztahy na základě změny exprese proteinů mezi vzorky z buněk neošetřených a ošetřených sledovanou látkou (Cheng *et al.*, 2010). Pomocí cDNA arrayů lze sledovat změny genové exprese na úrovni mRNA, zatímco proteomický přístup představovaný zejména 2D- elektroforézou a hmotnostní spektrometrií se zaměřuje přímo na proteiny, efektorové molekuly biologických dějů (Gygi *et al.*, 1999).

## 2.6 Proteomika

Proteom je soubor všech exprimovaných proteinů buňky, tkáně nebo organismu ve všech izoformách a posttranslačních variantách (Wang *et* Chiu, 2008). Soubor proteinů je výsledkem mnoha vnitřních i vnějších vlivů působících na buňku nebo organismus a v čase se mění. Při studiu dynamických biologických procesů mohou být změny v expresi genů zjištěny dvěma hlavními přístupy.

### 2.6.1 Dvourozměrná elektroforéza

Standardní metodou proteomických studií je dvourozměrná polyakrylamidová elektroforéza (2D-PAGE), později doplněná o identifikaci proteinů hmotnostně-spektrometrickou analýzou. Principem 2D-PAGE je separace proteinů buněčného lyzátu podle dvou nezávislých parametrů. V prvním rozměru na základě rozdílného izoelektrického bodu pomocí izoelektrické fokusace v gelu s pH gradientem a v druhém podle své molekulové hmotnosti. Proteinové spoty mohou být vizualizovány a kvantifikovány barvením stříbrem, Comassie Blue, chemickým nebo fluorescenčním barvením. Porovnání takto získaných polyakrylamidových gelů se spoty umožňuje zjistit up či down-regulaci exprimovaných proteinů mezi dvěma i více soubory. Úspěšný byl výzkum na sub-proteomových úrovních prováděný na buněčných organelách nebo jiných frakcionovaných částech buňky např. proteinech fagozomu nebo cytoplazmatické membrány. Spolu s izolací sub-proteomů a se snížením komplexity vzorku může být citlivost metody zvýšena značením proteinů biotinylací a následnou MS analýzou. Další modifikací 2D-PAGE je diferenciální in-gel elektroforéza (DIGE), při které jsou dva soubory proteinových vzorků označeny rozdílnými fluorescenčními barvivy smíchány a provedena 2D-PAGE. Avšak hlavní nevýhodu 2DE však zůstává její nízká citlivost pro málo zastoupené proteiny a proteiny membrán a jejich další obtížná identifikace. Dochází také ke ztrátám proteinů s vysokou nebo naopak nízkou molekulovou hmotností, bazických a kyselých proteinů (Hanash, 2003).

### 2.6.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda umožňující na základě poměru hmotnosti a náboje získaných iontů ( $m/z$ ) určit jejich přesnou molekulovou hmotnost. Analýza biomolekul byla umožněna zavedením šetrných ionizačních metod, ionizace elektrosprejem (ESI) a desorpce /ionizace za přítomnosti matrice (MALDI). Molekuly analytu převedené na ionty dále prochází přes analyzátor k detektoru. (Westermeier *et* Naven, 2002).

## Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

MALDI je založena na krystalizaci vzorku s vhodnou maticí např. kyselinou kyano-4-hydroxybenzoovou nebo kyselinou dihydroxybenzoovou. Dodáním energie laserovým pulsem je matrice spolu s analytem převedena do plynné fáze. Matrice vystupuje jako donor nebo akceptor elektronu a analyt získává náboj. Jako analyzátor této pulzní ionizační techniky bývá nejčastěji používán analyzátor doby letu (TOF), Q-TOF s předřazeným kvadrupólovým analyzátozem nebo TOF/TOF. (Westermeier *et Naven*, 2002).

## Analyzátor doby letu (TOF)

V lineárním TOF analyzátoru je iontům udělena počáteční kinetická energie, rychlost jakou dorazí letovou trubicí k detektoru přitom závisí na individuální hodnotě  $m/z$ . Doba letu je dána vztahem  $t = k \sqrt{m/z}$  (Westermeier *et Naven*, 2002). Rozlišení přístroje je závislé na délce letové trubice, avšak při jejím prodlužování se zhoršují další parametry. Proto bývá součástí hmotnostního spektrometru často reflektrom, který odrazí ionty zpět do letové trubice a zvyšuje rozlišení přístroje. Ionty se stejným poměrem  $m/z$ , ale mírně vyšší kinetickou energií vstupují do reflektromu hlouběji než ionty s nižší kinetickou energií. Na detektor potom dopadají ionty se stejným  $m/z$  nezávisle na své kinetické energii (Mamyrin, 2001).

## Ionizace elektrosprejem (ESI)

Principem ESI je ionizace analytu za atmosférického tlaku pomocí kapiláry, pod vlivem elektrického pole. Díky rozdílu potenciálů mezi kapilárou a vstupem do hmotnostního vlastního spektrometru vzniká tzv. Taylorův kužel tvořený jemnými nabitými kapkami. Kapky se v důsledku odpařování rozpouštědla zmenšují až odpudivé síly mezi ionty převáží nad silami povrchového napětí, které je drží pohromadě. V blízkosti Rayleighovy meze stability dochází ke coulombické explozi a přechodu iontů do plynné fáze. Zatímco MALDI poskytuje jednonásobně nabité ionty, výhodou ESI je vznik vícenásobně nabitých iontů. (Westermeier *et Naven*, 2002). Nejčastěji užívaným analyzátozem k ionizaci elektrosprejem je kvadrupólový analyzátor (Q), trojitý kvadrupól (QqQ) nebo iontová past (IT).

