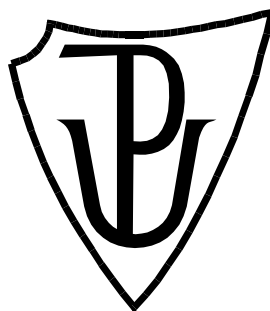


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Automatizace trypsinového štěpení v proteomice**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Denisa Kroupová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.</b>
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych upřímně poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Tomáši Oždianovi, Ph.D. za jeho ochotu, nesmírnou trpělivost a cenné rady. Vážím si jeho pomoci při hledání řádu v mých chaotických poznámkách a laboratorním deníku, pohotových odpovědí na mé emaily, a především, že si vždy našel čas na konzultaci. Můj dík rovněž patří Bc. Evě Kašniarové za to, že mi byla ochotná pomoci při nesnázích v laboratoři.

## **BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE**

Jméno a příjmení autora:	Denisa Kroupová
Název práce:	Automatizace trypsinové digesce v proteomice
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	Bakalářská práce se zabývá automatizací a optimalizací trypsinové digesce v bottom-up proteomickém protokolu. Srovnává tři metody – štěpení v roztoku, štěpení na filtru (FASP) a přípravu pomocí robota Tecan – a stanovuje počet peptidů, sekvenční pokrytí a účinnost, aby se zjistilo, která metoda dosahuje nejvyšší efektivity.
Klíčová slova:	Bottom-up proteomika; peptidy; štěpení v roztoku; FASP; Tecan; trypsin; hmotnostní spektrometrie
Počet stran:	47
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

## **BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION**

Autor's first name and surname: Denisa Kroupová

Title: Automatization of trypsin digestion in proteomics

Type of thesis: Bachelor

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine

Supervisor: Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: This bachelor thesis is focused on the automatization and optimalization of trypsin digestion in bottom-up proteomics. It compares three methods – in-solution digestion, filter-based digestion (FASP) and Tecan robot preparation – and determines the number of peptides, sequence coverage and efficiency in order to find out which method is the most effective.

Keywords: Bottom-up proteomics; peptides; in solution digestion, FASP; Tecan; trypsin; mass spectrometry

Number of pages: 47

Number of appendices: 0

Language: Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Strategie proteomické analýzy</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Top-down proteomika</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Middle-down proteomika</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Bottom-up proteomika</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>Kroky před digescí – denaturace, redukce, alkylace</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Digesce</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Enzymatická digesce</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Neenzymatická digesce</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Experimentální provedení digesce</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>Analýza výsledných peptidů</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Metody separace</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Hmotnostní spektrometrie</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Validace získaných dat</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Limitace</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Optimalizace</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiál</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Chemikálie</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Roztoky</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Biologický materiál</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Přístroje</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Software</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Postup štěpení v roztoku</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Postup štěpení na filtru (FASP)</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Pracovní postup zpracování vzorků pomocí robota</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Hmotnostní analýza</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Zpracování výsledků z MS analýzy</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Způsob vyhodnocení jednotlivých měření</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>In-solution digesce</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>FASP</b> .....	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>In-solution vzorky připravené robotem</b> .....	<b>34</b>

<b>4.4</b>	<b>Manuální kontrola in-solution vzorku připraveného robotem.....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>46</b>

## **CÍLE PRÁCE**

Mezi hlavní cíle této bakalářské práce patří:

1. Literární rešerše.
2. Laboratorní část – základy přípravy proteomických vzorků.
3. Optimalizace protokolu pro trypsinovou digesci – porovnání účinností a dalších parametrů měření jednotlivých metod štěpení.



# 1 ÚVOD

V živé buňce probíhá současně mnoho biologických procesů. Každý z nich zahrnuje syntetické, katalytické a regulační funkce, které jsou většinou zabezpečovány proteiny dále organizovanými do struktur vyššího řádu. Proto jsou právě proteiny předmětem intenzivního výzkumu ve vědě (Aebersold and Mann, 2016).

Proteomika je věda, která studuje proteom, tedy kompletní soubor všech proteinů v živé buňce, tkáni nebo organismu, jenž reprezentuje konečný výsledek genové transkripce, translace a připojování post-transkripčních modifikací (Tsiatsiani and Heck, 2015).

Definici tohoto termínu jako první uvedl Marc Wilkins spojením slov „protein“ a „genomika“, která analogicky popisuje soubor všech genů buňky (Liebler *et al.*, 2002).

Jejím předmětem studia jsou kvantitativní změny úrovně exprese proteinů a jejich aplikace ve vývoji léčiv, diagnostice a terapii (Westermeier *et al.*, 2008). Nabízí doplňkovou informaci ke genomice, transkriptomice, metabolomice, metagenomice a dalším „omics“ vědám, která je nezbytná pro pochopení biologických procesů na jejich molekulární úrovni (Misra *et al.*, 2018).

Proteom je často mnohem komplexnější než genom díky post-transkripčním modifikacím, jež utváří jeho různé proteoformy (Zhang *et al.*, 2014). K jeho složitosti přispívá i tzv. alternativní sestřih, který zvyšuje složitost proteomu vytvářením rozdílných transkriptů, kdy jsou introny – nekódující oblasti – vystřiženy, a exony tvořící v procesu translace protein je možné kombinovat různými způsoby (Baralle and Giudice, 2017).

Proteomický experiment může pracovat s celými proteiny nebo rozštěpit jejich polypeptidový řetězec v místě určité aminokyseliny pomocí proteolytických enzymů, a tak analyzovat jejich jednotlivé peptidy, které následně podstupují analýzu na hmotnostním spektrometru (mass spectrometer, MS).

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací trypsinové digesce, která je nevyhnutelnou součástí postupů při tzv. bottom-up proteomické analýze. Cílem je porovnat metody štěpení v roztoku (in-solution digestion), štěpení na filtru (filter-aided sample preparation, FASP) s přípravou vzorků proteinů na přístroji Tecan a zjistit, která metoda má nejvyšší efektivitu při zpracování hovězího sérového albuminu (BSA) jako vzorku proteinu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Strategie proteomické analýzy

V proteomice existují dva hlavní přístupy k analýze proteinů – bottom-up a top-down (Obr. 1). Uvádí se i třetí tzv. middle-down proteomický přístup, který kombinuje bottom-up a top-down analýzu (Zhang *et al.*, 2014). Výsledná hloubka pokrytí proteomu je závislá na zvolené metodě přípravy vzorku a technice separace (Ludwig *et al.*, 2018).

#### 2.1.1 Top-down proteomika

Top-down proteomická analýza nezahrnuje štěpení proteinů proteolytickými enzymy na odpovídající peptidy. Proteiny jsou nejprve extrahovány, dochází k separaci celé směsi na polyakrylamidovém gelu nebo pomocí kapalinové chromatografie (liquid chromatography, LC) následované MS analýzou intaktních proteinů a závěrečným vyhodnocením dat (Toby *et al.*, 2016).

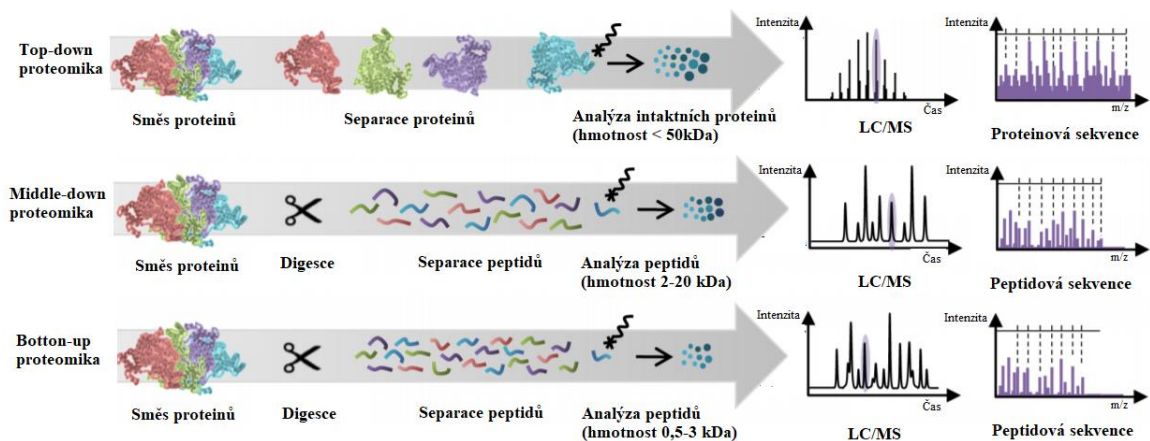
Využívá se především ke studiu proteoforem. Tento přístup má tu výhodu, že všechny modifikace nacházející se na stejné molekule, mohou být měřeny společně, což umožňuje jejich přesnou identifikaci (Aebersold and Mann, 2016).

Obecně je analýza intaktního proteinu méně účinná než měření jeho peptidů. Umožňuje však vyšší pokrytí sekvence, a tak dává možnost zkoumat místně specifické post-translační modifikace proteinů, které mohou být důležité pro jejich biologickou funkci (Dvořáková *et al.*, 2014).

#### 2.1.2 Middle-down proteomika

Middle-down analýza je jeden z přístupů, který ve svém postupu zahrnuje štěpení (Switzar *et al.*, 2013). Pracuje se zde s podstatně delšími peptidy, než je běžných 0,5-3 kDa. Tímto způsobem se výsledné peptidové směsi stávají méně komplexní a vytvořené peptidy mají téměř vždy jedinečnou sekvenci nesoucí současně nespočet post-transkripčních modifikací, které je možné určit (Tsiatsiani and Heck, 2015).

Pro takovýto přístup není trypsin, nejpoužívanější proteolytický enzym, příliš vhodný, jelikož katalyzuje hydrolýzu vazeb za dvěma aminokyselinami – argininem a lysinem – a tak vytváří krátké peptidy. Nejčastěji se využívá Asp-N (peptidyl-Asp metalopeptidasa), Lys-C (lysyl endopeptidasa) a Glu-C (glutamyl peptidasa I, Tsiatsiani and Heck, 2015).



Obrázek 1: Srovnání postupů top-down, middle-down a bottom-up proteomické analýzy proteinů. U top-down přístupu se proteiny neštěpí, ale dochází rovnou k jejich separaci a následné analýze. Middle-down a bottom-up ve svých protokolech štěpení zahrnují. Liší se použitím proteolytických enzymů, a tak i délkou výsledných peptidů. Převzato z Switzar *et al.*, (2013).

Do této doby byla middle-down proteomika využívána například ke studiu post-transkripčním modifikací histonů, polyubiquitinových řetězců anebo ribozomálního proteomu (Tsiatsiani and Heck, 2015).

### 2.1.3 Bottom-up proteomika

Bottom-up je nejrozšířenější pracovní postup během přípravy vzorků v proteomice (Aebersold and Mann, 2016). Spočívá ve štěpení, tzv. digesci proteinů na peptidy. Je možné provést štěpení na gelu (in-gel digestion) nebo v roztoku (in-solution digestion) (Ludwig *et al.*, 2018). Toto štěpení probíhá za účasti proteolytických enzymů, přičemž nejpoužívanějším je bezesporu trypsin.

V případě gelové bottom-up analýzy se celé proteiny separují na polyakrylamidovém gelu pomocí elektroforézy na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, kdy dochází k migraci v elektrickém poli (1D – jednorozměrná, 2D – dvourozměrná elektroforéza). Vzniklé skvrny s požadovanými proteiny jsou z gelu vyříznuty a poté štěpeny pomocí proteolytických enzymů na peptidy. Proces pokračuje MS analýzou, které ještě předchází ionizace pomocí ESI (electrospray ionization; ionizace elektrosprejem) nebo MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization; ionizace laserem za účasti matrice). Gelová analýza je používána v případě, že se vzorek skládá ze směsi více komplexních proteinů, jelikož se štěpení po separaci účastní ve výsledku jen jeden nebo několik proteinů (Zhang *et al.*, 2014).

