

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Stanovení hladiny lidského irisinu v plasmě pomocí hmotnostní spektrometrie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Brežinová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Dušan Holub, Ph.D.
Rok:	2018

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

Rada by som poďakovala vedúcemu bakalárskej práce, Mgr. Dušanovi Holubovi, Ph.D, za vedenie tejto práce. Ďakujem mu predovšetkým za jeho trpezlivosť, pomoc v laboratóriu, odborný dohľad a rady pri jej vypracovaní. Ďalej by som chcela poďakovať Mgr. Jane Václavkovej za rady a pomoc počas mojej práce v laboratóriu a celému kolektívu z oddelenia proteomiky, za možnosť vypracovania experimentálnej časti práce a priateľskú atmosféru. Ďakujem tiež mojej rodine a priateľovi za podporu a pomoc počas štúdia.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Veronika Brežinová
Názov práce	Stanovení hladiny lidského irisínu v plasmě pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedúci práce	Mgr. Dušan Holub, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Bakalárska práca sa zaoberá problematikou stanovenia prítomnosti irisínu v krvnom sére. Irisín bol pôvodne rozpoznaný ako hormón podobný myokynínom. Prvá úloha pripisovaná irisínu bola jeho schopnosť indukovať trans-diferenciáciu bieleho tukového tkaniva na hnedé, ktoré funguje ako spaľovač tukov. Bolo preukázané, že irisín môže slúžiť k zavedeniu nových liečebných metód, predovšetkým u metabolických ochorení ako napríklad diabetes typu 2, alebo môže byť využitý pri terapii proti obezite. Cieľom bakalárskej práce bolo zavedenie proteomickej metódy, ktorá umožňuje detekciu prítomnosti irisínu v sére a zároveň jeho citlivú kvantifikáciu pomocou hmotnostnej spektrometrie. V rámci práce boli vybrané tri postupy, 1D SDS-PAGE elektroforéza, precipitácia proteínov acetonitrilom a gélova preparatívna elektroforéza, ktorými boli vzorky séra spracované a zároveň cielené na detekciu irisínu. Žiadna z použitých metód sa v tejto bakalárskej práci nepreukázala ako dostatočne citlivá k stanoveniu prítomnosti irisínu v sére.

Kľúčové slová	irisín, terapia, obezita, diabetes mellitus, hmotnostná spektrometria, proteomika
Počet strán	57
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Brežinová
Title	Quantification of Circulating Human Irisin in serum by Mass Spectrometry
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc
Supervisor	Mgr. Dušan Holub, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

This bachelor thesis deals with the determination of the presence of irisin in blood serum. Irisin was originally recognized as a hormone-like myokine. The first task attributed to irisin was its ability to induce trans-differentiation of white adipose tissue to brown adipose tissue, which acts as a fat burner. It has been established that irisin can serve to introduction of new therapeutic methods, especially metabolic diseases such as type 2 diabetes, or may be used in the treatment of obesity. The aim of this thesis was the introduction of proteomic method, which allows detection and sensitive quantification of the presence irisin levels by tandem mass spectrometry. There were selected three procedures, 1D SDS-PAGE electrophoresis, precipitation of proteins by acetonitrile and gel preparative electrophoresis, which serum samples were processed and also targeted for irisin detection. None of the methods used in this thesis has not shown to be sufficiently sensitive to determine the presence of irisin in serum.

Keywords	irisin, therapy, obesity, diabetes mellitus, mass spectrometry, proteomics
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	11
2.1 Irisín	11
2.1.1 Objav a funkcie	12
2.1.2 Tvorba a sekrécia irisínu	12
2.1.3 Irisín a jeho vplyv na tkanivá	15
2.1.3.1 Vplyv irisínu na biele a hnedé adipocyty	15
2.1.3.2 Vplyv irisínu na myocyty a kostné tkanivo	15
2.1.4 Irisín a jeho aplikovateľnosť v medicíne	16
2.1.4.1 Obezita	17
2.1.4.2 Diabetes mellitus	18
2.1.4.3 Neurologické aspekty	20
2.1.5 Metódy detekcie irisínu	20
2.1.6 Problémová detekcia irisínu	21
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
3.1 Materiál	22
3.1.1 Biologický materiál	22
3.1.2 Chemikálie	22
3.1.3 Roztoky	23
3.1.4 Prístrojové vybavenie	27
3.1.5 Software	28
3.2 Metódy	28
3.2.1 Postupy k stanoveniu hladiny ľudského irisínu zo séra	28
3.2.1.1 1D SDS-PAGE elektroforéza	30
3.2.1.2 Precipitovanie proteínov zo séra pomocou ACN	33
3.2.1.3 Kolónova preperatívna gélova elektroforéza (CEGE)	36
3.3 LC-MS/MS analýza	39
3.4 Spracovanie a vyhodnotenie LC-MS/MS dát	41
3.4.1 Analýza dát	41

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA	42
4.1 Spracovanie vzorky pomocou 1D SDS-PAGE elektroforézy	42
4.2 Spracovanie vzorky pomocou precipitácie ACN	44
4.3 Spracovanie vzorky pomocou CEGE	47
4.4 Zhrnutie výsledkov	48
5. ZÁVER	50
6. LITERATÚRA	51
7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	56

CIEĽ PRÁCE

1. Vypracovanie literárnej rešerše na tému irisín, zameranej predovšetkým na jeho funkcie a potencionálnu využiteľnosť v liečbe metabolických a ďalších ochorení.
2. Spracovanie proteomických vzoriek, príprava vzoriek pre kvantifikáciu vybraného biomarkeru (irisín), LC-MS/MS analýza a spracovanie dát a výsledkov.