## Kvadrupólové analyzátory

Lineární kvadrupólový analyzátor tvoří čtyři paralelní kovové tyče, mezi kterými získávají ionty v plynné fázi stabilní trajektorii. Analyzátor je ovládán napětím (DC) a oscilujícím radio-frekvenčním napětím (RF) aplikovanými na protilehlé páry tyčí. Prostorem mezi tyčemi mohou procházet pouze ionty oscilující se stejnou frekvencí závislou na jejich  $m/z$ . Ionty s odlišným  $m/z$  jsou zachyceny na tyčích (Westermeier *et Naven*, 2002). Použitím trojitého kvadrupólu dochází ke zvýšení rozlišení a rozsahu měřitelné molekulové hmotnosti, díky kolizně indukované disociaci poskytuje přístroj také sekvenční informaci měřením tandemových spekter v režimu MS/MS. v prvním kvadrupólu je vybrán mateřský iont (prekurzor), druhý vystupuje jako kolizní cela pro kolizně indukovanou disociaci (CID) a třetí funguje jako analyzátor pro fragmentované dceřiné ionty (Wong *et Cooks*, 1997).

## Iontová past

Iontová past se skládá z prstencové elektrody s hyperbolickým průřezem a dalších dvou hyperbolických elektrod, které ji volně uzavírají. Ionty jsou zaměřeny do centra kvadrupólové iontové pasti pomocí oscilujícího elektrického potenciálu na prstencové elektrodě. V iontové pasti zůstávají zachyceny pouze ionty s hodnotou  $m/z$  odpovídající oscilaci vloženého napětí. Hélium v iontové pasti funguje jako tlumící plyn, redukuje kinetickou energii iontů a pomáhá je udržovat v centru iontové pasti. V prostoru iontové pasti dochází k fragmentaci iontů kolizně indukovanou disociací (CID). Vzniklé dceřiné ionty jsou vypouštěny k detektoru podle své rostoucí hodnoty  $m/z$ . (Jonscher *et Yates*, 1997).

## Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)

Nejvyspělejším typem hmotnostního spektrometru je FT-ICR. Díky svému vynikajícímu rozlišení a přesnosti umožňuje i sledování fosforylací a dalších posttranslačních modifikací proteinů (Shi *et al.*, 2001).

### 2.6.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Obecně může hmotnostní spektrometr pracovat ve dvou režimech. V jednoduchém MS módu měří molekulovou hmotnost analytu a indikuje jeho složení. Tento mód je používán např. pro peptide mass fingerprinting, kdy jsme schopni podle hmotnosti

specificky naštěpených peptidů vyhledat v databázích protein, z něhož pochází. Tandemová hmotnostní spektrometrie probíhá v MS/MS módu, kromě hmotnosti analytu je získána také informace o jeho struktuře. Při prvním MS je vybrán určitý iont, změřena jeho hmotnost, a podroben fragmentaci CID. Při nízkoenergetické CID v iontové pasti dochází ke kolizní fragmentaci prekurzorového iontu a peptid je fragmentován (Westermeier *et Naven*, 2002).

#### LC-MS/MS

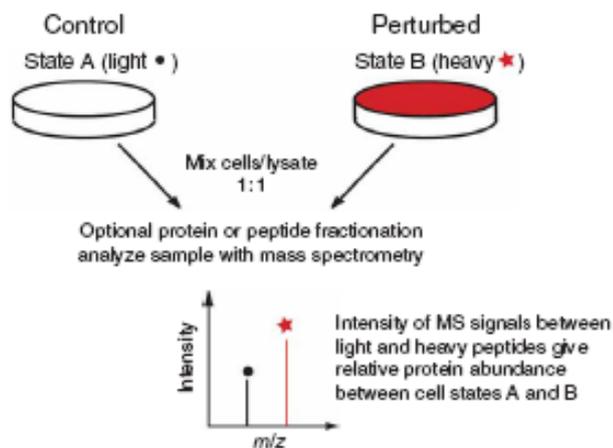
Separace kapalinovou chromatografií před vlastní analýzou tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) umožňuje identifikovat jeden specifický peptid v komplexní směsi. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) na reverzní fázi nejprve zakoncentruje a rozdělí peptidy vzorku podle jejich polarity. HPLC-ESI-MS/MS systém je řízen počítačem, dává frakce vzorku do hmotnostního spektrometru, kde dochází k ionizaci elektrospejem a analýze tandemovou hmotnostní spektrometrií (Srinivas *et al.*, 2002).

#### 2.6.4 Kvantitativní proteomika

Při studiu jednotlivých biologických jevů často nevystačíme s jednoduchou identifikací proteinů. Kvantitativně proteomický přístup umožňuje ve složité směsi proteinů odhalit změny spojené se sledovaným fenotypem (Ong *et al.*, 2007). Metody kvantitativní proteomiky mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin. „Label free“ přístupem jsou proteiny kvantifikovány intenzitou signálu v hmotnostním spektru (Kopylov *et al.*, 2009). Přesnějším a reprodukovatelnějším přístupem jsou metody založené na značení proteinů stabilní značkou, vnášející mezi proteiny dvou souborů diferenci molekulové hmotnosti. Principem metod je analýza směsi proteinů, ve které část proteinů, označená stabilní značkou, slouží jako vnitřní standard. Protože je účinnost ionizace peptidů vysoce variabilní, jako vnitřní standard slouží stejný peptid označený stabilní značkou (Gygi *et al.*, 1999). V případě porovnávání dvou směsí, vystupuje značený a neznačený peptid v hmotnostním spektru jako peptidový pár se specifickým rozdílem molekulových hmotností. Poměr intenzit píků značeného a neznačeného peptidu poskytuje informaci o relativním množství peptidů. Proteiny mohou být značeny chemickou modifikací specifické skupiny na molekule např. metodami ICAT, iTRAQ, AQUA anebo metabolizací média s obsahem izotopicky značených anabolitů (Ong *et al.*, 2003).