Bottom-up přístup je možné aplikovat i bez využití separace proteinů na gelu – jedná se o tzv. bezgelovou analýzu. Výsledkem je opět odpovídající směs peptidů.

Proteiny se štěpí přímo v roztoku nebo je možná digesce na filtru např. metodou FASP (Ludwig *et al.*, 2018).

Jednotlivé kroky štěpení v roztoku se provádí v jedné mikrozkušavce, kdy se k vzorku proteinů přidávají všechny roztoky. Tento postup je možné použít při práci s komplexní proteinovou směsí. Je důležité mít na paměti, že abundantnější proteiny se snáze identifikují, proto je k usnadnění identifikace minoritních proteinů nutná frakcionace (např. purifikace organel aj.). Rozdíly ve výtěžku ze štěpení se mohou u jednotlivých vzorků lišit díky komplexnosti vzorku a jeho fyzikálních a chemických vlastností (López-Ferrer *et al.*, 2006).

Tzv. shotgun proteomika představuje specifický bottom-up přístup, jehož cílem je získat největší možné množství peptidů, a tedy i proteinů. Proteiny jsou štěpeny v roztoku a bez jakéhokoliv frakcionace podstupují separování a analýzu pomocí LC-MS/MS (Dvořáková *et al.*, 2014).

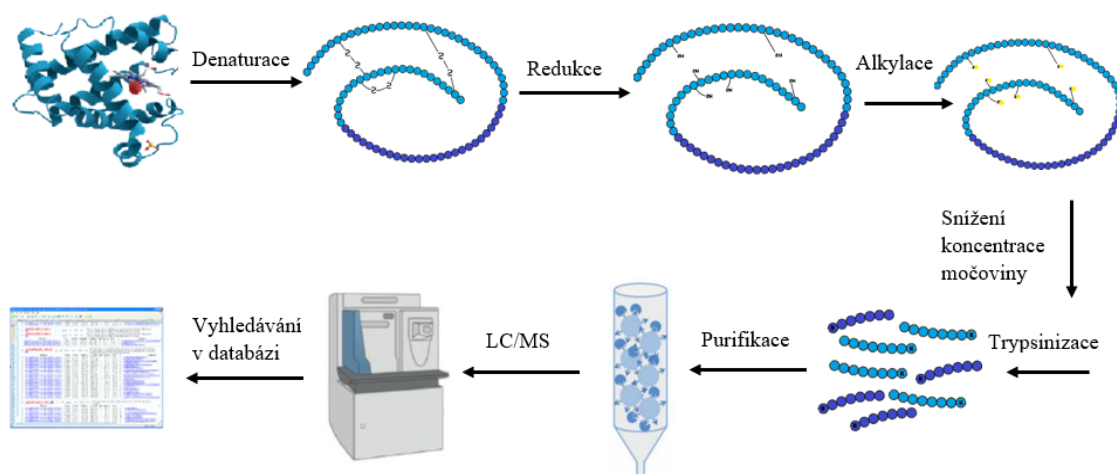
Analýza peptidů má několik výhod, které převažují nad analýzou celých proteinů. Jsou jimi např. efektivnější separace pomocí kapalinové chromatografie a nižší molekulová hmotnost, jež vedou k lepší senzitivě (Switzar *et al.*, 2013).

## **2.2 Kroky před digescí – denaturace, redukce, alkylace**

Pracovní postup při zpracování proteomického vzorku se může lišit v závislosti na jeho původu a na proteinu zájmu. Navzdory odlišnostem v jednotlivých krocích přípravy je zde společný krok pro všechny bottom-up experimenty zaměřené na zpracování peptidů a tím je digesce.

Příprava proteomického vzorku (Obr. 2) je často zdlouhavá procedura, která nutně vyžaduje předúpravu před samotnou digescí (Switzar *et al.*, 2013). Typický protokol zahrnuje denuraci proteinů s použitím chaotropních látek jako je močovina, dodecylsulfát sodný (SDS) nebo guanidin, která vede k porušení terciální a sekundární struktury proteinu přerušením nekovalentních interakcí. Jedná se o klíčový krok v přípravě vzorku, jenž posléze umožňuje rychlé a reprodukovatelné štěpení vzorku (Dittrich *et al.*, 2015; Switzar *et al.*, 2013).

Redukce kovalentního disulfidického můstku dithiotreiolem (DTT) a následná alkylace cysteinových residuí kyselinou jodoctovou nebo jodacetamidem (IAA) je potřebná jako opatření k získání úplně rozvinutého proteinu, což je předpokladem pro kvantitativní enzymatické štěpení (Dittrich *et al.*, 2015).



Obrázek 2: Schéma obecného bottom-up proteomického protokolu: nejprve dochází k denaturaci proteinu chaotropním činidlem (močovinou) následované redukcí kovalentního disulfidického můstku a alkyací cysteinových residuí. Před samotnou trypsinizací je třeba snížit koncentraci chaotropního činidla, jelikož by omezilo aktivitu trypsinu. Tak jsou nastaveny vhodné podmínky pro digesci. Po digesci dochází k purifikaci výsledných peptidů a jejich podrobení MS analýze, vyhodnocení výsledků pomocí vyhledávání a porovnávání v databázi.

## 2.3 Digesce

Pojmem „digesce“ se rozumí štěpení komplexního proteinu na menší peptidy nebo jen několik málo aminokyselin. Tento proces je nezbytný pro analýzu na MS.

Vzorky pro rozsáhlé proteomické studie obvykle podstupují digesci za použití proteolytického enzymu (Ludwig *et al.*, 2018). V ideálním případě jsou v proteinech štěpeny peptidové vazby mezi specifickými aminokyselinami a výsledkem je produkce fragmentů, které jsou nejkompatibilnější s MS analýzou. Obzvláště peptidy skládající se z 6–20 aminokyselin jsou nejvhodnější pro MS analýzu a následné srovnávání výsledků s databází. Peptidy s méně než 6 aminokyselinami jsou příliš krátké na to, aby byla nalezena unikátní shoda v sekvenci právě při vyhledávání v databázi. Na druhou stranu je rovněž obtížné získat informaci o sekvenci u peptidů s řetězcem delším než 20 aminokyselin.

Jinými slovy, cílem digesce proteinů je produkce velkého výtěžku proteinů s optimální délkou sekvence aminokyselin pro MS analýzu (Liebler *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Enzymatická digesce

Digesce může probíhat díky proteasám, též proteolytickým enzymům nebo peptidasám, jejichž jediným úkolem je katalyzovat specifické štěpení, hydrolýzu peptidové vazby. Z biochemického hlediska se řadí do skupiny hydrolas (Liebler *et al.*, 2002). Dělí se na

edopeptidasy a exopeptidasy. Endopeptidasy štěpí substrát uvnitř polypeptidového řetězce, zatímco exopeptidasy odštěpují aminokyseliny z N nebo C konce vlákna, a tak je možné je dále rozdělit na aminopeptidasy nebo karboxypeptidasy (Tsiatsiani and Heck, 2015).

Rozlišují se čtyři hlavní skupiny proteas z hlediska přítomné katalytické skupiny: serinové proteasy obsahující v aktivním centru aminokyselinu serin, cysteinové obsahující cystein, aspartátové se začleněným zbytkem kyseliny asparagové a metaloproteasy obsahující ve svém aktivním centru kovové ionty  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  či  $Mn^{2+}$ .

Tyto enzymy mají vysoký stupeň specifity, když štěpí polypeptidový řetězec vždy za specifickou aminokyselinou (Switzar *et al.*, 2013).

Ačkoliv bylo purifikováno množství proteas, pro analytickou proteomiku je třeba stabilní, důkladně popsaný enzym s definovanými vlastnostmi. Tyto enzymy musí být dostupné ve vysoké čistotě a množství a být dostatečně účinné pro jejich aplikaci za různých okolností.

Enzymy hydrolyzující peptidové vazby v proteinech jsou například trypsin, chymotrypsin, Glu C, Lys C a Asp N (Tab. 1).

### 2.3.1.1 Trypsin

Trypsin je nejpoužívanější proteasa a získává se převážně z prasečího nebo hovězího pankreatu. Nejčastěji se ve své aktivní formě vyskytuje jako jednořetězcový  $\beta$ -trypsin (Obr. 3) a dvouřetězcový  $\alpha$ -trypsin, který je produkován autolýzou  $\beta$ -trypsinu. Další štěpení uvnitř řetězce vede ke vzniku pseudotrypsinu ( $\psi$ -trypsin), který se skládá ze tří řetězců navzájem spojených disulfidickými můstky (Perutka and Sebela, 2018). Velkou výhodou je jeho snadná purifikace. Katalyzuje štěpení proteinu v místech karboxylové skupiny aminokyselin argininu a lysinu, pokud po nich nenásleduje aminokyselina prolin. Rozestupy argininových a lysinových residuí

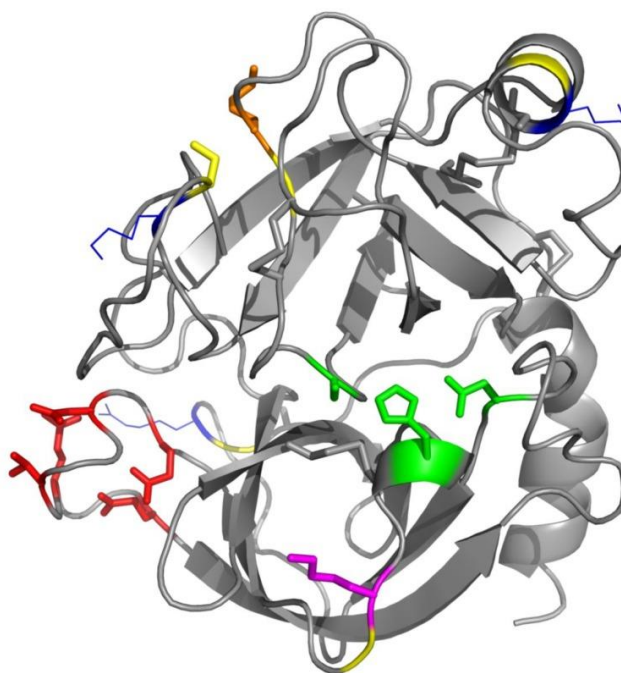
Tabulka 1: Přehled nejpoužívanějších proteolytických enzymů. Převzato z (Tsiatsiani and Heck, 2015).

Enzym:	Specifické štěpení:	Rozsah pH optima:
Trypsin	K, R, P	8,0
Chymotrypsin	W, Y, F, P	7,0-9,0
Glu C	E	4,0-7,8
Lys C	K	8,5-8,8
Asp N	D	7,0-8,0

jsou v mnoha proteinech ideální pro to, aby měly naštěpené peptidy vhodnou délku pro MS analýzu (Liebler *et al.*, 2002). Účinnost trypsinu může být ovlivněna jeho koncentrací, nevhodným skladováním i nevhodnými podmínkami digesce (teplota, pH, čas, přítomnost inhibitorů proteas a detergentů). Jeho pH optimum se pohybuje kolem hodnoty osm (Burkhart *et al.*, 2012).

Obrovská preference k trypsinu v proteomice je jasně reflektovaná v počtu datových souborů peptidů vzniklých štěpením tímto enzymem v Global Proteome Machine Database (GPM DB) k listopadu 2014. Enzymy jiné než trypsin připsaly k těmto datům pouze 4 %, což znamená, že 96 % uložených datových souborů pochází z trypsinizace. Tato výhoda vede k vyšší kvalitě MS spektra a následně snadnějšímu vyhledávání v databázi (Tsiatsiani and Heck, 2015). Ve specifických případech jako je nedostatek nebo naopak přemíra lysinu a argininu v sekvenci proteinu nebo pH inkompatibilita je občas nezbytné použít jiný proteolytický enzym (Switzar *et al.*, 2013).