1. ÚVOD

Irisín je polypeptidový hormón, ktorý vzniká štiepením membránového proteínu FNDC5. Od svojho objavu v roku 2012 je predmetom mnohých výskumov kvôli jeho širokému terapeutickému potenciálu. Množstvo štúdií sa zameriava na spojenie irisínu s metabolickými ochoreniami. Predpokladá sa, že porozumenie funkcii a pôsobeniu irisínu môže byť kľúčové k pochopeniu mnohých chorôb a ich vývoja. Irisín ovplyvňuje zvýšenie energetického výdaju tým, že stimuluje "zhnednutie" bielych tukových tkanív. Zvýšená hladina cirkulujúceho irisínu je spojená hlavne so zlepšením glukózovej homeostázy a znížením inzulínovej rezistencie. Proteín FNDC5 je vysoko exprimovaný v kostrovom svalstve, srdci, tukovom tkanive a pečeni.

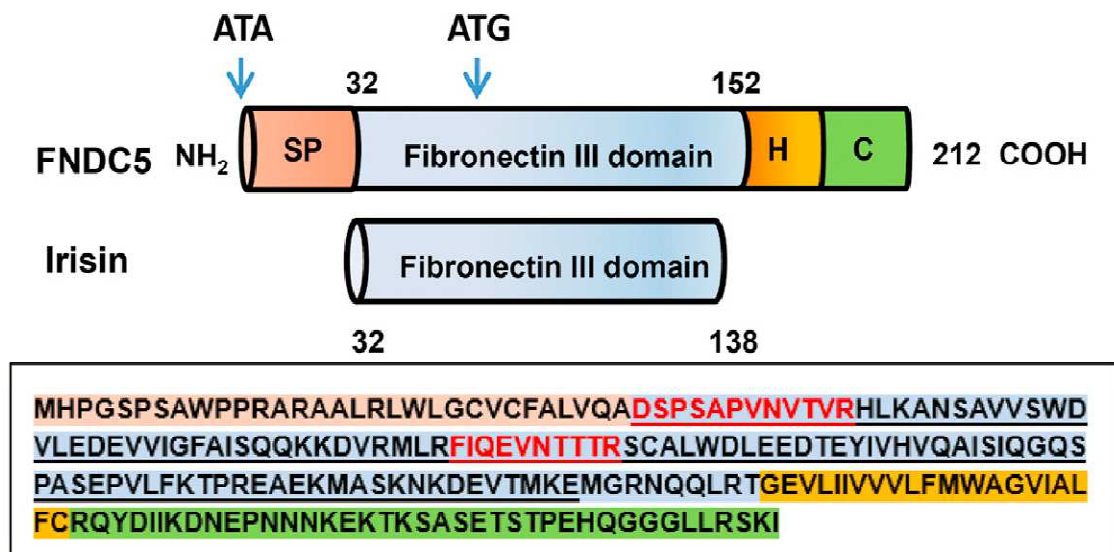
K detekcii irisínu sú využívané imunologické metódy ELISA a Western blot, založené na anti-irisín protilátke. Okrem toho, bola k detekcii a kvantifikácii irisínu využitá aj hmotnostná spektrometria. Presná detekcia irisínu je do dnešného dňa pomerne diskutabilná. Viaceré štúdie priniesli kontroverzné výsledky, ktoré boli spôsobené najmä početnými nevýhodami v metódach používaných na jeho detekciu a meranie. Diskutabilná je najmä dostatočná špecifita používaných protilátok kvôli krížovým reakciám s ostatnými proteínmi. Na špecifické stanovenie a kvantifikáciu irisínu pomocou protilátok je momentálne potrebný ďalší vývoj.

V experimentálnej časti bakalárskej práce sme sa snažili o zavedenie proteomickej metódy k stanoveniu prítomnosti irisínu v krvnom sére. V rámci práce boli vybrané tri prístupy, 1D SDS-PAGE elektroforéza, precipitácia proteínov a kolónova gélova preparatívna elektroforéza, ktorými boli vzorky séra spracované a zároveň cielené na detekciu irisínu pomocou LC-MS/MS analýzy.

2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Irisín

FNDC5 (Fibronectin Type III domain-containing protein 5) je transmembránový proteín, ktorý je kódovaný FNDC5 genóm, a je prekursorom pre irisín. Irisín teda vzniká štiepením z FNDC5 proteínu. Názov proteínu pre irisín je odvodený z názvu pre grécku bohyňu dúhy Iris. Gén FNDC5 je lokalizovaný na chromozóme 1 a je kódovaný atypickým translačným štartom, kodónom ATA, namiesto obvyklého ATG (Ingolia *et al.*, 2011; Ivanov *et al.*, 2011; Jedrychowski *et al.*, 2015). FNDC5 proteín je zložený zo signálneho peptidu a troch domén (fibronektínova, hydrofóbná a C-terminálna doména, Obr. 1). Samotný irisín obsahuje len fibronektínovú doménu. Irisín vzniknutý po proteolytickom štiepení FNDC5 proteínu je uvoľnený do extracelulárneho priestoru (Bostorm *et al.*, 2012).



Obr. 1 Schematický prehľad FNDC5 proteínovej štruktúry (hore) a irisínu (dole, modrá oblasť). SP: signálny peptid (oranžová oblasť), H: hydrofóbná doména (žltá oblasť), C: C-terminálna doména (zelená oblasť). Pod schematickým znázornením je aminokyselinová sekvencia ľudského FNDC5 proteínu s odpovedajúcim farebným značením. Sekvencia ľudského irisínu je podčiarknutá. Červeno vyznačené sekvencie odpovedajú dvom unikátnym peptidom, ktoré boli použité pre detekciu irisínu pomocou hmotnostnej spektrometrie v práci popísanej Jedrychowskim *et al.* (2015) (prevzaté z Jedrychowski *et al.*, 2015).