## Metabolické značení

Metoda SILAC (Stable isotope labeling by aminoacids in cell culture) využívá ke značení proteinů inkorporaci aminokyselin se stabilními izotopy. Provádí se kultivací buněčné linie nejméně 5 buněčných dělení v médiu, ve kterém je některá ze standardních esenciálních aminokyselin nahrazena svou izotopicky značenou formou. Pro buňky savců jsou nejvhodnější leucin, lysin nebo methionin. Arginin nepatří mezi esenciální aminokyseliny, avšak většina je ho přijímána z média. Pro značení aminokyselin jsou používány nejčastěji  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , nebo  $^{15}\text{N}$ . Přítomnost aminokyseliny s těžšími izotopy v peptidu se projeví v hmotnostním spektru posunem molekulové hmotnosti o specifickou hodnotu např. 6 Da pro arginin značený  $^{13}\text{C}$ . Tento rozdíl dostičuje rozlišení peptidových párů pocházejících ze značených a neznačených proteinů. (Ong *et al.*, 2002; Ong *et Mann*, 2007).



Obr. č. 5: Schématicky znázorněný princip analýzy vzorku značeného metodou SILAC (Ong *et Mann*, 2007).

### **3. Cíle práce**

Zjistit časový interval mezi aplikací látky a aktivací kaspázové dráhy individuálně pro každý derivát kyseliny betulínové

Zhodnotit možnosti Magic red kitu pro sledování aktivity kaspáz v reálném čase

Identifikovat kvantitativní změny buněčných proteinů po ovlivnění vybraným derivátem

#### **4. Materiál a metodika**

Přístroje: biohazard box (Forma Scientific), inkubátor (Joan), světelný mikroskop, centrifuga Centra CL3 (IEC), centrifuga 5810R (Eppendorf), laboratorní váhy SBC21 (Scaltec), třepačka Unimax 1010 (Heidolph), vortex Genie 2 (Scientific Industries), zdroj pro elektroforézu (Bio-Rad), ultrazvuková lázeň (Maneko), inkubátor (Biotech), odparka concentrator 5301 (Eppendorf), Fluostar Galaxy (BMG Labtechnologies), DRI-block DB 2A (Techne)

##### **Pasážování suspenzních buněk**

Biologický materiál: Nádorová buněčná linie CCRF-CEM (ATCC, VA, USA)

Materiál: Kultivační lahve a další palstový materiál (TPP, Švýcarsko), injekční stříkačky a jehly (Braun)

Zásobní roztok penicilinu:  $1 \cdot 10^6$  U penicilinu (Biotika) bylo rozpuštěno v 50 ml sterilní dH<sub>2</sub>O.

Zásobní roztok streptomycinu: 1 g streptomycinu (Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn v 50 ml sterilní dH<sub>2</sub>O.

Složení kultivačního média: 500 ml RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), 100 ml fetálního telecího séra (PAN-Biotech GmbH, Německo), 0,250 ml zásobního roztoku penicilinu, 2,5 ml zásobního roztoku streptomycinu.

1. Před zahájením pasážování byl pod světelným mikroskopem zkontrolován aktuální stav a viabilita buněčné kultury.
2. Z dobře narostlé populace bylo odebráno několik ml buněčné suspenze pro inokulaci do nové kultivační lahve.
3. Buněčná suspenze v kultivační lahvi byla doplněna čerstvým temperovaným médiem v poměru 1:5.

##### **Sledování aktivity kaspáz pomocí Magic Red kitu**

Materiál: Magic Red™ Caspase Detection Kit Caspases 3 & 7 MR-(DEVD)<sub>2</sub> (Immunochemistry Technologies, LLC; MN,USA), 96 - jamkový panel s černými stěnami (Falcon)

Chemikálie: 99,9% dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Složení kultivačního média: 500 ml RPMI-1640 bez fenolové červě a glutaminu (Sigma-Aldrich), 150 mg glutaminu (Sigma-Aldrich), 100 ml fetálního telecího séra (PAN-Biotech GmbH, Německo), 0,250 ml zásobního roztoku penicilinu, 2,5 ml zásobního roztoku streptomycinu.

1. Buněčná suspenze obsahující požadovaný počet buněk byla centrifugována 5 min při 350 g a pelet resuspendován čerstvým médiem k získání koncentrace  $2 \cdot 10^6$  buněk v 1 ml média.
2. Buňky byly stabilizovány 120 minut v inkubátoru při teplotě 37°C a obsahu 5 % CO<sub>2</sub> v atmosféře.
3. K buněčné suspenzi v Petriho misce byl přidán substrát 31xMR-(DEVD)<sub>2</sub> v poměru 31:1 v/v.
4. Buněčná suspenze se substrátem byla inkubována 60 minut v inkubátoru při teplotě 37°C a obsahu 5 % CO<sub>2</sub> v atmosféře.
5. Buněčná suspenze byla rozpipetována po 98 µl do 96 - jamkového panelu.
6. Pomocí fluorimetru s filtry 590 nm pro excitaci a 645 nm pro emisi byla změřena intenzita fluorescence.
7. Do vybraných jamek s buňkami bylo napipetováno 2 µl roztoku každé testované látky tak, aby výsledná koncentrace v jamce činila 1x nebo 5xIC<sub>50</sub>.
8. Intenzita fluorescence byla odečítána každou další hodinu fluorimetrem.