Vícenásobná digesce (multiple digestion strategy) je způsob, jak zvýšit pokrytí identifikace proteinů skrze použití kombinace proteolytických enzymů. Enzymy mohou být přidány paralelně nebo postupně.



Obrázek 3: Krystalová struktura hovězího  $\beta$ -trypsinu. Aktivní místo s třemi aminokyselinami (zvýrazněno zeleně) je umístěno mezi dvěma p-barely (šedé šipky). Vazba, která je při vzniku  $\psi$ -trypsinu štěpená, je znázorněná oranžovým postranním řetězcem (Perutka and Sebela, 2018).

Pokud je třeba rozluštit sekvenci proteomu, je možné využít paralelního přidání několika enzymů, které zvýší počet identifikovaných proteinů a peptidů. Několik kombinací enzymů již bylo vyzkoušeno a využito, nicméně nejvyužívanější kombinací zůstává především trypsin ve spolupráci s endoproteasou Lys-C, Lys-N nebo Glu-C (Tab. 1). Obdobně se využívá i kombinace proteolytického enzymu a chemického roztoku (Switzar *et al.*, 2013).

### 2.3.2 Neenzymatická digesce

Neenzymatické štěpení za použití chemických roztoků je další alternativou. Může být dosaženo ředěným roztokem kyseliny mravenčí (HCOOH), kyseliny chlorovodíkové (HCl), kyseliny octové (CH<sub>3</sub>COOH) nebo s chemikáliemi jako jsou bromkyan (CNBr), 2-nitro-5-thiocyanobenzoát (NTCB) a hydroxylamin.

Elektrochemická oxidace je vedle chemických roztoků další metodou neenzymatického štěpení. Opět se jedná o specifické štěpení polypeptidového řetězce, tentokrát za aminokyselinami tyrosin a tryptofan. Elektrochemicky generované peptidy mají okolo 2,4 kDa, a tak se stávají vhodné pro následnou analýzu na hmotnostním spektrometru. Značnou výhodou této metody je také její rychlost v řádu minut (Switzar *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Experimentální provedení digesce

Experimentální provedení digesce závisí na faktorech jako vybavení laboratoře, výchozí materiál, předchozí experimentální kroky a jiné. Rozlišují se tři základní provedení digesce – v roztoku, v gelu a pomocí mikroreaktoru.

Digesce v roztoku je blíže popsána v kapitole 2.3.1 Bottom-up digesce. Digesce v gelu je používána v případech, kdy proteiny byly před přípravou separovány pomocí gelové elektroforézy. V tomto uspořádání se využívá toho, že proteiny jsou navázány v gelu a je možné gel pomocí vody a acetonitrilu vysoušet a znovu hydratovat, a tak jej promývat (López-Ferrer *et al.*, 2006).

FASP je typickým příkladem mikroreaktoru. Redukce, alkylace, i digesce se provádí přímo na membráně filtru umístěné v mikrozkuhavce. Až naštěpené peptidy jsou dostatečně malé, aby mohly filtrem projít, a být izolovány centrifugací (Manza *et al.*, 2005). Typicky lze touto metodou získat kolem 50 % výchozího materiálu (Sielaff *et al.*, 2017).



Základy metody FASP položila práce od Manza a kol. publikována v roce 2005 a o další modifikaci se postaral Wiśniewski a kol. v roce 2009 (Sielaff *et al.*, 2017). Na trhu se dnes vyskytuje množství komerčně dostupných mikrocentrifugačních filtrů (spin filters) lišících se velikostí póru v membráně filtru (Manza *et al.*, 2005).

Metoda FASP by měla snížit časovou náročnost přípravy, minimalizovat ztráty vzorků a poskytovat pokrytí identifikovaných proteinů sekvencí MS, které je ekvivalentní pro pokrytí proteinů naštěpených v roztoku (Manza *et al.*, 2005).

Obrovskou výhodou použití filtru oproti např. klasickému štěpení v roztoku je, že poskytuje větší flexibilitu v přípravě vzorků jako postupné štěpení a frakcionace vzorků, což zvyšuje hloubku proteomické analýzy a usnadňuje identifikaci málo abundantních proteinů (Wisniewski, 2016). Následně je snadné se filtrací zbavit kontaminantů jako jsou soli, pufrů a detergenty, které by mohly inhibovat štěpení nebo interferovat s následnou MS analýzou (Manza *et al.*, 2005).

## **2.4 Analýza výsledných peptidů**

Poté co jsou proteiny konvertovány na příslušné peptidy, je třeba separovat vzniklou směs, která by dala nástrojům lepší možnost získat užitečné údaje o složkách směsi (Liebler *et al.*, 2002).

Jako primární nástroj pro identifikaci proteinů, resp. peptidů se používá hmotnostního spektrometru (McHugh and Arthur, 2008). U jakéhokoli experimentu s MS by se měl zvážit typ instrumentace, aby nejlépe vyhovoval danému vzorku (Han *et al.*, 2008).

### **2.4.1 Metody separace**

Před samotnou analýzou na MS se peptidy separují. Účinná separace je nutná pro jednoznačnou identifikaci peptidů a fragmentů proteinů. Závisí na ni přesnost a citlivost experimentu s hmotnostní spektrometrií. (Yates *et al.*, 2009). Děje se tak pomocí metod vysokotlaké kapalinové chromatografie (High performance liquid chromatography, HPLC), SDS-PAGE elektroforézy, kapilární elektroforézy (CE) nebo isoelektrické fokusace (IEF) (Liebler *et al.*, 2002).

Vysokotlaká kapalinová chromatografie se skládá ze dvou fází – pevné stacionární a kapalně mobilní. Na rozdíl od běžné kapalinové chromatografie je obohacena o výkonné vysokotlaké čerpadlo, které celý proces separace urychluje a dosahuje se vyšší účinnosti

(Polyak *et al.*, 2017). Je schopna oddělit složky vzorku na základě náboje, molekulové velikosti, hydrofobicity a molekulárních interakcí (Hachey and Chaurand, 2004).

Dále se v proteomice běžně používají různé typy elektroforetických separací. Separace může probíhat na polyakrylamidovém (PAGE) nebo agarosovém gelu (Drabik *et al.*, 2016). SDS-PAGE je nejpoužívanější technikou elektroforézy. Iontový detergent dodecylsulfát sodný (SDS) denaturuje a váže se na peptidy, aby je rovnoměrně negativně nabil. Všechny peptidy vázané na SDS ve vzorku migrují gelem k pozitivně nabitě elektrodě. Peptidy s menší hmotností cestují gelem rychleji než ty s hmotností větší, a tak dochází k jejich separaci (Liebler *et al.*, 2002).

Kapilární elektroforéza je metoda, která umožňuje separace ionizovaných molekul ve skleněné kapiláře na základě jejich odlišné pohyblivosti v elektrickém poli. Kapilára je vždy naplněná roztokem základního elektrolytu, kterým bývá vodný roztok pufru. Transport molekul je zapříčiněn dvěma jevy – elektroosmotickým tokem a elektroforetickou migrací (Jorgenson and Lukacs, 1981). Současné aplikace CE sahají od stanovení malých anorganických iontů po charakterizaci biomolekul s vysokou molekulovou hmotností. Tato metoda separace se stala cennou alternativou ke chromatografickým metodám (Voeten *et al.*, 2018).

Izoelektrická fokusace je elektroforetická technika, která byla vyvinuta k oddělení proteinů na základě rozdílů v jejich isoelektrické hodnotě pH nazývané „hodnoty pI“. Když je protein umístěn do média s různým pH a vystaven elektrickému poli, zpočátku se pohybuje směrem k elektrodě s opačným nábojem. Zaostření je mechanismus ustáleného stavu s ohledem na pH. Proteiny se přibližují ke svým příslušným hodnotám pI různou rychlostí, ale zůstávají relativně fixní při těchto hodnotách pH po delší dobu. Klíčem k IEF je vytvoření stabilních gradientů pH v elektrických polích (Garfin, 1990).

## 2.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie se stala nejdůležitějším nástrojem pro identifikaci, charakterizaci a kvantifikaci proteinů a jejich post-transkripčních modifikací s vysokou účinností a ve velkém měřítku (Zhang *et al.*, 2014). Analýzou peptidů prostřednictvím MS je možné zjistit molekulovou hmotnost peptidů, a tak i celého proteinu (Gundry *et al.*, 2009). MS analýza dále poskytuje informaci o sekvenci naštěpených peptidů (Liebler *et al.*, 2002).

Hmotnostní spektrometr má tři základní části (Obr. 4) – zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (Liebler *et al.*, 2002).

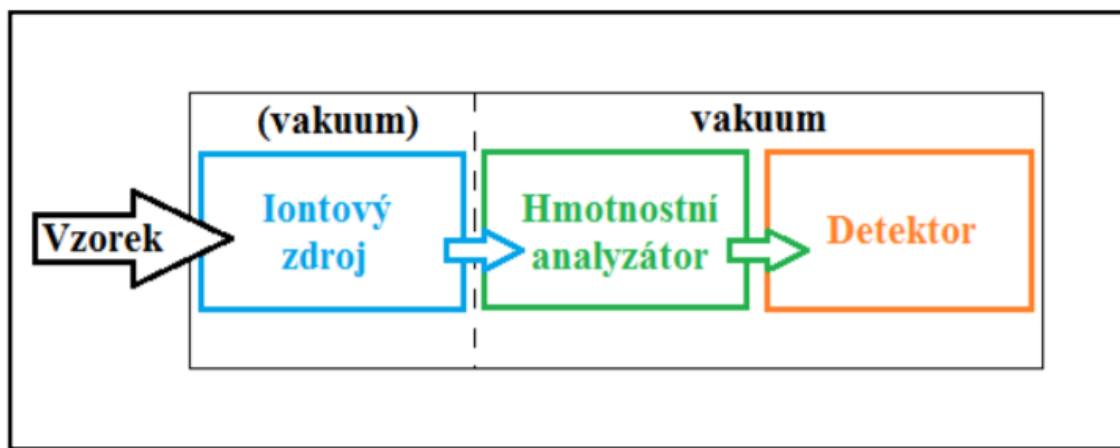
Zdroj konvertuje pevný vzorek na ionty plynné fáze vhodnou ionizační technikou (Han *et al.*, 2008). V proteomice se využívá tzv. měkkých ionizačních technik, které nezpůsobují fragmentaci vzorku. Běžné je tedy použití např. laseru za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI) anebo ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI). Při technice MALDI je vzorek smíchán s matricí (pro peptidy se používá např.  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina a pro proteiny kyselina sinapová) a následně aplikován na kovovou destičku, na které je ionizován krátkými laserovými impulzy. Dochází zde převážně ke vzniku jednonásobně nabitých iontů (Dvořáková *et al.*, 2014).

Při ESI se jedná o ionizaci vzorku v roztoku, a tak je obvykle spojován s technikou separace jako je kapalinová chromatografie (LC-ESI) nebo kapilární elektroforézou (CE-ESI). Vytváří se nabitě kapky vzorku obalené rozpouštědlem. Postupným odpařováním rozpouštědla se uvolňují vytvořené ionty. Tímto postupem se vytváří vícenásobně nabitě ionty (Dvořáková *et al.*, 2014).

Hmotnostní analyzátor rozděluje ionty podle poměru hmotnost/náboj (mass/charge ratio,  $m/z$ ). Existuje několik typů, které jsou založeny na různých fyzikálních principech týkající se zmíněného poměru  $m/z$  (Dvořáková *et al.*, 2014). Pro účely proteomiky se běžně využívá pět typů analyzátorů - kvadrupól (quadrupole, Q), iontová past (ion trap, IT), analyzátor doby letu (time of flight, TOF), iontová cyklotronová rezonance (ion cyclotron resonance, ICR) a orbitrap (Han *et al.*, 2008).