2.1.1 Objav a funkcie

Irisín bol prvýkrát popísaný ako nový polypeptidový hormón svalových buniek v štúdií popísanou Bostrom *et al.* (2012). Štúdia popisuje, že irisín je regulovaný cez transkripčný koaktivátor PGC- α , ktorý reguluje ďalšie gény zapojené do energetického metabolizmu. PGC- α bol najskôr popísaný ako koaktivátor PPAR- γ , ktorý moduluje expresiu odpojovacieho proteínu 1 (UCP1). UCP1 proteín odpojuje gradient H⁺ iónov, vznikajúcich pri respirácii v medzimembránovom priestore mitochondrie, od syntézy ATP. Okrem toho bola koaktivátoru PPAR- γ pripísaná aj modulácia termogenézy v hnedom tuku (Puigserver *et al.*, 1998; Bostrom *et al.*, 2012). Tiež sa ukázalo, že kontroluje mitochondriálnu biogénu a oxidačný metabolizmus v mnohých typoch buniek (Handschin *et al.*, 2008; Bostrom *et al.*, 2012). Cvičením indukovaný PGC1- α stimuluje expresiu niekoľkých génových produktov kostrového svalstva, ktoré a potencionálne môžu sekrétovať, a to vrátane FNDC5 (Bostrom *et al.*, 2012).

Irisín je uvoľňovaný predovšetkým pri cvičení a aktivuje zmeny v podkožnom tukovom tkanive, ktoré stimulujú jeho hnednutie a modulujú expresiu proteínu UCP1. Irisín spôsobuje rast výdaju celkovej energie organizmu, je zodpovedný za zvýšenie termogenézy a sprostredkovanie najdôležitejších výhod cvičenia ako je úbytok hmotnosti a celkové zlepšenie telesného stavu a svalovej aktivity (Bostrom *et al.*, 2012).

Hmotnostnou spektrometriou bolo potvrdené, že irisín, je konzervovaný medzi všetkými druhmi cicavcov, to znamená, že irisín má 100 % zhodnú identitu medzi ľuďmi a myšami a aj regulácia hladiny irisínu je medzi týmito druhmi rovnaká. (Bostrom *et al.*, 2012).

Bostrom *et al.* (2012) imunoblotom určil veľkosť endogénneho FNDC5 proteínu na 32 kDa, po deglykolyzácii PNGázou F okolo 20 kDa. Jedrychowski *et al.* (2015) vo svojej štúdií stanovil veľkosť samotného irisínu na 12 kDa po deglykolyzácii.

2.1.2 Tvorba a sekrécia irisínu

Tvorba a sekrécia irisínu je podobná uvoľňovaniu transmembránových polypeptidových hormónov a hormomálnych molekúl ako sú EGF (epidermálny rastový faktor), TGF- α (transformujúci rastový faktor alfa). Najskôr dochádza k odštiepeniu signálneho peptidu proteázami. Zrelý proteín je ďalej proteolytický štiepený a glykozilovaný (Obr. 2). Irisín je uvoľnený do extracelulárneho priestoru vo forme polypeptidu o dĺžke 112

aminokyselín (12 kDa, Bostorm *et al.*, 2012). Irisín má dve glykozilačné miesta na pozíciách 39 a 84 z N-terminálneho konca proteínu.

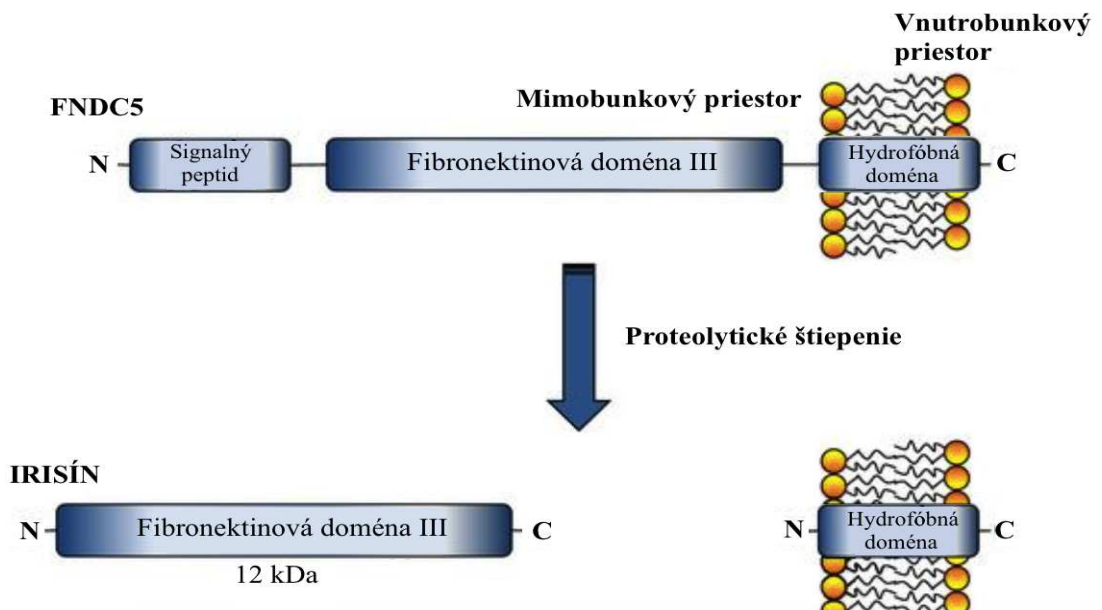
Irisín je najviac uvoľňovaný zo svalových buniek. Cvičením dochádza k uvoľňovaniu irisínu z buniek v dôsledku svalovej kontrakcie počas chvenia (Bostorm *et al.*, 2012). Intenzita svalového chvenia je úmerná k množstvu sekretovaného irisínu. Zimou aktivované svalové chvenie má len minimálny vplyv na sekréciu irisínu (Lee *et al.*, 2014).