Grafy byly vytvořeny Mgr. Lenkou Radovou, Ph.D. v počítačovém programu Statistica 8.

### **Stable isotope labeling by aminoacids in cell culture (SILAC)**

Složení kultivačního média pro SILAC: 500 ml RPMI-1640 bez argininu a lysinu (Biowest), 100 ml dialyzovaného fetálního telecího séra (Sigma-Aldrich), 0,250 ml zásobního roztoku penicilinu, 2,5 ml zásobního roztoku streptomycinu. Do média pro značenou populaci buněk bylo přidáno 100 mg <sup>13</sup>C argininu (Cambridge Isotope Laboratories) a 20 mg <sup>13</sup>C lysinu (Cambridge Isotope Laboratories). Do média pro neznačenou populaci buněk bylo přidáno 100 mg <sup>12</sup>C argininu (Cambridge Isotope Laboratories) a 20 mg <sup>12</sup>C lysinu (Cambridge Isotope Laboratories). Značení proběhlo 5 pasáží.

### **Příprava buněčných lyzátů**

Chemikálie: 99,9% dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich), protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), endonukleáza Benzonase (Novagen)

Roztoky:

1xPBS byl připraven smícháním 900 ml dH<sub>2</sub>O a 100 ml 10xPBS

Složení 10xPBS: 80 g chloridu sodného (Lach-Ner), 32,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (Lach-Ner), 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lach-Ner) bylo doplněno dH<sub>2</sub>O do objemu 1 l a HCl (p. a., Lach-Ner), do pH 7,4.

Složení 1xPBS s inhibitory proteáz: 2,23 g pyrofosfátu sodného, 180 mg NaVO<sub>3</sub>, 210 mg NaF, 174,2 mg rozpuštěného v 1 ml methanolu a 5 ml směsi inhibitorů proteáz (Sigma-Aldrich) bylo rozpuštěno v 1 l 1xPBS.

Roztok endonukleázy: 2U endonukleázy/ μl

Lyzační pufr: 20 mmol.l<sup>-1</sup> tris-HCl (Sigma-Aldrich), 7 mol.l<sup>-1</sup> močoviny (Amersham Biosciences), 10 mmol.l<sup>-1</sup> DTT (Sigma-Aldrich), 1% Triton X-100 (Fluka), 0,5% dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich) ve vodě MS kvality (J. T. Baker).

1. Buněčná suspenze obsahující požadovaný počet buněk byla centrifugována 5 min při 350 g a pelet resuspendován 10 ml čerstvého média k získání koncentrace 10.10<sup>6</sup> buněk v 10 ml média a suspenze přenesena do Petriho misky.
2. Pro experimenty byly připraveny celkem 4 Petriho misky s buněšnou suspenzí: značená kontrola (A), neznačené buňky (B), značená kontrola (C), neznačená kontrola (D).
3. Buňky byly stabilizovány 120 minut v inkubátoru při teplotě 37°C a obsahu 5 % CO<sub>2</sub> v atmosféře.
4. K neznačeným buňkám (B) byl napipetován roztok testované látky v 10% DMSO tak, aby výsledná koncentrace v jamce činila 1x nebo 5xIC<sub>50</sub>.
5. K neznačené kontrole (D) bylo připipetováno stejné množství 10% DMSO bez testované látky.
6. Petriho misky s buňkami byly inkubovány v inkubátoru při teplotě 37°C a obsahu 5 % CO<sub>2</sub> v atmosféře, doba inkubace byla individuální pro každou testovanou látku.
7. Obsah Petriho misek a a B, C a D byl smíchán dohromady a centrifugován 5 min při 1200 rpm ve vychlazené centrifuze (4°C).
8. Pelet byl dvakrát promyt 15 ml vychlazeného 1xPBS s inhibitory proteáz, centrifugován 5 min při 1200 rpm ve vychlazené centrifuze (4°C).
9. Pelet byl promyt 15 ml vychlazeného 1xPBS bez inhibitorů proteáz, centrifugován 5 min při 1200 rpm ve vychlazené centrifuze (4°C).
10. Pelet byl lyzován 0,2 ml lyzovacího pufru a přidán 1 μl roztoku benzonázy (2U).
11. Vzorky byly přeneseny do vychlazených eppendorfek a inkubovány 5 min při 4°C.

12. Ke vzorkům byl znovu přidán 1  $\mu$ l roztoku benzonázy (2U).
13. Po 5 minutové inkubaci byly vzorky centrifugovány 10 min při 13000 rpm ve vychlazené centrifuze.
14. Supernatant byl přenesen do nové eppendorfky a spolu s pelety zamražen v  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Denaturace vzorku pro preparativní elektroforézu**

Ke 150  $\mu$ l buněčného lyzátu v mikrozkuhavce bylo připipetováno 40  $\mu$ l 5x koncentrovaného dodecyl síranu lithného (Sigma-Aldrich) a 10  $\mu$ l 1M DTT (Sigma-Aldrich). Vzorek byl inkubován v termobloku 10 min při  $90^{\circ}\text{C}$ .

### **Preparativní elektroforéza**

Přístroje: Mini prep cell (Bio-Rad) byl zapůjčen Laboratoří charakterizace molekulární struktury Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze. Preparativní elektroforézu provedl Mgr. Dušan Holub.