Iontová past, orbitrap a iontová cyklotronová rezonance separují ionty na základě jejich  $m/z$  rezonanční frekvence. Kvadrupól využívá stabilitu iontů, kdy je na elektrody aplikováno napětí. Analyzátor doby letu měří čas letu iontů, jelikož se liší jejich hmotnost, tak se bude lišit i doba jejich pohybu směrem k detektoru. Pro specifické potřeby mohou být sestaveny smíšené MS systémy, které kombinují více stejných nebo odlišných analyzátorů. (Han *et al.*, 2008).

Detektor ve formě elektronového násobiče analyzuje roztržené ionty na základě zmíněného poměru hmotnost/náboj. Data jsou automaticky zaznamenávána a zpracovávána pro další interpretaci (Liebler *et al.*, 2002).



Obrázek 4: Tři základní části MS – zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Vzorek je v iontovém zdroji ionizován, poté v hmotnostním analyzátoru dochází k jejich separaci podle poměru  $m/z$ . V poslední části dochází k detekci iontů. Hmotnostní analyzátor a detektor jsou vždy ve vakuu (Mečerodová, 2015).

MS systém je vybaven vakuovým čerpadlem, které vytváří v hmotnostním analyzátoru a detektoru vakuum, jež je pro jejich funkci vyžadováno (Liebler *et al.*, 2002).

Přestože je třeba, aby se data získaná z MS analýzy podrobila dalšímu zpracování, výstupem tohoto kroku je tzv. hmotnostní spektrum (Dvořáková *et al.*, 2014). Jedná se o graf závislosti hodnot  $m/z$  iontů (osa x) a jejich intenzit (osa y). Intenzita iontů bývá normalizována podle iontu s nejvyšší naměřenou intenzitou, na kterou připadá hodnota 100 %. Vzhled hmotnostního spektra souvisí s použitou ionizační technikou a režimem měření (kladný nebo záporný mód, rozlišení). V hmotnostním spektru jsou znázorněny monoisotopické hmotnosti iontů – hmotnosti izotopů prvků měřené sloučeniny (Nicolescu, 2017).

### 2.4.3 Validace získaných dat

Po provedení MS analýzy je dalším krokem v proteomickém postupu konečná identifikace proteinů nebo peptidů (Gundry *et al.*, 2009).

Esenciálním nástrojem zde je kolekce softwarů, které dokážou přiřadit získaná data z MS ke specifické sekvenci proteinů v databázi (Liebler *et al.*, 2002).

Parametry pro vyhledávání by měli brát v úvahu organismus, ze kterého vzorek pochází, typ štěpení – chemické nebo enzymatické – a kroky redukce a alkylace.

Proteinová databáze je typicky soubor aminokyselinových sekvencí např. ve FASTA formátu, proti které jsou postavena data z MS, a je vygenerována sekvence peptidu *in silico*. Pokud databáze nezahrnuje vyhledávaný protein, nebude nalezena shoda (Gundry *et al.*, 2009).

Proteinové databáze jsou dnes dostupné online na internetu, což představuje značnou výhodu – prováděné aktualizace jsou okamžitě dostupné. Mnoho proteinových databází také umožňuje zadavatelům ukládat data a databázové servery mohou kontrolovat formát dat a poskytovat okamžitou zpětnou vazbu (McHugh and Arthur, 2008).

Většina sekvenčních databází obsahuje nástroj pro vyhledávání sekvencí a křížové odkazy na položky jiných proteinových a genových databází.

SEQUEST bylo jedním z prvních vyhledávačů v databázi vyvinuté k plnění úkolu automatizace identifikace proteinů (Eng *et al.*, 1994). Jednou z důležitých vlastností programu SEQUEST je jeho více hodnotících kritérií. Nejprve filtruje databázové peptidové sekvence pro kandidátní peptidy pomocí enzymatické specifity (Sadygov, 2015).

Mnoho sekvenčních databází, jako je UniProt, také poskytuje vyhledávání textu pomocí například názvů proteinů nebo klíčových slov. Pro studium nového proteinu se doporučuje nejprve provést sekvenční vyhledávání pomocí BLAST, jestli je proteinová sekvence dostupná.

Nejrozšířenější databáze pro zpracování a distribuci proteinových struktur je PDB. Struktury v PDB byly experimentálně stanoveny rentgenovou krystalografií, NMR, elektronovou mikroskopií atd. (Xu and Xu, 2012)

Kromě toho jsou zde nástroje bioinformatiky, které umožňují predikci 3D struktury, analýzu proteinových domén a motivů, interakce protein-protein (Perez-Riverol *et al.*, 2015).

Tabulka 2: Přehled některých databází využívaných v proteomice (Perez-Riverol *et al.*, 2015).

Název databáze:	Poskytovaná informace:
UniProt	Sekvence
NCBI	Sekvence
PDB	Struktura
SCOP	Klasifikace do proteinových rodin
DIP	Interakce protein-protein, metabolické dráhy

## 2.5 Limitace

První velká omezení v proteomice se objevuje ještě před započítím jakéhokoliv proteomického protokolu. Snahou a cílem této vědy je identifikace všech proteinů podílejících se na procesech v buňce. To z důvodu vysoké složitosti vzorku není možné (Dvořáková *et al.*, 2014).

Digestce proteinů v bottom-up přístupu má za následek ztrátu informace jako je přítomnost nebo místo výskytu post-translační modifikace (PTM) anebo ztrátu schopnosti rozlišit příbuzné proteiny díky neschopnosti detekovat určité části proteinové sekvence v důsledku nedostačující velikosti nebo nevýhodnými vlastnostmi ionizace vzniklých peptidů. Naopak u top-down proteomiky, kdy ke štěpení nedochází, se proteiny musí separovat a další analýzu podstupuje pouze „protein zájmu“ (Zhang *et al.*, 2014).

Většina studií klade důraz na účinné odstranění detergentů. Nejpoužívanějším je SDS, který ochotně solubilizuje proteiny v biologických matricích. Nicméně je právě odstranění SDS kritické pro pozdější LC-MS analýzu, jelikož může dojít ke kontaminaci kapalinové chromatografie, a tak ovlivňuje výsledné hmotnostní spektrum. Proto se FASP stal nejvyužívanější metodou pro odejmutí detergentu a digesti zároveň (Ludwig *et al.*, 2018).

Hlavní omezující kroky pro rychlou identifikaci proteinu jsou počet proteinových záznamů v databázi a zpracování vzorku. Druhé omezení je způsobeno protokoly pro manipulaci běžně používanými pro identifikaci proteinu. Tradičně jsou tyto protokoly zdlouhavé a mají mnoho kroků. Kromě toho je pro enzymatickou digesti vyžadován čas – minimálně 4 hodiny, nicméně se často štěpí přes noc (18 hodin; López-Ferrer *et al.*, 2006).

## 2.6 Optimalizace

Cílem optimalizace procesu je určit a zajistit stálé podmínky přípravy proteomického vzorku, zvýšit jeho reprodukovatelnost, aby se usnadnilo srovnávání údajů mezi laboratořemi, a aby byl tento proces méně náročný na zpracování (Quadroni and James, 1999).

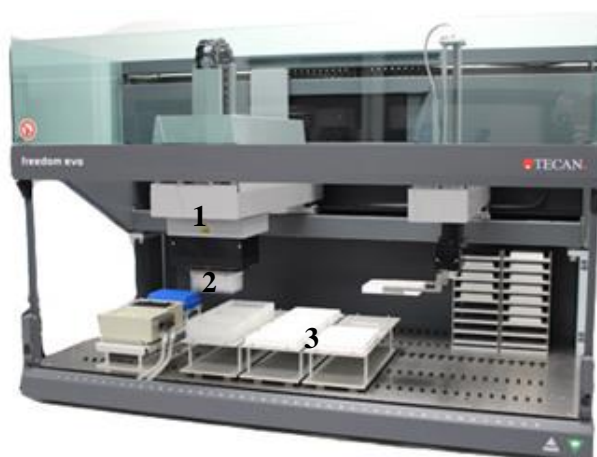
Právě příprava vzorků a analýza dat jsou dvěma překážkami na cestě k automatizované a kvantitativní analýze (Richardson *et al.*, 2011).

Protokoly v proteomice bývají často pracné, jelikož vyžadují mnoho kroků manipulace se vzorky. Při zpracování většího množství vzorků podstupujících digesti je důležité, aby byly pro všechny současně připravované vzorky zachovány stejné

podmínky. V případě robota mající pouze jednu pipetovací jehlu – autosampler – bývá největší výzvou značná doba provedení jednoho reakčního kroku, takže je čas zahájení reakce velmi odlišný. Každý reakční krok se skládá z více postupů, včetně přenosu činidla, míchání a mytí jehel. Autosampler se často používá v klinických laboratořích, protože umožňuje zvýšení přesnosti a produktivity přípravy (Richardson *et al.*, 2011).

Vyhledávány jsou i 96-jamkové formáty umožňující přípravu jednoho typu vzorku pomocí robota (Switzar *et al.*, 2013). Příprava vzorků, sériová ředění a přenosy činidel jsou příklady pipetovacích kroků připravované automatickými pipetovači, které opět vyžadují přesnost. Příkladem takového pipetovače je Tecan Freedom Evo (Obr. 5; (Gu *et al.*, 2006).

Proces optimalizace a automatizace se nezastaví ani, jakmile se provede vyhledávání v databázi. Vysoká propustnost proteinové analýzy vyžaduje vývoj softwarových nástrojů, které napomáhají interpretaci dat (Schweppe *et al.*, 2020).



Obrázek 5: Automatický pipetovač Tecan – (1) Automatické rameno (2) pipetovací jehly s jednorázovými plastovými špičkami (3) prostor s vyhrazenými pozicemi pro umístění 96-ti jamkové destičky se vzorky, nádoby s reakčními roztoky a boxy se špičkami. Převzato z [www.scimed.com.sg](http://www.scimed.com.sg)

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

Deionizovaná vody určená pro MS analýzu (MS H<sub>2</sub>O)

dodecylsulfát sodný (SDS, NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>)

dithiotreitol (DTT, C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>)

močovina (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O)

jodacetamid (IAA, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>INO)

Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

kyselina chlorovodíková (HCl)

methanol (CH<sub>3</sub>OH)

kyselina triflouroctová (TFA, C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)

acetonitril (ACN, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N)

hydrogenuhličitan amonný (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)

hydrogenfosforečnan draselný (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

#### 3.1.2 Roztoky

Denaturační pufr (8 mol.l<sup>-1</sup> močovina; 0,4 mol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; 0,1% SDS v MS H<sub>2</sub>O)

Dithiotreitol (0,3 mol.l<sup>-1</sup> DTT v MS H<sub>2</sub>O)

Hydrogenfosforečnan draselný (100 mmol.l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v MS H<sub>2</sub>O)

UA (8 mol.l<sup>-1</sup> močovina v 0,1 mol.l<sup>-1</sup> Tris/HI při pH 8,5)

Jodacetamid pro in-solution digesci (0,5 mol.l<sup>-1</sup> IAA v MS H<sub>2</sub>O)

Jodacetamid pro FASP (0,05 mol.l<sup>-1</sup> IAA v UA)

ABC roztok (0,05 mol.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> v MS H<sub>2</sub>O)

ACN s TFA (80% ACN s 0,1% TFA v MS H<sub>2</sub>O; 1% ACN s 0,1% TFA v MS H<sub>2</sub>O)

BSA protein standardy (koncentrace 125 µg.ml<sup>-1</sup>; 250 µg.ml<sup>-1</sup>; 500 µg.ml<sup>-1</sup>; 750 µg.ml<sup>-1</sup>; 1000 µg.ml<sup>-1</sup>; 1500 µg.ml<sup>-1</sup> a 2000 µg.ml<sup>-1</sup>.)