Irisín je taktiež produkovaný bielymi tukovými bunkami (adipocytmi), avšak v 200-krát nižšom množstve ako tomu je v prípade kostrového svalstva (Moreno-Navarrete *et al.*, 2013; Roca-Rivada *et al.*, 2013; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).

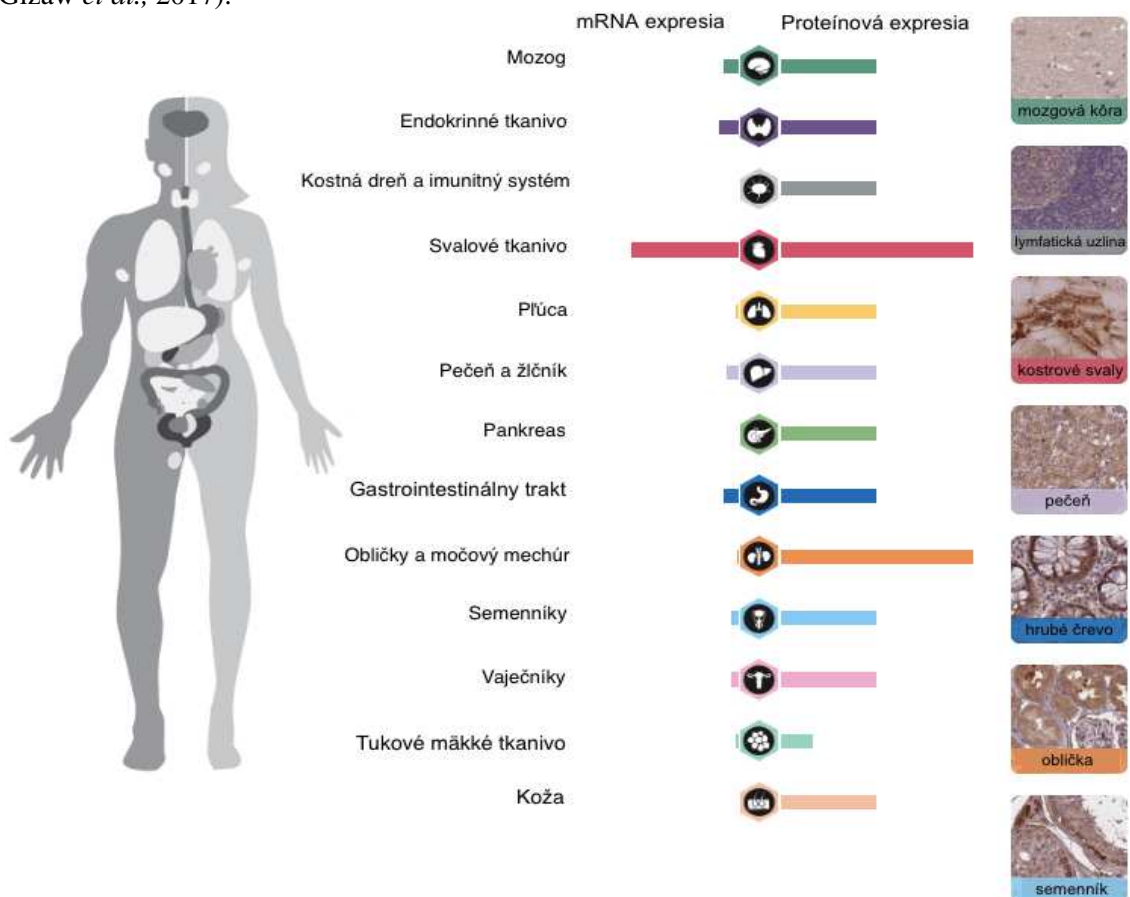
Bola preukázaná relatívne vysoká hladina mRNA pre FNDC5 v mozgu (Dun *et al.*, 2013; Forouzanfar *et al.*, 2015; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016), a aj v ľudskom mozgovomiechovom moku, ale jeho úloha v mozgu je do značnej miery neznáma (Hasemi *et al.*, 2013; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).

K relatívne vysokej expresii mRNA pre FNDC5 gén dochádza aj v hypofíze, placente, semenníkoch a vaječníkoch ale aj v iných orgánoch ľudského tela (Obr. 3, Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).

Tiež bolo popísane, že niektoré látky ako napríklad metamorfín podporujú expresiu FNDC5 génu a následne uvoľňovanie irisínu z kostrového svalstva (Li *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016). V štúdií Varela-Rodrígueza *et al.*, (2016) liečba metamorfínom viedla k prudkému poklesu telesnej váhy a zníženiu tukového prírastku. Po 6 mesiacoch liečby metamorfínom dochádza k významnému zníženiu tukovej hmoty a telesnej hmotnosti (Li *et al.*, 2015; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).



Obr. 2 Štruktúra irisínu a jeho schematické proteolytické štiepenie (prevzaté a upravené podľa Gizaw *et al.*, 2017).



Obr. 3 Grafické znázornenie expresie mRNA FNDC5 vľavo, proteínu FNDC5 vpravo, v jednotlivých orgánoch ľudského tela spolu s ilustratívnym vynesím ich množstva. Napravo sú zobrazené vybrané tkaniva s typickou morfológickou stavbou a s expresiou FNDC5 proteínu (prevzaté a upravené podľa proteinatlas.org - The human protein atlas).