Chemikálie: PlusOne™ Repel-Silane ES (GE Healthcare)

Roztok pro separační gel (stupeň zesíťování 12 %, 10 ml): 3,3 ml vody čistoty pro MS (J. T. Baker), 4 ml 30% acrylamide mix (Bio-Rad), 2,5 ml  $1,5 \text{ mol.l}^{-1}$  Tris (pH 8,8; Bio-Rad), 0,1 ml 10% dodecyl síranu lithného (Sigma-Aldrich), 0,1 ml 10% peroxodisíranu amonného (Serva), 4  $\mu$ l N,N,N,N-tetramethylethyldiaminu (Serva).

Roztok pro zaostřovací gel (stupeň zesíťování 5 %, 2 ml): 1,4 ml vody čistoty pro MS (J. T. Baker), 330  $\mu$ l 30% acrylamide mix (Bio-Rad), 250  $\mu$ l  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  Tris (pH 6,8; Bio-Rad), 20  $\mu$ l 10% dodecyl síranu lithného (Sigma-Aldrich), 20  $\mu$ l 10% peroxodisíranu amonného (Serva), 4  $\mu$ l N,N,N,N-tetramethylethyldiaminu (Serva).

Elektrodový pufr: 10 ml 10% dodecyl síranu lithného (Sigma-Aldrich), 100 ml 10x koncentrovaného Tris / glycinového pufr (Bio-Rad).

1. Trubička aparatury byla opláchnuta  $\text{dH}_2\text{O}$ , její stěny smočeny repel-silanem a upevněna do stojánku.
2. Trubička byla naplněna 9 ml roztoku pro separační gel a převrstveno 200  $\mu$ l  $\text{dH}_2\text{O}$
3. Po 15 minutách byla přebytečná voda odebrána.
4. Na povrch gelu byl napipetován 1 ml roztoku pro zaostřovací gel a na něj 200  $\mu$ l  $\text{dH}_2\text{O}$ .

- Po 15 minutách byla přebytečná voda odebrána.
- Byla sestavena aparatura elektroforézy a do obou jejích komor napuštěn elektrodotový pufr.
- Na zaostřovací gel bylo nanášeno celé množství denaturovaného buněčného lyzátu.
- Elektrody byly připojeny ke zdroji a elektroforéza proběhla 5 h při konstantním příkonu 1 W.

### **In-gel štěpení proteinů**

Chemikálie: Acetonitril (J. T. Baker), Iodoacetamid (Sigma-Aldrich), tris(2-karboxyethyl) fosfin (TCEP) (Sigma-Aldrich), trypsin gold mass spec. grade (Promega),

Ethylmorfolinový pufr: 158  $\mu$ l ethylmorfolinu (Fluka) bylo smícháno s 2,5  $\mu$ l acetonitrilu (J. T. Baker) a 22,3 ml H<sub>2</sub>O a pH upraveno na 8,3 ethylmorfolnem nebo kyselinou octovou (Fluka).

Roztok trypsinu v ethylmorfolinovém pufru: 93,8  $\mu$ l trypsinu o koncentraci 500 ng/ $\mu$ l bylo doplněno ethylmorfolinovým pufrem do 7,5 ml.

Použité chemikálie byly v kvalitě pro hmotnostní spektrometrii, není-li uvedeno jinak

- Polyakrylamidový gel se separovanými proteiny byl důkladně opláchnut dH<sub>2</sub>O a rozřezán po 2 mm na 45 částí.
- Každý plátek byl přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky a rozřezán na kostky 1x1 mm.
- Gelové kostky byly dehydratovány 400  $\mu$ l acetonitrilu a 5 minut inkubovány v ultrazvukové lázni.
- Po odstranění acetonitrilu bylo připipetováno 150  $\mu$ l 50mM TCEP a mikrozkušavky inkubovány 10 min při 90°C.
- Po inkubaci byl všechnen roztok odstraněn a kostky promývány 5 min 400  $\mu$ l vody.
- Po odstranění vody byly kostky dehydratovány 400  $\mu$ l acetonitrilu a 5 minut inkubovány v ultrazvukové lázni.

7. Po odstranění předchozího roztoku bylo připipetováno 150  $\mu$ l 50mM iodoacetamidu a eppendorfky byly inkubovány 60 min při laboratorní teplotě v temnu.
8. Roztok iodoacetamidu byl odstraněn a gelové kostky důkladně promyty 400  $\mu$ l vody a po odebrání 400  $\mu$ l acetonitrilu po 5 minutách.
9. Předchozí krok byl ještě dvakrát zopakován.
10. Po odstranění Acetonitrilu bylo do ke kostkám přidáno 150  $\mu$ l Ethylmorfolinového pufru s trypsinem a mikrozkuhavky byly inkubovány při 37°C přes noc.
11. Po 30 minutách byl odstraněn nadbytečný enzymatický roztok a eppendorfky inkubovány přes noc při 37°C.

### **Extrakce peptidů**

Chemikálie: kyselina trifluoroctová (Fluka), Acetonitril (J. T. Baker)

1. Mikrozkuhavky byly ochlazeny na laboratorní teplotu, stočeny ve stolní centrifuze a roztok s naštěpenými peptidy odebrán do nových mikrozkuhovek.
2. Ke kostkám bylo přidáno 100  $\mu$ l 0,1%TFA v 80% ACN. Po 10 minutové inkubaci v ultrazvukové lázni přeneseme k předchozímu roztoku peptidů.
3. Ke kostkám bylo přidáno 50% ACN. Po 10 minutové inkubaci v ultrazvukové lázni přeneseme k předchozímu roztoku peptidů.
4. Sesbíraný extrakt byl odpařen ve vakuové odparce a opět rozpuštěn ve 100  $\mu$ l 0,1%TFA.