BCA assay kit (roztok reagensie A – uhličitanový pufr a činidlo BCA; reagensie B – roztok síranu měďnatého v poměru 50:1)



### 3.1.3 Biologický materiál

Jako vzorek proteinů byl ve všech případech použit hovězí sérový albumin. V laboratoři je dostupný o koncentraci  $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Štěpení bylo provedeno proteolytickým enzymem trypsinem.

### 3.1.4 Přístroje

Centrifugační filtrační mikrozkuřavky Microcon YM-30 (Millipore, Francie)

Spektrofotometr PerkinElmer Envision (PerkinElmer, USA)

Centrifuga Eppendorf (Eppendorf, Německo)

Termomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

Vakuová odparka Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo)

Kapalinový chromatograf Thermo UltiMate 3000 spojený s hmotnostním spektrometrem

Thermo Orbitrap Fusion (Thermo, Německo)

Pipetovací robot Tecan Freedom Evo (Tecan, Švýcarsko)

### 3.1.5 Software

Thermo Excalibur verze 4.2.47

MaxQuant verze 1.6.7.0

EnSpire Manager verze 4.10.3005.1440

Zotero verze 5.0.84

Microsoft Excel 2010

Databázi UniProt, druh *Bos taurus*, stažena dne 13. 10. 2017

## 3.2 Metodika

### 3.2.1 Postup štěpení v roztoku

#### Štěpení proteinů:

Byly připraveny vzorky proteinu BSA – vzorky IN1, IN2, IN3. Každý vzorek obsahoval 200  $\mu\text{g}$  BSA. Do mikrozkuřavky k BSA se přidalo 100  $\mu\text{l}$  denaturačního pufru.

Pro redukci disulfidických můstků se použilo 10  $\mu\text{l}$  0,3  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  DTT, přičemž se vzorky ponechaly inkubovat po dobu 1 hodiny při teplotě 37°C.

Procesem alkylace pomocí 18,5  $\mu\text{l}$  0,5  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  IAA se na vzniklé volné thiolové skupiny navázaly alkyly. IAA je látka choulostivá na světlo, proto bylo nutné inkubovat vzorky 30 minut ve tmě při pokojové teplotě.

Po uplynutí této doby se vzorek zředil 1 ml hydrogenfosforečnanu draselného. Účelem tohoto kroku bylo snížit koncentraci močoviny pod  $2 \text{ mol.l}^{-1}$ , jelikož vyšší koncentrace by mohla negativně ovlivnit činnost trypsinu.

Posledním krokem bylo právě přidání trypsinu ke vzorku. Používá se 1  $\mu\text{g}$  trypsinu na 200  $\mu\text{g}$  proteinu ve vzorku. Trypsinizace probíhala přes noc (18 hodin).

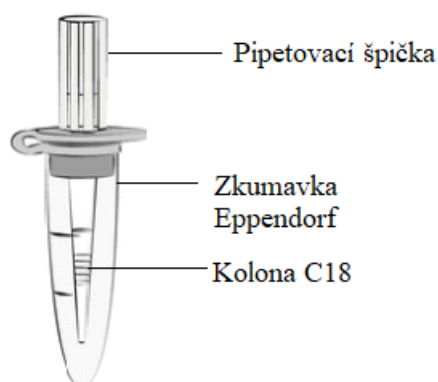
### **Purifikace:**

Purifikace proteinů probíhala na C18 „Stage tips“ (Obr. 6), které bylo nejprve třeba aktivovat. Kolony se promývaly a aktivovaly roztoky v tomto pořadí: 100  $\mu\text{l}$  methanolu; 100  $\mu\text{l}$  80% ACN s 0,1% TFA; 100  $\mu\text{l}$  1% ACN s 0,1% TFA. Promývání se dvakrát opakovalo.

Během toho bylo možné upravit pH vzorku pomocí TFA na hodnotu 3 za účelem lepšího zachycení požadovaných peptidů na koloně.

Po zavedení vzorků do kolon byly dvakrát promyty 100  $\mu\text{l}$  1% ACN s 0,1% TFA. Peptidy zůstávaly zachyceny na membráně C18. Mikrozkušavky se „Stage tips“ byly centrifugovány (3000 g, 2 minuty). Následně se jejich obsah eluoval do vyměněné mikrozkušavky 100  $\mu\text{l}$  80% ACN s 0,1% TFA, přičemž byl tento krok opakován dvakrát.

Mikrozkušavky se umístily do vakuové sušičky, dokud se tekutý obsah neodpařil a na stěnách nezůstaly jen vysrážené peptidy. Vzorek se následně rozpustil ve 100  $\mu\text{l}$  1% ACN 0,1% TFA.



Obrázek 6: C18 „Stage tips“ kolona připravená z mikrozkušavky a pipetovací špičky pro účely purifikace peptidů. Převzato a upraveno z Ruprecht *et al.*, (2017).

### **Měření obsahu proteinů BCA:**

Bylo potřeba zjistit koncentraci proteinů, resp. peptidů v jednotlivých vzorcích. K tomu sloužil tzv. BCA assay. Na 96-ti jamkovou destičku bylo napipetováno vždy 25  $\mu\text{l}$  BCA standardů o příslušných koncentracích. Jako blank byla použita MS  $\text{H}_2\text{O}$ .

Vždy se napipetovalo 25  $\mu\text{l}$  purifikovaných vzorků peptidů (vzorky IS1, IS2, IS3). Jako jejich blank sloužil roztok 1% ACN 1%TFA – poslední roztok, ve kterém byly peptidy rozpuštěny.

Do všech jamek bylo následně napipetováno 200  $\mu\text{l}$  roztoku pro BCA. Destička byla inkubována 30 minut při 37 °C. Na spektrofotometru se následně změřila absorbance při vlnové délce  $\lambda = 562 \text{ nm}$ .

Z naměřených hodnot byla v programu Excel vytvořena kalibrační přímka a z rovnice lineární regrese vypočtena koncentrace proteinů ve vzorcích a objem vzorku dostačující pro MS analýzu. Vzorky se nanuly do vialek a takto byly analyzovány pomocí LC-MS.

### **3.2.2 Postup štěpení na filtru (FASP)**

#### **Štěpení proteinů:**

Byly připraveny vzorky proteinu BSA – vzorky F1, F2, F3. Digesce byla provedena na filtru Microcon YM-30 ve filtrační mikrozkuhavce (Obr. 7). Na filtr mikrozkuhavky bylo napipetováno 30  $\mu\text{l}$  proteinů s 200  $\mu\text{l}$  UA. Takto připravené vzorky se centrifugovaly při 14 000 g po dobu 15 minut. Obsah mikrozkuhavky, který prošel přes filtr, se vylil a bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  0,05  $\text{mol.l}^{-1}$  jodacetamidu v UA.

Mikrozkuhavky se následně nechaly protřepat při 600 rpm v termomixeru po dobu 1 minuty a inkubovat ve tmě 20 minut. Po inkubaci byly mikrozkuhavky stočeny při 14 000 g 10 minut. Na filtr bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  UA a mikrozkuhavky byly centrifugovány při 14 000 g 15 minut. Tento krok byl zopakován dvakrát. Přidalo se 100  $\mu\text{l}$  0,05M ABC a mikrozkuhavky byly opět centrifugovány při 14 000 g po dobu 10 minut. Tento krok byl opět zopakován dvakrát.

Filtry byly přeneseny do nových mikrozkuhovek a následně mohl být přidán 1  $\mu\text{g}$  trypsinu. Mikrozkuhavky se nechaly třepat při 600 rpm v termomixeru po dobu 1 minuty. Vzorky byly rovněž inkubovány při 37 °C přes noc (18 hodin).



Obrázek 7: Mikrozkuhavka s filtrem pro in-solution štěpení metodou FASP. Převzato z [www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)

#### **Purifikace:**

Vzorky proteinů naštěpené na filtru se nejprve centrifugovaly při 14000 g po dobu 10 minut. Poté se přidalo 100  $\mu$ l ABC a opět se centrifugovalo při 14 000 g 10 minut. Supernatant se přemístil do C18 „Stage tips“ (Obr. 6). Postup purifikace je totožný s kapitolou 3.2.1 Postup štěpení v roztoku, purifikace.

#### **Měření obsahu proteinu pomocí BCA:**

Identicky jako v předchozím případě (kapitola 3.2.1 Postup štěpení v roztoku, měření obsahu proteinu pomocí BCA) byly nejprve napipetovány BSA standardy o příslušných koncentracích a jejich blank, dále vzorky zpracované metodou FASP (vzorky F1, F2, F3) a blank roztoku 1% ACN s 0,1% TFA.

### **3.2.3 Pracovní postup zpracování vzorků pomocí robota**

#### **Štěpení proteinů:**

Byly připraveny vzorky proteinu BSA – vzorky D1, D2, D3, D4, D5, D6 – pomocí automatického pipetovače Tecan (Obr. 5). Do 96-ti jamkové plastové destičky (Obr. 8), která je hlubší než ta běžně používaná např. pro BCA assay, musely být ručně napipetovány 4  $\mu$ l BSA.

V počítači, jež slouží k obsluze Tecana, byly naprogramované protokoly se stanovenými objemy, které přístroj pipetuje, a rovněž se zadanými pozicemi, na kterých se roztoky nachází.

I v případě přípravy vzorků Tecanem se začínalo denurací proteinů. Tecan přidal 100  $\mu$ l denaturačního pufru ke každému vzorku BSA. Pufr robot pipetoval z plastové mističky, která byla velikostí a tvarem vhodná pro umístění na jednu z pozic.

Následně přepipetoval 5  $\mu$ l DTT. DTT se přidalo z první pozice 96-ti jamkové destičky. Vzorky se inkubovaly po dobu 1 hodiny při 37 °C. Pak opět Tecan připipetoval 18,5  $\mu$ l IAA z třetí jamky destičky. Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Celá destička se překryla např. alobalem, aby inkubace probíhala ve tmě.

Z mističky se do každého vzorku přidal 1 ml hydrogenfosforečnanu draselného – robot ho přidával po objemech 400  $\mu$ l, 400  $\mu$ l a 200  $\mu$ l.

Trypsin byl umístěn v páté jamce destičky a Tecan přidal 5  $\mu$ l do každého vzorku proteinu. Trypsinizace probíhala přes noc (18 hodin).

Paralelně s přípravou vzorků Tecanem (vzorky D1 – 6) byly do jamek stejné plastové destičky připravovány vzorky BSA manuálně (vzorky E1, E2, E3, E4, E5, E6) – tj. stejné objemy (4  $\mu$ l BSA, 100  $\mu$ l denaturačního pufru, 5  $\mu$ l DTT, 18,5  $\mu$ l IAA a 1 ml hydrogenfosforečnanu draselného) byly pipetovány automatickou pipetou. Inkubace všech vzorků probíhaly současně.



Obrázek 8: 96-ti jamková pipetovací destička určená pro přípravu vzorků pomocí automatického pipetovače Tecan. Převzato z [www.diagnostics.tecan.com](http://www.diagnostics.tecan.com)

### **Měření obsahu proteinu pomocí BCA:**

Byla změřena absorbance (kapitola 3.2.1 Postup štěpení v roztoku, měření obsahu proteinu pomocí BCA) všech vzorků (D1-6, E1-6) včetně BSA standardů a obou blanků ve třech opakováních, aby bylo možné stanovit směrodatnou odchylku.

### **Purifikace:**

Purifikace všech připravených vzorků probíhala na C18 „Stage tips“ (Obr. 6). Postup purifikace je totožný s kapitolou 3.2.1 Postup štěpení v roztoku, purifikace. Vzorky se naplnily do inzertu vialek, které se umístí do MS pro následnou analýzu.