2.1.3 Irisín a jeho vplyv na tkanivá

2.1.3.1 Vplyv irisínu na biele a hnedé adipocyty

Ako už bolo spomenuté, irisín aktivuje zmeny v bielom podkožnom tukovom tkanive, ktoré stimulujú jeho hnednutie a modulujú expresiu proteínu UCP1.

Existujú dva typy hnedých tukových buniek, jeden z nich sú klasické hnedé adipocyty vychádzajúce zo svalovej bunkovej línie (Seale *et al.*, 2008; Lepper a Fan, 2010; Zhang *et al.*, 2014) a druhé, ktoré vznikajú premenou bielych adipocytov a sú medzi nimi rozptýlene (Lefertova a Lazar, 2009; Lanning, 2010; Cinti, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Biele adipocyty ukladajú energiu, zatiaľ čo hnedé adipocyty túto energiu spotrebávajú (Cinti, 2004; Cannon *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2014).

Zmeny v aktivite hnedých adipocytov môžu vo veľkej miere ovplyvniť adaptívu termogenézu a glukózovú homeostázu (Cederberg *et al.*, 2001; Feldmann *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014). Termogénna schopnosť hnedého adipocytu je sprostredkovaná najmä cez UCP-1 proteín, ktorý sprostredkovať uvoľnenie energetického potenciálu získaného z potravy ako teplo (Barbera *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2014).

2.1.3.2 Vplyv irisínu na myocyty a kostné tkanivo

Irisín funguje ako autokrinná zložka vedúca k zvýšeniu metabolizmu vo svaloch po jeho uvoľnení (Vaughan *et al.*, 2014). Podľa koncentrácie a dĺžky pôsobenia irisínu dochádza k zvýšeniu metabolizmu u myocytov. Po aplikácii 5 nM irisínu na myocyty dochádza po 1 až 4 h k zvýšeniu glykolytického metabolizmu, po ktorom nasledoval vzrast mitochondriálnej bioenergie. Po 24 h aplikácií bol pozorovaný postupný vzostup bazálno-oxidačného metabolizmu (Vaughan *et al.*, 2014).

Irisín má vplyv okrem iného aj na génovú expresiu, ktorá sa prejavuje nárastom mitochondriálnej biogenézy, vďaka čomu môžu bunky viac využívať oxidačný metabolizmus ako glykolýzu. Tieto zistenia podporujú predpoklad, že irisín môže hrať dôležitú úlohu pri liečbe obezity (Vaughan *et al.*, 2014).

Predpokladá sa, že irisín by mohol byť zodpovedný za ochranný účinok kostrových svalov a kostného tkaniva (Colaianni *et al.*, 2014). Irisín má pravdepodobne vplyv na postupnú stratu svalovej hmoty s vekom, kvôli jeho klesajúcej koncentrácii v krvi (Huh *et al.*, 2012; Moreno-Navarrete *et al.*, 2013).

Irisín hrá ústrednú úlohu pri kontrole kostnej hmoty, čo vedie k pozitívnym účinkom na kortikálnu minerálnu hustotu a mechanické vlastnosti kostí. Tento účinok na kostné tkanivo je už viditeľný za použitia dávky irisínu, ktorá je 70 krát nižšia ako dávka potrebná na indukciu hneďnutia bieleho tukového tkaniva, čo naznačuje, že kostra je primárnym cieľovým orgánom tohto myokínu (Colaianni *et al.*, 2015; Colaianni *et al.*, 2018).

Medzi svalstvom a kosťami dochádza ku komunikácií na molekulárnej úrovni skrz biochemické signály, ktoré sú dôležité pre optimálnu funkciu týchto tkanív (Huang *et al.*, 2017; Colaianni *et al.*, 2014). Irisín je účinný pri prevencii a obnovení strát kostného tkaniva ale aj svalov u myšieho modelu postihnutého osteoporózou a svalovú atrofiu. Liečba irisínom úplne zabraňuje strate svalov a znižovaniu veľkosti svalového vlákna (Colaianni *et al.*, 2014; Colaianni *et al.*, 2018).

Ak by boli výsledky budúceho výskumu potvrdené u ľudí, mohli by viesť k vyvinutiu liečby založenej na irisíne pre fyzicky postihnutých alebo lôžkových pacientov a mohli by predstavovať prevenciu pre astronautov vystavených mikrogravitácii (Colaianni *et al.*, 2018).

2.1.4 Irisín a jeho aplikovateľnosť v medicíne

Irisín by mohol mať široký terapeutický potenciál pre liečbu obezity, diabetu a iných, predovšetkým metabolických ochorení. Pravdepodobne by mohol byť pripravený a dodaný ako injektovateľný polypeptid (Bostorm *et al.*, 2012).

Obezita je hnacou silou metabolického syndrómu a stala sa jednou z najdôležitejších zdravotných problémov 21. storočia, ktoré sú hlavným rizikovým faktorom rozvoja kardiovaskulárnych ochorení a diabetu typu 2. Metabolický syndróm sa vyznačuje sériou porúch, ako je obezita, inzulínová rezistencia, glukózová intolerancia a hyperlipidémia (McCarthy, 2010; Travers a McCarthy, 2011). U pacientov s metabolickým syndrómom bola nameraná výrazne vyššia hladina irisínu ako u pacientov bez tohto syndrómu (Park *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015). Pri znížení množstva bieleho tukového tkaniva sa expresia FNDC5 proteínu v týchto úložiskách zvýšila a pokúsila sa kompenzovať stratu tkaniva (Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).