### **Přečištění peptidů**

1. MacroTRAP byl dvakrát promyt 100% ACN a 1%TFA v 80% ACN.
2. Kolonka MacroTRAPu byla ekvilibrována 500  $\mu$ l 0,1% TFA.
3. Na kolonku byl hamiltonkou nanesen vzorek.
4. Kolonka MacroTRAPu se zadrženými peptidy byla promyta 500  $\mu$ l 0,1%TFA.
5. Peptidy byly eluovány do nové mikrozkuhavky 200  $\mu$ l 0,1% TFA v 80% ACN.

## **Příprava vzorků pro LC-MS**

Eluát byl odpařen do sucha ve vakuové odparce.

Peptidy byly rozpuštěny 1  $\mu$ l 1% TFA v 80% ACN a doplněny 19  $\mu$ l 0,1% TFA.

Vzorek byl bez bublinek přenesen do inzertu a do vialky (Agilent Technologies).

## **LC-ESI-MS/MS**

Roztok A: 0,1% kyselina mravenčí (Fluka) v H<sub>2</sub>O (J. T. Baker)

Roztok B: 0,1% kyselina mravenčí (Fluka) v acetonitrilu (J. T. Baker)

Peptidy byly separovány HPLC 1200 Series (Agilent Technologies) s kolonou Magic C18AQ 5 $\mu$ , 200Å, 0.075x100 mm (Michrom Bioresources, USA). Nastavení gradientu bylo 5 – 35 % roztoku B po dobu 80 minut, eluované peptidy byly kontinuálně analyzovány hmotnostním spektrometrem HCTultra PTM Discovery System (Bruker Daltonics). Při každém cyklu byl ukládán jeden plný MS sken a dvě MS/MS spektra. Data byla analyzována programem DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics), identifikace proběhla v databázi NCBI (Homo sapiens) pomocí vyhledávacího algoritmu MASCOT, relativní kvantifikace byla provedena v programu WARP-LC 3.2 (Bruker Daltonics). Další použité programy byly Hystar a Esquire (Bruker Daltonics). Povoleno max. jedno vynechané štěpné místo a nastaveny možné modifikace: karbamidomethylace cysteinu (fixní), oxidace methioninu (variabilní), 13C (6) značení argininu a lysinu (variabilní). MS/MS tolerance byla nastavena na 0,5 Da a 100 ppm. Pro identifikaci byla stanovena podmínka určení nejméně dvou peptidů, z nichž jeden musel mít hodnotu skóre nejméně 40 a všechny další nejméně 20. Do výsledků byly zařazeny jen peptidy s nejméně dvěma kvantifikovanými peptidy.

## **LC-MALDI/TOF**

Roztok matrice: byl připraven smícháním 44  $\mu$ l nasyceného roztoku  $\alpha$ -kyano-4-hydroxy-skořicové kyseliny (Bruker Daltonics) v 90% acetonitrilu (ACN) s 0,1% kyselinou trifluoroctovou (TFA), 1524  $\mu$ l ACN, 16  $\mu$ l 10% TFA a 16  $\mu$ l 100 mM dihydrogenfosforečnan amonný (Fluka) v 0,1% TFA.

Aby došlo ke snížení počtu vzorků analyzovaných přístrojem MALDI/TOF, vzorky byly smíchány následujícím způsobem: 1-5, 6-9, 10-11, 12-13, 14-15, 16-17, 18-19, 20-21, 22-23, 24-25, 26-27, 28-29, 30-31, 32-33, 34-35, 36-37, 38-39, 40-41, 42-43, 44-45.

Peptidy byly separovány HPLC 1200 Series (Agilent Technologies) s kolonou Magic C18AQ 5 $\mu$ , 200Å, 0.2x150 mm (Michrom Bioresources, USA) v následujícím režimu: 95% roztok A 5 min, gradient roztoku B 5- 25 % po dobu 45 minut, 2 min gradient 25- 95% B, 95% B po dobu 20 min, gradient 5- 95% A během 3 min, 95% A po dobu 20 min. Peptidy eluované od 5 do 56 min byly automaticky nanášeny přístrojem Proteineer fc (Bruker Daltonics) na Anchor Chip (Bruker Daltonics).

Na AnchorChip bylo nanášeno 0,5  $\mu$ l kalibrantu v 0,1%TFA a na něj 1  $\mu$ l matrice.

Analýza proběhla s pomocí hmotnostního spektrometru Autoflex III (Bruker Daltonics). Identifikace proběhla v databázi NCBI (Homo sapiens) pomocí vyhledávacího algoritmu Mascot (treshold 15,0) a Phenyx (treshold 4,0; alespoň jeden peptid se score vyšší než 10). Povoleno max. jedno vynechané štěpné místo a nastaveny možné modifikace: karbamidomethylace cysteinu (fixní), oxidace methioninu (variabilní), 13C (6) značení argininu a lysinu (variabilní). MS/MS tolerance byla nastavena na 0,5 Da. Relativní kvantifikace byla provedena v programu WARP-LC 3.2. Do výsledků byly zařazeny jen peptidy s nejméně dvěma kvantifikovanými peptidy.