### **3.2.4 Hmotnostní analýza**

Hmotnostní analýza byla provedena na přístroji Orbitrap Fusion (Thermo) spojeném s iontovým zdrojem Proxeon Easy-Spray a chromatogramem Ultimate 3000 RSLC nano. Na odsolovací kolonu PepMap 100 (75  $\mu\text{m}$  x 2 cm, 3  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 100 Å; Thermo) zapojenou „in-line“ s analytickou kolonou PepMap RSLC (75  $\mu\text{m}$  x 15 cm, 3  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 100 Å; Thermo) vyhřívanou na 35 °C se nanášel 1  $\mu\text{l}$  vzorku. Separace peptidů proběhla na analytické koloně s lineárně rostoucím gradientem organické fáze z 5 % na 35 % s celkovou délkou běhu 150 minut. Vodná fáze byla voda s 0,1% kyselinou mravenčí a organická fáze acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí. Rozlišení orbitální pasti bylo nastaveno na 120000 a prekurzorové ionty byly skenovány v hmotnostním rozsahu 300-1950 m/z. V každém cyklu bylo vybráno dvacet nejintenzivnějších iontů pro fragmentaci kolizí indukovanou disociací a analyzováno v lineární pasti s kolizní energií 35 eV (Oždian *et al.*, 2016).

### **3.2.5 Zpracování výsledků z MS analýzy**

Data byla zpracována a vyhledána pomocí programu MaxQuant (verze 1.6.7.0) používající databázi UniProt (druh *Bos taurus*, stažena dne 13. 10. 2017).

### **3.2.6 Způsob vyhodnocení jednotlivých měření**

Po provedení LC-MS analýzy bylo z výsledků možné určit počet naštěpených peptidů BSA a sekvenční pokrytí sérového albuminu, a tak zjistit, který postup zpracování vzorku a štěpení trypsinem je nejúčinnější.

Pro vzájemné srovnání a určení nejefektivnější metody štěpení proteinu musela být spočítána účinnost u každého vzorku – vypočítala se jako podíl koncentrace peptidů po digesci proteinu BSA a jeho počáteční množství a vyjadřovala se v procentech.

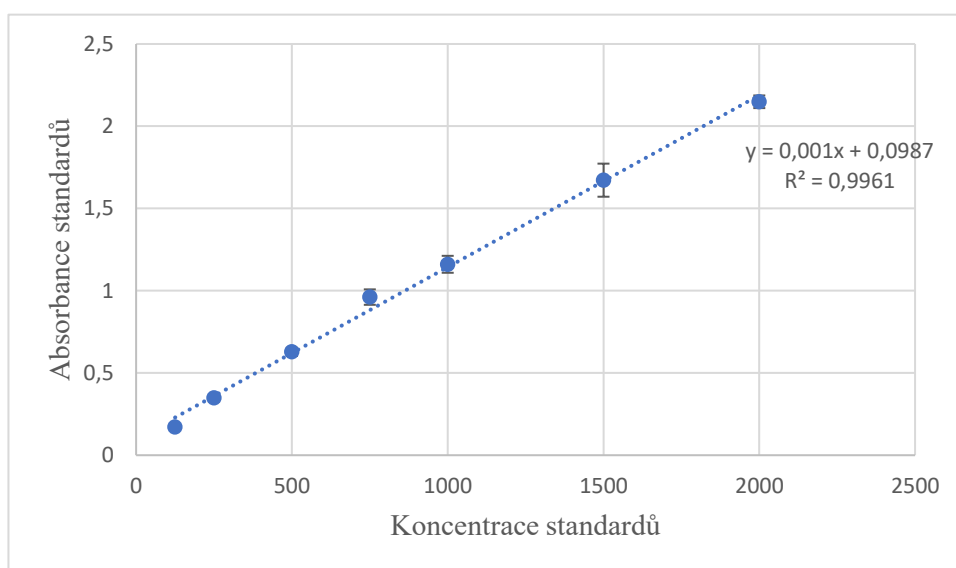
Koncentrace proteinu po provedení digesce byla stanovena metodou BCA, následně vypočtena pomocí naměřených hodnot absorbance a směrnice kalibrační křivky grafu.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 In-solution digescce

Vzorek BSA byl podroben digesci v roztoku a připraven ve třech opakováních (IN1, IN2, IN3). Tabulka č. 3 shrnuje hodnoty absorbance, které sloužily pro výpočet koncentrace proteinu po provedení digescce (též uvedené v Tab. 3), počet peptidů a sekvenční pokrytí vycházející z MS analýzy a účinnost každého vzorku.

Porovnáním LC-MS spekter – chromatogramů (Obr. 10) – lze odhadnout kvalitu trypsinizace BSA proteinu na příslušné peptidy.

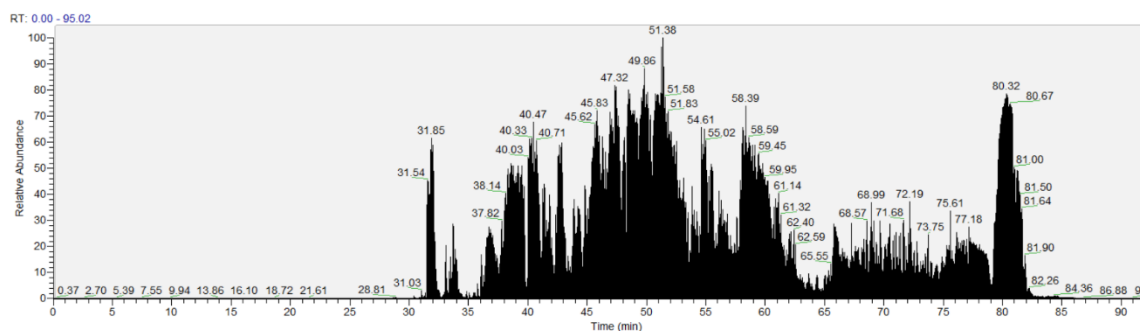


Obrázek 9: Graf závislosti absorbance na koncentraci proteinu získané změřením standardních roztoků BSA o známých koncentracích. Předpis přímky:  $y = 0,001x + 0,0987$ ; korelační koeficient  $R^2 = 0,9961$ .

Tabulka 3: Tabulka zobrazuje absorbanci a koncentraci určené měřením BCA. Dále počet peptidů, sekvenční pokrytí a účinnost jednotlivých vzorků připravené štěpením proteinu v roztoku.

Vzorek:	IN1	IN2	IN3
Absorbance:	0,24	0,24	0,25
Koncentrace proteinu po digesci [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]:	141,3	141,9	235,7
Počet peptidů:	35	38	37
Sekvenční pokrytí:	85,8	81,4	82,9
Účinnost [%]:	70,65	70,95	117,85





Obrázek 10: Chromatogram digescce proteinu BSA v roztoku. Každý pík představuje separovanou složku (peptid), která je určena při průchodu detektorem.

## 4.2 FASP

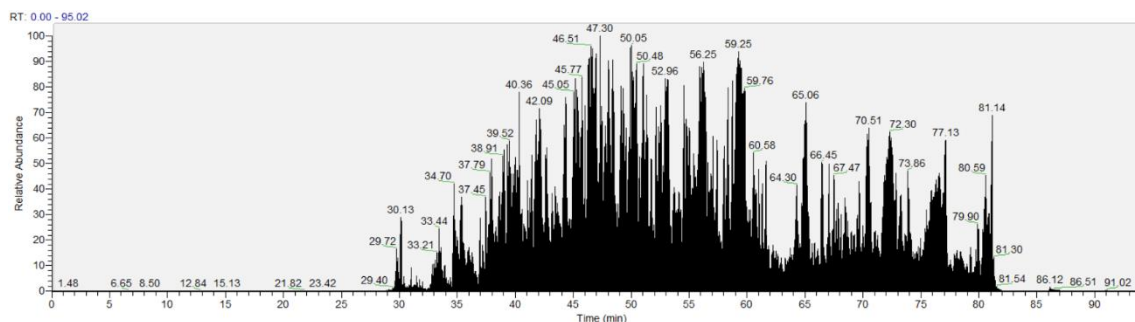
Vzorek BSA byl podroben digesci na filtru metodou FASP a připraven ve třech opakováních (F1, F2, F3). Koncentrace proteinu po provedení digescce (Tab. 4) byla stanovena metodou BCA a vypočtena pomocí stejné směrnice kalibrační křivky  $y = 0,001x + 0,0987$  (Obr. 9) jako vzorky in-solution.

Tabulka 4 zobrazuje absorbanci a koncentraci proteinu po digesci, počet peptidů, sekvenční pokrytí, a především účinnost digescce na filtru.

Chromatogram digescce proteinu BSA metodou FASP (Obr. 11) zachycuje eluované peptidy.

Tabulka 4: Hodnoty absorbance, koncentrace proteinu, počet peptidů, sekvenční pokrytí a účinnost po digesci metodou FASP.

Vzorek:	F1	F2	F3
Absorbance:	0,31	0,30	0,23
Koncentrace proteinu po digesci [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]:	218	201,6	128,3
Počet peptidů:	36	15	7
Sekvenční pokrytí:	82,2	71,8	63,4
Účinnost [%]:	14,5	13,4	8,5



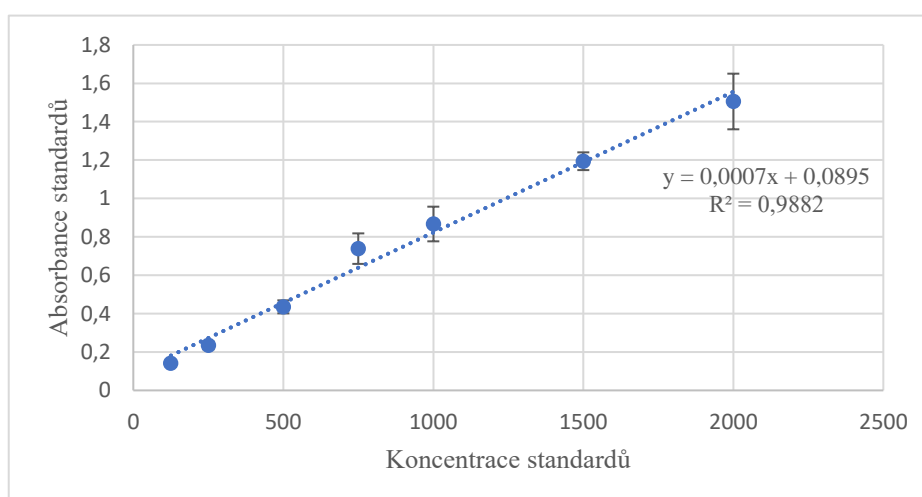
Obrázek 11: Chromatogram štěpení proteinu na filtru metodou FASP.

### 4.3 In-solution vzorky připravené robotem

Vzorek BSA byl podroben digesci v roztoku. Jeho příprava byla provedena automatickým pipetovačem Tecan opět ve třech opakováních (D1, D2, D3).

Byla stanovena koncentrace proteinu po digesci pomocí směrnice kalibrační křivky  $y = 0,0007x + 0,0895$  (Obr. 12), počet peptidů, sekvenční pokrytí každého vzorku a vypočítána účinnost (Tab. 5).

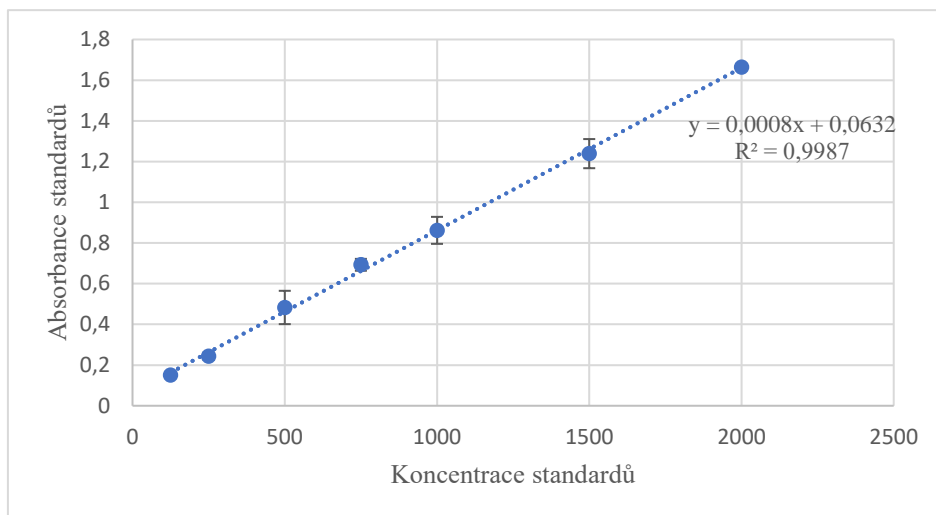
Obrázek 15 zobrazuje chromatogram vzorku připraveného robotem.