Ďalšie potenciálne dôležité aspekty irisínu sa týkajú priaznivých účinkov cvičenia, najmä pri niektorých ochoreniach, pre ktoré neexistujú účinné liečebné postupy. Klinické spojenie cvičenia so zdravotnými prínosmi pri mnohých iných chorobách

naznačujú, že irisín by mohol mať významné účinky na tieto poruchy (Bostorm *et al.*, 2012).

2.1.4.1 Obezita

Všeobecne môžeme o obezite povedať, že k jej vývoju dochádza v momente, keď energetický príjem presahuje energetický výdaj (Speakman, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Pri obezite zohrávajú dôležité úlohy periférne tkanivá, ako napríklad tukové tkaniva, pečeň, svaly ale aj neurohormonálna a neurotransmitterová disregulácia (Belgardt *et al.*, 2010a; Belgardt *et al.*, 2010b; Thaler *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2013; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).

Irisín zvyšuje celkový výdaj telesnej energie a zvyšuje rezistenciu spojenú s obezitou. Pôsobením irisínu dochádza k premene bieleho tukového tkaniva na hnedé (Bostorm *et al.*, 2012).

Zhang *et al.*, (2014) objasnil molekulárny mechanizmus a signalizačnú dráhu sprostredkujúcu indukciu hnedých adipocytov irisínom. Irisín stimuluje expresiu špecifického génu v hnedých adipocytoch cez aktiváciu ERK a p-38 MAPK. Tento efekt je pravdepodobne sprostredkovaný cez špecifický membránový receptor na hnedých adipocytoch, avšak na potvrdenie tohto predpokladu sú potrebné ďalšie štúdie (Zhang *et al.*, 2014).

Exogénne podávanie irisínu indukuje u obéznych myší hnednutie podkožného tuku a termogenézu. Už relatívne krátka liečba myší irisínom stabilizuje glukózovú homeostázu a spôsobuje malú stratu hmotnosti (Bostorm *et al.*, 2012). Výrazne zvýšenie výdavkov na energiu tela a zvýšená odolnosť na inzulínovou rezistenciu spojenú s obezitou potvrdili aj ďalšie myšie štúdie (Huh *et al.*, 2012; Lecker *et al.*, 2012; Timmons *et al.*, 2012; Moreno-Navarrete *et al.*, 2013).

Zvýšenie výdavkov energie je pravdepodobne spôsobené dvoma dôvodmi. Jedným z nich je, že irisín indukuje zvýšenie lipolýzy (odburávanie tuku uloženého v tukových bunkách) prostredníctvom cAMP-PKA-HSL signálnej dráhy a proteínu perilipínu. Druhým dôvodom je, že irisín indukuje tvorbu väčšieho množstva tepla kvôli zvýšenej expresii UCP1, ktorý spôsobuje rýchlu oxidáciu mastných kyselín (Xiong *et al.*, 2015). Lipolýzny efekt irisínu môže zohrávať výhodnú metabolickú úlohu pri znižovaní akumulácie lipidov v tkanivách a znížení hladín lipidov v sére a tým vo svojom dôsledku predchádzať obezite (Xiong *et al.*, 2015).

Okrem, zvýšenia výdaju energie a úbytku hmotnosti po liečbe irisínom, dochádza aj k zníženiu hladiny norepinefrínu a krvného tlaku u obeznych myší, čo naznačuje dôležitú úlohu pri prevencii obezity a s ňou súvisiacej hypertenzie. Je potrebné poznamenať, že irisín zlepšil bazálnu lipolýzu, ale nespôsobil lipolýzu indukovanú (Xiong *et al.*, 2015).

2.1.4.2 Diabetes mellitus

Ako už bolo spomenuté v predošlej kapitole, obezita je bežne spojená s inzulínovou rezistenciou a zdá sa, že subjekty trpiace obezitou majú veľké riziko vzniku diabetu typu 2 (Gesta *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014). Biele tukové tkanivo je primárnym miestom uchovávanía energie a uvoľňovania hormónov a cytokínov, ktoré modulujú celkový telový metabolizmus a inzulínovú rezistenciu (Aldhani a Hamdy, 2003; Farmer, 2006; Ronti *et al.*, 2006; Rosen a Spiegelman, 2006; Choi *et al.*, 2013). Hnedé tukové tkanivo ovplyvňuje metabolizmus celého tela a môže zmeniť citlivosť na inzulín a upraviť náchylnosť k nárastu hmotnosti. Zlepšenie termogenézy hnedého tuku je preto cieľom v terapii proti obezite a metabolickým ochoreniam (Lowell *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2003; Almind *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2013). Choi *et al.* (2013) predpokladá, že narušenie signalizačnej dráhy irisínu v tukovom tkanive môže byť spojené s vývojom diabetu typu 2.

Meraním hladiny cirkulujúceho irisínu u subjektov s diabetom typu 2 alebo inzulínovou rezistenciou došlo k nastoleniu nového pohľadu na patológiu týchto stavov. Hladina cirkulujúceho irisínu je výrazne nižšia u pacientov trpiacich diabetom typu 2, ako u nediabetických kontrolných subjektov. Znížená hladina cirkulujúceho irisínu je preto nezávislým markerom novo diagnostikovaného diabetu typu 2 (Choi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Koncentrácie irisínu v sére sú úspešne zvyšované kontinuálnym podkožným podávaním inzulínu (Li *et al.*, 2016; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016). Tieto tvrdenia sú podporené tým, že irisín je pozitívne asociovaný s expresiou génov súvisiacich s inzulínovými dráhami (Moreno-Navarrete *et al.*, 2013).