## 5. Výsledky

















## 6. Diskuze





## 7. Závěr

Deriváty kyseliny betulinové JS8, JS3.695, JS3.698, JS3.723, JS3.768, JS3.786 indukovaly na kaspázách závislou apoptózu. Pomocí flourogenního substrátu Magic Red jsem sledoval rychlost aktivace kaspáz 3 a 7 po aplikaci testovaných derivátů v koncentracích  $1 \times IC_{50}$  a  $5 \times IC_{50}$  na buněčnou linii CEM. Naměřená data pro derivát JS 8 byla v souladu se znalostmi získanými jinou metodou. Magic Red kit umožňuje jednoduchou, rychlou a specifickou detekci apoptózy v buňkách, nevýhodou je však vysoký obsah DMSO v měřené buněčné suspenzi a také nemožnost jednoduché kvantifikace apoptotických buněk. Pro zjištění kvantitativních změn proteinů během indukce apoptózy derivátem JS3.786, jsem použil metodu metabolického značení proteinů SILAC a jejich relativní kvantifikaci pomocí LC-MS/MS. Hmotnostním spektrometrem MALDI/TOF a iontovou pastí s ionizací elektrosprejem bylo při zvolených parametrech provedena relativní kvantifikace 734 unikátních proteinů. V populaci buněk ošetřených J3.786 byla zjištěna možná zvýšená exprese podjednotky kofaktoru a chaperonu tubulinu, byla také nepřímo zjištěna aktivace proteinu Bid (BH3 interacting domain death agonist). Součástí následujících experimentů bude ověření zjištěných výsledků western blotem.

## 8. Literatura

Adams, J. M. (2003): Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development* 17: 2481-2495.

Bouchier-Hayes, L., Lartigue, L., Newmeyer, D. (2005): Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115:2640–2647.

Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A., Zachariae, W. (2003): The CCT Chaperonin Promotes Activation of the Anaphase-Promoting Complex through the Generation of Functional Cdc20. *Molecular Cell* 12: 87–100.

Cheng, E. H.-Y. A., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., Korsmeyer, S. J. (2001): BCL-2, BCL-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell* 8: 705–711.

Cheng, K. W., Wong, C. C., Wang, M., He, Q. Y., Chen, F. (2010): Identification and characterization of molecular targets of natural products by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 29(1):126-55.

Chipuk, J. E., Green, D. R (2008): How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology* 18/4: 157-164.

Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., Green, D. R. (2010): The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell* 37: 299-310.

Chowdhury, I., Tharakan B., Bhat, G. K. (2008): Caspases — An update. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 151: 10–27.

Cullen, S. P., Brunet, M., Martin, S. J., (2010): Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death and Differentiation* 17: 616–623.

DiPaola, R. S. (2002): To Arrest or Not To G2-M Cell-Cycle Arrest. *Clinical Cancer Research* November 8; 3311.

Donovan, M., Cotter, T. G. (2004): Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644: 133– 147.

Džubák, P. (2006): Plant derived anticancer drugs and their mechanisms of action. Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35/4: 495-615.

Fulda, S., Scaffidi, C., Susin, S. A., Krammer, P. H., Kroemer, G., Peter, M. E., Debatin, K. M. (1998): Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* 273:33942–33948.

Fulda, S. (2008): Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention. *Int. J. Mol. Sci* 9: 1096-1107.

Gao, Y., Vainberg, E. I., Chow, R. L., Cowan, N. J. (1993): Two cofactors and cytoplasmic chaperonin are required for the folding of alpha- and beta-tubulin. *Mol Cell Biol.* 13(4): 2478-2485.

Giordano, A., Calvani, M., Petillo, O., Grippo P., Tuccillo, F., Melone, M. A. B., Bonelli, P., Calarco, A., Peluso, G. (2005): tBid induces alterations of mitochondrial fatty acid oxidation flux by malonyl-CoA-independent inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1. *Cell Death and Differentiation* (2005) 12: 603–613.

Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 17:994-9.

Hanash, S. (2003): Disease proteomics. *Nature* 422(6928):226-32.

Jonscher, K. R., Yates, J. R. (1997): The quadrupole ion trap mass spectrometer – a small solution to a big challenge. *Anal. Biochem.* 244: 1–15.

Kameníčková, A. (2008): Monitorování účinku potenciálních protinádorových léčiv indukujících změny v buněčném cyklu. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Kim, H.-E., Jiang, X., Du, F., Wang, X. (2008) PHAPI, CAS, and Hsp70 Promote Apoptosome Formation by Preventing Apaf-1 Aggregation and Enhancing Nucleotide Exchange on Apaf-1. *Molecular Cell* 30, 239–247.

Köhler, B., Anguissola, S., Concannon, C. G., Rehm, M., Kögel, D., Prehn, J. H. M. (2008): Bid Participates in Genotoxic Drug-Induced Apoptosis of HeLa Cells and Is Essential for Death Receptor Ligands' Apoptotic and Synergistic Effects. *PLoS ONE* 3/7/e2844.

Kopylov, A. T., Zgoda, V. G., Archakov, A. I. (2010): Mass Spectrometry Label-Free Quantitative Analysis of Proteins. *Biochemistry (Moscow) supplement series B: Biomedical chemistry*. 4 (1): 49–58.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., Huang, D. C. S., Colman, P. M. (2008): Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death and Differentiation* 15: 1564–1571.

Lev Bar-Or, R., Maya, R., Segel, L. A., Alon, U., Levine, A. J., Oren, M. (2000): Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. *Proc Natl Acad Sci* 97(21):11250-5.