Obrázek 12: Graf závislosti absorbance na koncentraci proteinu získaná změřením standardních roztoků BSA o známých koncentracích. Předpis přímky:  $y = 0,0007x + 0,0895$ ; korelační koeficient  $R^2 = 0,9882$ .

Byl proveden další experiment, při kterém se opakovala příprava vzorků Tecanem (vzorky D4, D5, D6), nicméně byl upraven objem přidávaného trypsinu naředěním hydrogenfosforečnanovým pufrům. Obdobným způsobem byla stanovena koncentrace proteinu po digesci (Tab. 5) podle směrnice kalibrační křivky  $y = 0,0008x + 0,0632$  (Obr. 13). Rovněž byly stanoveny počty naštěpených peptidů a účinnost každého vzorku (Tab. 5).

Chromatogram (Obr. 15) poukazuje na úspěšnost trypsinizace.



Obrázek 13: Graf závislosti absorbance na koncentraci proteinu získané změřením standardních roztoků BSA o známých koncentracích. Předpis přímky:  $y = 0,0008x + 0,0632$ ; korelační koeficient  $R^2 = 0,9987$ .

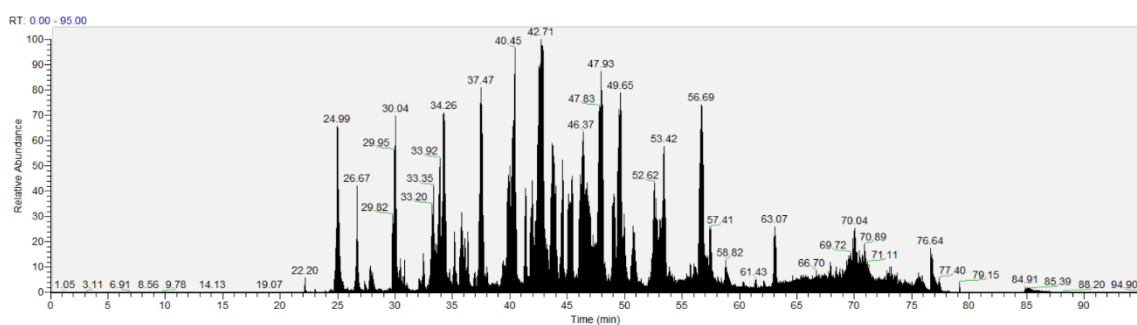
Tabulka 5: Hodnoty absorbance, koncentrace proteinu, počet peptidů a účinnost vzorků po in-solution digesci proteinu BSA. Sekvenční pokrytí nebylo v tomto případě součástí výsledků z MS analýzy. Všechny vzorky byly zpracovávány robotem Tecan – u vzorků D4, D5, D6 došlo k ředění trypsinu hydrogenfosforečnanovým pufrům v poměru 1:2.

Vzorek:	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Absorbance:	0,15	0,16	0,18	0,17	0,16	0,17
Koncentrace peptidů po digesci [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]:	87,86	91,67	122,62	130,17	116	135,17
Počet peptidů:	20	34	5	36	33	38
Sekvenční pokrytí:	2	11,9	10,9	23,1	15,3	25,4
Účinnost [%]:	43,93	45,83	61,31	38,41	43,1	36,99

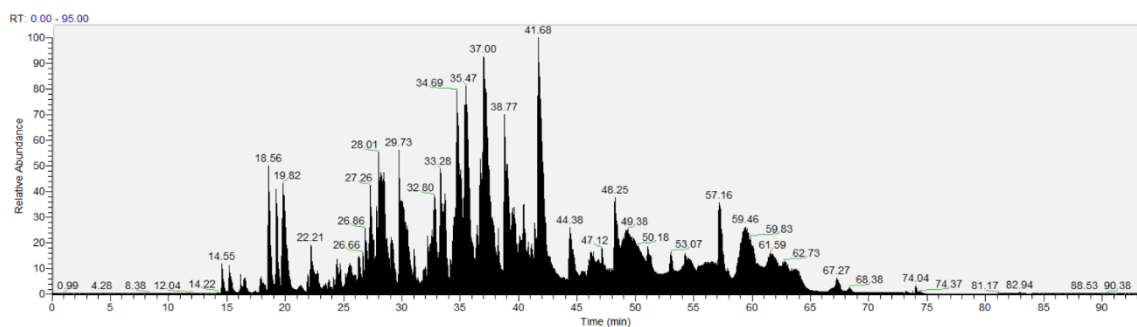


Tabulka 6: Hodnoty koncentrace proteinu, počet peptidů a účinnost digesce v roztoku připravované manuálně do mikrodestičky určené pro práci s Tecanem. Sekvenční pokrytí nebylo součástí výsledků z MS analýzy. Vzorky E4, E5 a E6 byly štěpeny trypsinem, který byl naředěn hydrogenfosforečnanovým pufrům v poměru 1:2.

Vzorek:	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Absorbance:	0,17	0,16	0,19	0,14	0,15	0,31
Koncentrace peptidů po digesci [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]:	112,14	108,81	147,86	94,41	120,58	315,17
Počet peptidů:	35	32	35	36	38	37
Sekvenční pokrytí:	89,5	89,8	88,8	76,1	85	73,3
Účinnost [%]:	56,07	54,41	73,93	51,86	41,47	15,86



Obrázek 16: Chromatogram digesce v roztoku připraven do 96-ti jamkové mikrodestičky – do stejné destičky, do které se připravovaly vzorky Tecanem.



Obrázek 17: Chromatogram digesce v roztoku připraven do 96-ti jamkové mikrodestičky paralelně s přípravou vzorků Tecanem.

## 5 DISKUZE

Bottom-up přístup zahrnující štěpení proteinu na příslušné peptidy bývá v proteomických laboratořích preferovanější před zpracováváním celých proteinů. Proto je také důležité zvolit efektivní postup při digesci (Aslam *et al.*, 2017).

V této bakalářské práci jsou srovnávány tři metody digesce BSA za účasti trypsinu – štěpení v roztoku, štěpení na filtru metodou FASP a vzorky připravované automatickým pipetovačem Tecan.

Důvodem pro zapojení robota do přípravy proteomických vzorků je automatizace celého procesu – pipetování velkého množství vzorků vyžaduje méně času v porovnání s manuální přípravou, snižování variability mezi vzorky a udržování stálých podmínek při jejich přípravě. Přestože v případě zpracování většího počtu vzorků se čas přípravy významně zkracuje, je stále třeba brát v úvahu dobu inkubace, a především její podmínky – např. vzorky se musí umístit do tmy v případě přidání IAA anebo inkubace při 37 °C po přidání DTT, kdy je třeba mikrodestičku se vzorky přemístit z Tecana do inkubátoru, což je výrazná limitace celého procesu, která by musela být odstraněna. Právě díky specifickým podmínkám práce s daným vzorkem by na jedné destičce neměly být zpracovávány rozdílné druhy vzorků.

Při přípravě vzorků robotem však představovala největší problém trypsinizace, jelikož k tomuto kroku vůbec nedocházelo. V této souvislosti se vyslovily dvě hypotézy – první byla, že 96-ti jamková destička (Obr. 8) může být zhotovena z nevhodného plastu pro přípravu proteinu, a tak dochází k jejich adsorpci na stěny jamky. Druhou hypotézou bylo, že Tecan trypsin ke vzorkům vůbec nepřidával. Pro kontrolu byly paralelně s přípravou vzorků robotem připravovány vzorky i manuálně do stejné plastové 96-ti jamkové destičky. A tak se podařilo druhou hypotézu ověřit jako pravdivou.

Chromatogram je jedním z prvních výsledků analýzy, která poukazuje na kvalitu provedení trypsinizace. Mezi 30 až 70 minutou by mělo docházet k eluci správně separovaných peptidů (např. Obr. 11) Velmi široký pík (kolem 80 minuty) ukazuje na špatné provedení naštěpení proteinu (Obr. 10). Při pohledu na chromatogram na obrázku 14 je jasné, že digesce vůbec neproběhla – píky reprezentují pouze pár naštěpených segmentů, které nemusely být nutně výsledkem trypsinizace, ale autolýzy proteinu. Nicméně chromatogram manuální kontroly Tecana (Obr. 16) ukazuje, že se štěpení ve stejné plastové destičce zdařilo. Tento výsledek vypovídá o tom, že materiál destičky, v níž se vzorky připravují, nepředstavuje problém. Chyba tedy musela nastat v pipetování trypsinu robotem.

Uvažovalo se, jestli je objem trypsinu v jamce destičky dostatečný pro to, aby ho robot zvládnul přepipetovat. Trypsin byl proto zředěn hydrogenfosforečnanovým pufrům v poměru 1:2. Tato úprava (Obr. 15) byla postačující k tomu, aby byl Tecan schopen proteolytický enzym k vzorku přidat, a proběhlo naštěpení BSA. Nicméně další optimalizace nebyla možná z důvodu plného zamětnání Tecana testováním vzorků COVID-19.

Ukázalo se, že in-solution digesce má nejvyšší účinnost (Tab. 7) v porovnání s ostatními postupy zpracování vzorku. Tento výsledek může být způsoben tím, že v případě digesce za použití filtru nemusejí nenaštěpené proteiny procházet přes filtr, který je schopen propouštět jen proteiny, resp. peptidy s určitou molekulovou hmotností (př. 30 kDa a menší). Kromě toho se přes membránu nedostane trypsin, který je při in-solution digesci přítomný přímo v roztoku, a tak je zachycený i při analýze obsahu proteinů.

Při přípravě vzorků robotem musel být v konečné fázi experimentu použitý trypsin zředěn hydrogenfosforečnanovým pufrům, aby došlo k naštěpení BSA na peptidy (srovnání Obr. 14 a 15). Účinnost v tomto případě vychází ve prospěch připravovaného vzorku robotem s nenařaděným trypsinem – tento výsledek může být způsoben vyšším objemem nařaděného vzorku.

Rovněž vyšla nižší účinnost při manuálním zpracovávání vzorků připravovaných paralelně s robotem Tecan, kdy byl trypsin ředěn (Tab. 7).

Při srovnání počtu vzniklých peptidů všech tří provedených postupů se ukázalo, že trypsin nejefektivněji štěpil proteiny při přípravě in-solution – tento postup odpovídá i manuální přípravě vzorků (Tab. 7).

Počet naštěpených peptidů se zvýšil při zředění trypsinu u vzorků pipetovaných Tecanem.

Tabulka 7: Srovnání průměrných hodnot počtu peptidů a účinnosti u jednotlivých metod.

Metoda:	In-solution	FASP	Příprava robotem	Příprava robotem (zředění trypsinu)	Manuální příprava:	Manuální příprava (zředění trypsinu):
Průměrný počet peptidů:	37	20	19	35	34	37
Průměrná hodnota účinnosti metody [%]:	86,49	12,13	50	39,5	61,47	36,40

Automatické pipetovače Tecan nabízejí možnost integrace inkubátoru – a dalšího příslušenství jako např. shakeru – a tak by byl odstraněn dříve zmíněný problém s manipulací vzorků za účelem jejich přemístění do inkubátoru.