Irisín zvyšuje senzibilizáciu inzulínového receptora v kostrovom svalstve a srdci, vďaka čomu zlepšuje inzulínovú rezistenciu a s tým súvisiací diabetes typu 2. Okrem toho zlepšuje aj metabolizmus lipidov, funkciu pankreatických β buniek a ako už bolo spomínané, transformáciu bieleho tukového tkaniva na tkanivo hnedé (Liu *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015; Gizaw *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Podkožná aplikácia irisínu taktiež zlepšuje pečenevú citlivosť na inzulín a

znižuje hladinu glukózy v krvi (Park *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2016; Gizaw *et al.*, 2017).

Irisín je aj inzulín-regenerujúcim hormónom a môže urýchliť generáciu myších β buniek pankreasu a tak zvýšiť ich počet (Moon *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014; Gizaw *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Regenerácia β buniek u človeka môže predstavovať novú cestu na liečbu diabetu (Song *et al.*, 2014; Gizaw *et al.*, 2017).

V boji proti morbidnej obezite dochádza k využívaniu bariatrickej chirurgie. U pacientov po vykonanom zákroku a znížení hmotnosti, dochádza k poklesu expresie FNDC5, aj cirkulujúceho irisínu. Tieto vzájomne vzťahy naznačujú kompenzáciu úlohy irisínu skrz reakciu, ktorou dochádza k zhoršeniu citlivosti na inzulín a metabolizmu glukózy (Huh *et al.*, 2012; Moreno-Navarrete *et al.*, 2013).

Nadmerná expresia FNDC5 sprostredkovaná lentivírusovým vektorom, podobne ako infúzia irisínu pod kožu, výrazne zlepšuje metabolické poruchy a inzulínovu rezistenciu u obéznych myší. Okrem toho dochádza aj k zníženiu hladiny glukózy v krvi, spolu s rastom výdaju energie (Xiong *et al.*, 2015).

U hlodavcov sa ukázalo, že biele podkožné tukové tkanivo, od zdravého (Tran *et al.*, 2008; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016) alebo trénovaného (Stanford *et al.*, 2015; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016) jedinca sa zdá byť relatívne vhodné k transplantácií do vnútrobrušného tuku obklopujúceho vnútorne orgány, čo viedlo k zlepšeniu glukózového metabolizmu a citlivosti na inzulín.

Účinky irisínu na diabetes typu 2, inzulínovú rezistenciu a obezitu je možné vysvetliť existenciou vzťahu medzi irisínom a glukózovým metabolizmom, avšak sa zdá, že pozitívne účinky irisínu na glukózový metabolizmus sú sprostredkované inými faktormi u diabetu typu 2 (Choi *et al.*, 2013).

Tieto zistenia poskytujú nové poznatky k prínosu irisínu v metabolizme glukózy, v bunkách kostrového svalstva aj tukovej hmoty, a mohli by sa potenciálne stať zameraním budúceho výskumu na liečbu cukrovky.

2.1.4.3 Neurologické aspekty

Pravdepodobná prítomnosť irisínu zohráva svoju úlohu aj pri regulácii tvorby neurónov.

Inhibícia FNDC5 znižuje neurogenézu (Hasemi *et al.*, 2013; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016), zatiaľ čo jej nadmerná expresia stimuluje neurónovú diferenciáciu (Forouzanfar *et al.*, 2015; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016). Farmakologické dávky irisínu zvyšujú proliferáciu neurónových buniek myšieho hipokampu. Toto zistenie podporuje myšlienku, že irisín má periférnu aj centrálu funkciu (Moon *et al.*, 2013; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).

2.1.5 Metódy detekcie irisínu

K detekcii irisínu sa vo väčšine prípadov využívajú imunologické metódy zisťujúce prítomnosť anti-irisín protilátky. Avšak, veľa štúdií využívajúcich tieto metódy bola spochybnená (viď. podkapitola 2.1.6). Okrem imunologických metód je irisín možné detegovať a kvantifikovať aj pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Široko využívanou a veľa krát jedinou metódou detekcie a kvantifikácie irisínu je vo väčšine štúdií metóda ELISA. Niekoľko komerčných zdrojov začalo s predajom súprav ELISA, EIA a RIA na detekciu a kvantifikáciu irisínu v rôznych biologických tekutinách, po záťažových stavoch alebo rôznych ochoreniach (Sanchis-Gomar *et al.*, 2014; Elsen *et al.*, 2014; Albrecht *et al.*, 2015).

Imunoblottingom proti anti-FNDC5 protilátke boli v sére detegované viaceré pásy (Bostrom *et al.*, 2012). Cirkulujúci irisín, hydrolytický odštiepný od FNDC5 proteínu, je silne glykozilovaný. Komplexná deglykolizácia séra zohráva pri detekcii irisínu immunoblotom dôležitú úlohu. Western blotting detegoval pásy na úrovni 32 kDa. Po podrobení deglykolyzácii séra došlo k detekcii irisínu na úrovni 24 kDa (Bostrom *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). Jedrychowsky *et al.* (2015) detegoval irisín na úrovni 12 kDa, predikovanej veľkosti irisínu, po komplexnej deglykolizácii proteínovým deglykolyzačným mixom. U detekcie rekombinantného irisínu produkovaného kvasinkami v rôznom čase, boli pozorované tri proteinové pásy na úrovni 25 kDa, 22 kDa a 15 kDa (Zhang *et al.*, 2014).