Lin, Y. F., Tsai, W. P., Liu, H. G., Liang, P. H. (2009): Intracellular B-Tubulin/Chaperonin Containing TCP1-B Complex Serves as a Novel Chemotherapeutic Target against Drug-Resistant Tumors *Cancer Research* 69: 6879.

Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. (2001): The TNF and TNF receptor review superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487–501.

Maddika, S., Ande, S. R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K. D., Wiechec, E., Los, M. (2007): Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat*; 10: 13–29.

Mamyrin, B. A. (2001): Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects) *International Journal of Mass Spectrometry*. 206 (3): 251–266.

Melki, R., Rommelaere, H., Leguy, R., Vandekerckhove, J., Ampe, C. (1996): Cofactor A is a molecular chaperone required for beta-tubulin folding: functional and structural characterization. *Biochemistry* 35(32):10422-35.

- Morgan, D. O. (2007): *The Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press Ltd., London.
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y. (2002): Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 277(24):21843-50.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1(5): 376-86.
- Ong, S. E., Foster, L. J., Mann, M. (2003): Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* 29: 124–130.
- Ong, S. E., Mann, M. (2007): a practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) *Nature Protocols* 1: 2650 – 2660.
- Parone, P. A., James, D., Martinou, J. C. (2002): Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 84: 105–111.
- Pérez-Payá, E., Orzáez, M., Mondragón, L., Wolan, D., Wells, J. A., Messeguer, A., Vicent, M. J. (2010): Molecules That Modulate Apaf-1 Activity. *Medicinal Research Reviews* DOI 10.1002/med.
- Rajalingam, K., Dikic, I. (2009): Inhibitors of apoptosis catch ubiquitin. *Biochem. J.* 417,e1–3
- Rastogi, R. P., Richa, Sinha, R. P. (2009): Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI J* 8:155–181.
- Schafer, K. A. (1998): The cell cycle: a review. *Vet Pathol.* 35(6):461-78.
- Shi, S. D. H., Hemling, M. E., Carr, S. A., Horn, D. M., Lindh, I. McLafferty, F. W. (2001): Phosphopeptide/Phosphoprotein Mapping by Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 73 (1): 19–22.
- Srinivas, P. R., Verma, M., Zhao, Y., Srivastava, S. (2002): Proteomics for Cancer Biomarker Discovery. *Clinical Chemistry* 48: 1160–1169.

Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (1998) Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 5, 99 -1000.

Tsujimoto, Y. (1998): Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells* 3: 697–707.

Tsujimoto, Y., Shimizu S. (2007): Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12:835–840.

Vercesi, A. E., Kowaltowski, A. J., Oliveira H. C. F., Castilho R. F. (2006): Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. *Frontiers in Bioscience* 11: 2554-2564.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. (2003): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36/ 3:131-149.

Wang, Y., Chiu, J. F. (2008): Proteomic Approaches in Understanding Action Mechanisms of Metal-Based Anticancer Drugs. *Met Based Drugs*. 2008: 716329.

Westermeier, R., Naven, T. (2002): *Proteomics in practice*. Wiley-VCH Verlag-GmbH, Weinheim.

Wick, W., Grimmel, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J., Weller, M. (1999): Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289:1306–1312.

Wolf, B. B. Green, D. R. (1999): Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. *The Journal of Biological Chemistry* 274/29: 20049–20052.

Wong, P.S.H., Cooks, R.G., (1997): *Ion Trap Mass Spectrometry*, Bioanalytical Systems Inc., 16.

Yin, X. M. (2006): Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369: 7-19.

Yogeeswari, P., Sriram, D. (2005): Betulinic Acid and Its Derivatives: a Review on their Biological Properties. *Current Medicinal Chemistry* 12: 657-666 657.

Zuco, V., Supino, R., Righetti, S. C., Cleris, L., Marchesi, E., Gambacorti-Passerini, C. (2002): Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumorcell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* 175: 17–25.

## 9. Seznam použitých zkratk a symbolů

ACN	acetonitril
AIF	apoptosis-inducing factor
ANT	adenin nukleotid translokáza
AQUA	absolute quantification
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist killer 1
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BIR	baculoviral IAP repeat
CAK	cdk-aktivující kináza
CARD	caspase recruitment domain
CCT	chaperonin containing TCP-1
CDK	cyklin dependentní kináza
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CID	kolizně indukovaná disociace
DC	napětí
DD	death domain
dH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DIGE	diferenciální in-gel elektroforéza
DISC	death-inducing signaling complex

ESI	ionizace elektrosprejem
FT-ICR	iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRK	harakiri protein
Hsp	heat shock protein
IAP	inhibitor of apoptosis
IC50	koncentrace látky způsobující úhyn 50 % populace
ICAT	isotope coded affinity tags
IMS	mezimembránový prostor
IT	iontová past
iTRAQ	isobaric tag for relative and absolute quantification
LC	kapalinová chromatografie
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MALDI	desorpce /ionizace za přítomnosti matrice
MOM	vnější mitochondriální membrána
MIM	vnitřní mitochondriální membrána
PT	permeability transition
PTP	permeability transition pore
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Q	kvadrupólový analyzátor
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor
RF	oscilující radio-frekvenční napětí
Rt	retenční čas

SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture
TBCA	kofaktor A chaperonu tubulinu
tBid	truncated BH3 interacting domain death agonist
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TFA	kyselina trifluoroctová
TM	koncová doména
TNF	tumor necrosis factor
TOF	analyzátor doby letu
TRAF	TNF receptor -associated factor
VDAC	voltage dependent anion channel
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
2D-PAGE	dvourozměrná polyakrylamidová elektroforéza