Kromě automatického pipetovače Tecan se nabízí další různorodé metody umožňující automatizaci bottom-up proteomického protokolu.

Alternativou může být trypsin imobilizovaný na pevný nosič, přičemž se dosahuje štěpení proteinu v řádu minut díky mnohem větší přítomné koncentraci enzymu ve srovnání s volným trypsinem. Jako nosič může sloužit sklo, membrána, polymer, gelové kuličky nebo porézní monolitické materiály (Lin *et al.*, 2008). Imobilizace trypsinu navíc výrazně snižuje jeho autodigesti (Shen and Sun, 2018).

Imobilizaci proteolytického enzymu lze kombinovat s dalšími způsoby urychlení digesce – např. digesce pomocí mikrovlnného záření. Trypsin je v tomto případě adsorbován na magnetické nanočástice, které fungují nejen jako substrát pro imobilizaci enzymů, ale také jako vynikající absorbér mikrovlnného záření, a tak výrazně zlepšily účinnost štěpení. Trypsin lze kromě toho díky unikátní magnetické citlivosti snadno izolovat pomocí externího magnetu a opakovaně použít (Lin *et al.*, 2008).

Enzym lze imobilizovat i v mikrofluidních reaktorech – kapilární kolony, mikrofluidní čipy, miniaturizované enzymové reaktory. Tyto miniaturizované systémy poskytují rychlejší analýzu a výrazně sníženou spotřebu vzorku. Imobilizace vyžaduje stacionární fázi, na kterou se proteolytický enzym připojuje kovalentní vazbou, adsorpcí nebo afinitně. Většina takovýchto mikroreaktorů může fungovat způsobem průtoku – mohou být proto připojeny online k nanoLC – MS pro „high-throughput“ analýzu (Safdar *et al.*, 2014).



## **6 ZÁVĚR**

Tato bakalářská práce je zaměřena na digesci vzorku BSA. Srovnávala se digesce v roztoku, na filtru s přípravou vzorků pomocí pipetovacího robota, aby se zjistilo, který postup štěpení dosahuje nejvyšší účinnosti.

Jejím cílem je rovněž optimalizovat přípravu proteomického vzorku pomocí robota Tecan, který umožňuje zpracovávat velké množství vzorků paralelně, a tak výrazně zkracuje dobu přípravy.

V konečné fázi byly vyhodnocovány koncentrace proteinu po digesci, počet peptidů BSA, sekvenční pokrytí a spočítaná výše zmiňovaná účinnost.

## 7 LITERATURA

- Aebersold, R., Mann, M., 2016. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537, 347–355. <https://doi.org/10.1038/nature19949>
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M.A., Khurshid, M., Rasool, M.H., 2017. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J. Chromatogr. Sci.* 55, 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Baralle, F.E., Giudice, J., 2017. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 437–451. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.27>
- Burkhart, J.M., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A., Zahedi, R.P., 2012. Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *J. Proteomics* 75, 1454–1462. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.016>
- Dittrich, J., Becker, S., Hecht, M., Ceglarek, U., 2015. Sample preparation strategies for targeted proteomics via proteotypic peptides in human blood using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* 9, 5–16. <https://doi.org/10.1002/prca.201400121>
- Drabik, A., Bodzoń-Kułakowska, A., Silberring, J., 2016. 7 - Gel Electrophoresis, in: Ciborowski, P., Silberring, J. (Eds.), *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition)*. Elsevier, Boston, pp. 115–143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00007-0>
- Dvořáková, P., Hernychová, L., Vojtěšek, B., 2014. Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klin. Onkol. J.* 27, 104–109. <https://doi.org/10.14735/amko20141S104>
- Eng, J.K., McCormack, A.L., Yates, J.R., 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 976–989. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(94\)80016-2](https://doi.org/10.1016/1044-0305(94)80016-2)
- Garfin, D.E., 1990. [35] Isoelectric focusing, in: Deutscher, M.P. (Ed.), *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 459–477. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82037-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82037-3)
- Gu, H., Unger, S., Deng, Y., 2006. Automated Tecan Programming for Bioanalytical Sample Preparation with EZTecan. *ASSAY Drug Dev. Technol.* 4, 721–733. <https://doi.org/10.1089/adt.2006.4.721>

- Gundry, R.L., White, M.Y., Murray, C.I., Kane, L.A., Fu, Q., Stanley, B.A., Van Eyk, J.E., 2009. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 10, Unit10.25. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1025s88>
- Hachey, D.L., Chaurand, P., 2004. Proteomics in reproductive medicine: the technology for separation and identification of proteins. *J. Reprod. Immunol.* 63, 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2004.01.009>
- Han, X., Aslanian, A., Yates, J.R. 3rd, 2008. Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>
- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., 1981. Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clin. Chem.* 27, 1551–1553.
- Liebler, D.C., Yates, J.R., Fund, E.N.M., 2002. *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology.* Humana Press.
- Lin, S., Yun, D., Qi, D., Deng, C., Li, Y., Zhang, X., 2008. Novel microwave-assisted digestion by trypsin-immobilized magnetic nanoparticles for proteomic analysis. *J. Proteome Res.* 7, 1297–1307. <https://doi.org/10.1021/pr700586j>
- López-Ferrer, D., Cañas, B., Vázquez, J., Lodeiro, C., Rial-Otero, R., Moura, I., Capelo, J.L., 2006. Sample treatment for protein identification by mass spectrometry-based techniques. *TrAC Trends Anal. Chem.* 25, 996–1005. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.015>
- Ludwig, K.R., Schroll, M.M., Hummon, A.B., 2018. Comparison of In-Solution, FASP, and S-Trap Based Digestion Methods for Bottom-Up Proteomic Studies. *J. Proteome Res.* 17, 2480–2490. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00235>
- Manza, L.L., Stamer, S.L., Ham, A.-J.L., Codreanu, S.G., Liebler, D.C., 2005. Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics* 5, 1742–1745. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401063>
- McHugh, L., Arthur, J.W., 2008. Computational methods for protein identification from mass spectrometry data. *PLoS Comput. Biol.* 4, e12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0040012>
- Misra, B.B., Langefeld, C.D., Olivier, M., Cox, L.A., 2018. Integrated Omics: Tools, Advances, and Future Approaches. *J. Mol. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1530/JME-18-0055>
- Nicolescu, T.O., 2017. Interpretation of Mass Spectra, in: Aliofkhazraei, M. (Ed.), *Mass Spectrometry.* IntechOpen, Rijeka. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68595>

- Oždian, T., Holub, D., Rylová, G., Václavková, J., Hajdúch, M., Džubák, P., 2016. Porovnání hmotnostně spektrometrických přístupů v proteomickém profilování léčiv. *Chemagazín* 26, 14–17.
- Perez-Riverol, Y., Alpi, E., Wang, R., Hermjakob, H., Vizcaino, J.A., 2015. Making proteomics data accessible and reusable: current state of proteomics databases and repositories. *Proteomics* 15, 930–949.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.201400302>
- Perutka, Z., Sebela, M., 2018. Pseudotrypsin: A Little-Known Trypsin Proteoform. *Mol. Basel Switz.* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23102637>
- Polyak, P., Racz, P., Rozsa, P., Nagy, G.N., Vertessy, B.G., Pukanszky, B., 2017. The novel technique of vapor pressure analysis to monitor the enzymatic degradation of PHB by HPLC chromatography. *Anal. Biochem.* 521, 20–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.01.004>
- Quadroni, M., James, P., 1999. Proteomics and automation. *ELECTROPHORESIS* 20, 664–677. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990101\)20:4/5<664::AID-ELPS664>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:4/5<664::AID-ELPS664>3.0.CO;2-A)
- Richardson, J., Shah, B., Xiao, G., Bondarenko, P.V., Zhang, Z., 2011. Automated in-solution protein digestion using a commonly available high-performance liquid chromatography autosampler. *Anal. Biochem.* 411, 284–291.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.019>
- Sadygov, R.G., 2015. Using SEQUEST with theoretically complete sequence databases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26, 1858–1864. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1228-5>
- Safdar, M., Sproß, J., Jänis, J., 2014. Microscale immobilized enzyme reactors in proteomics: Latest developments. *J. Chromatogr. A* 1324, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.045>
- Schweppe, D.K., Eng, J.K., Yu, Q., Bailey, D., Rad, R., Navarrete-Perea, J., Huttlin, E.L., Erickson, B.K., Paulo, J.A., Gygi, S.P., 2020. Full-Featured, Real-Time Database Searching Platform Enables Fast and Accurate Multiplexed Quantitative Proteomics. *J. Proteome Res.*  
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00860>
- Shen, X., Sun, L., 2018. Systematic Evaluation of Immobilized Trypsin-Based Fast Protein Digestion for Deep and High-Throughput Bottom-Up Proteomics. *Proteomics* 18, e1700432–e1700432. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700432>

- Sielaff, M., Kuharev, J., Bohn, T., Hahlbrock, J., Bopp, T., Tenzer, S., Distler, U., 2017. Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. *J. Proteome Res.* 16, 4060–4072.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00433>
- Switzar, L., Giera, M., Niessen, W.M.A., 2013. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *J. Proteome Res.* 12, 1067–1077.  
<https://doi.org/10.1021/pr301201x>
- Toby, T.K., Fornelli, L., Kelleher, N.L., 2016. Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* 9, 499–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041550>
- Tsiatsiani, L., Heck, A.J.R., 2015. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* 282, 2612–2626.  
<https://doi.org/10.1111/febs.13287>
- Voeten, R.L.C., Ventouri, I.K., Haselberg, R., Somsen, G.W., 2018. Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances. *Anal. Chem.* 90, 1464–1481.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00015>
- Westermeier, R., Naven, T., Höpker, H., 2008. *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design, Second Edition.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Wisniewski, J.R., 2016. Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Anal. Chem.* 88, 5438–5443. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00859>
- Xu, D., Xu, Y., 2012. Protein databases on the internet. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 19, Unit 19.4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1904s68>
- Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A., 2009. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11, 49–79.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124934>
- Zhang, Z., Wu, S., Stenoien, D.L., Pasa-Tolic, L., 2014. High-throughput proteomics. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* 7, 427–454.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071213-020216>

## 8 SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
Asp-N	Peptidyl-Asp metalopeptidasa
BCA	Bicinchoninic acid assay; metoda stanovení koncentrace proteinů za použití kyseliny bicinchoninové
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool; nástroj pro vyhledávání a porovnávání primární sekvence
BSA	Bovine serin albumin; hovězí sérový albumin
CE	Capillary electroforesis; kapilární elektroforéza
CE-ESI	Kapilární elektroforéza ve spojení s ionizací elektrosprejem
DTT	Dithiotreitol
ESI	Electrospray ionization; ionizace elektrosprejem
FASP	Filter-Aided Sample Preparation; příprava vzorku za pomoci filtru
Glu-C	Glutamyl peptidasa I
GPM DB	Global Proteome Machine Database; celosvětová databáze proteinů
HPLC	High-performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	Jodacetamid
ICR	Ion cyclotron resonance; iontová cyklotronová rezonance
IEF	Isoelectric focusing; Isoelektrická fokusace
IT	Ion trap; iontová past
LC	Liquid chromatography; kapalinová chromatografie
LC-ESI	Kapalinová chromatografie ve spojení s ionizací elektrosprejem
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
Lys-C	Lysyl endopeptidasa
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization; ionizace laserem za účasti matrice
MS	Mass spectrometry; hmotnostní spektrometr
NMR	Nuclear magnetic resonance; nukleární magnetická rezonance
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PDB	Protein Data Bank; proteinová databanka
pI	Isoelektrický bod

PTM	Post-transkripční modifikace
Q	Quadrupole; kvadrupól
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného
TFA	Kyselina trifluoroctová
TOF	Time of flight; analyzátor doby letu