K detekcii irisínu sa okrem imunologických metód využíva hmotnostná spektrometria, ktorá tiež býva využívaná aj ako doplnková metóda k western blottingu pre overenie správnosti imunologickej detekcie. Doposiaľ najrevolučnejšia štúdia v

detekcii irisínu tandemovou hmotnostou spektrometriou stanovila koncentráciu cirkulujúceho irisínu na úroveň $3,6 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ u respondentov bez zvýšenej aeróbnej činnosti a $4,3 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ u respondentov vykazujúcich zvýšenú aeróbnú aktivitu. Táto metóda sa považuje za doteraz najpresnejšiu (Jedrychowski *et al.*, 2015).

2.1.6 Problémová detekcia irisínu

Detekčné metódy tohto proteínu sú zatiaľ značne limitované, a preto sa objavili pochybnosti o samotnej existencii cirkulujúceho irisínu (Erickson *et al.*, 2013; Albrecht *et al.*, 2015; Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).

Ľudský FNDC5 má atypický štart kodón, ATA, namiesto typického ATG (Ingolia *et al.*, 2011; Ivanov *et al.*, 2011; Jedrychowski *et al.*, 2015). Albrecht *et al.* (2015) a Erickson *et al.* (2013) argumentovali tým, že ak ľudský FNDC5 existuje, je translatovaný z ATG, a preto je irisínový polypeptid mýtus a neexistuje. Okrem toho, títo autori označili veľké množstvo predchádzajúcich štúdií zaoberajúcich sa detekciou irisínu za artefakty s nízkou protilátkovou špecifitou (Erickson *et al.*, 2013; Albrecht *et al.*, 2015; Jedrychowski *et al.*, 2015). Albrecht *et al.* (2015) preukázal krížovú reakciu protilátky s ostatnými proteínmi v krvnom sére aj plazme rôznych druhov a identifikácia proteínu o rovnakej veľkosti (od 12 kDa do 32 kDa v závislosti od deglykolizácie) ako irisín sa mu nepodarila. Dokonca aj protilátka, ktorá bola používaná na identifikáciu irisínu Bostromom *et al.* (2012) rozpoznávala C-terminálny koniec FNDC5, ktorý nie je súčasťou štiepeného irisínu. U imunoprecipitácie protilátkou proti rekombinantnému irisínu nedošlo k detekcii pásov o veľkosti 25 kDa a 16 kDa, ale až analýzou pomocou hmotnostnej spektrometrie došlo k identifikácií irisínu (Albercht *et al.*, 2015; Sanchis-Gomar *et al.*, 2015).

Avšak, Jedrychowski *et al.* (2015) pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie jednoznačne preukázal, že ľudský irisín existuje, cirkuluje v krvi a je regulovaný cvičením. Okrem detekcie hmotnostnou spektrometriou, využili imunoblotovanie vzoriek krvnej plazmy s polyklonálnymi protilátkami, z rovnakého komerčného zdroja ako bol použitý pri ELISA testovaní v štúdií Varela-Rodrígueza *et al.* (2016). V oboch prípadoch bol irisín detegovaný na páse o veľkosti 12 kDa, čo naznačuje, že táto protilátka účinne funguje (Varela-Rodríguez *et al.*, 2016).

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Pre účely praktickej bakalárskej práce boli Ústavom molekulárnej a translačnej medicíny poskytnuté séra (sérum 1 až 5). Spektrofotometricky bola stanovená koncentrácia celkového proteínu metódou s bicinchonovou kyselinou (BCA). Merania absorbancie boli uskutočnené na prístroji Multi Plate Reader EnSpire(R) (Perkin Elmer, USA). Koncentrácia celkového proteínového množstva sa pohybovala v rozmedzí $166,6\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ až $245,3\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Sérum bolo uskladnené pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2 Chemikálie

- 30 % akrylamid (Bio-Rad, USA)
- Acetonitril (ACN, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Albumínove štandardy pre BCA metódu (ThermoScientific, USA)
- Bromfenolová modrá (BFB, Boehringer Mannheim, Nemecko)
- Butanol (ButOH, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Coomassie Brilliant Blue (QC Colloidal Coomassie Stain, Bio-Rad, USA)
- Dithiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dodecylsulfát sodný (SDS, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Etylenmorfolin (EtMf, Fluka, Nemecko)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Hydrogenuhličitan amónny (AMBIC, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Jódoacetamid (IAA, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kyselina mravenčia pre LC-MS/MS (FA, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kyselina octová pre LC-MS/MS (AA, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kyselina trifluoroctová (TFA, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Lyzín (Lys-C, Promega, USA)
- Metanol pro LC-MS/MS (MeOH, Merck, Nemecko)
- Milli-Q voda (H_2O , Merck, Nemecko)

- Močovina (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Molekulový marker (Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific, USA)
- N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín (TEMED, Bio-Rad, USA)
- Persultát amónny (APS, Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Reagent A pre BCA (Thermo Scientific, USA)
- Reagent B pre BCA (Thermo Scientific, USA)
- Reperen silan (GE Healthcare, USA)
- Tris(2-karboxyetyl)fosfín (TCEP, Promega, USA)
- Tris-glycín (TG, Bio-Rad, USA)
- Tris-glycín -SDS pufer (TGS, Bio-Rad, USA)
- Tris-hydrochlorid (Tris-HCl, Bio-Rad, USA)
- Trypsín (Promega, USA)
- Uhličitan amonný (AMBIC, Sigma-Aldrich, Nemecko)

3.1.3 Roztoky

Elektródove pufre:

- Pufer pre CEGE elektroforézu:
Pre prípravu 1 l pufru pre CEGE bolo zmiešaných 100 ml 10x koncentrovaného TGS pufru s 10 ml 10 % SDS a 890 ml H₂O.
- Pufer pre 1D SDS-PAGE elektroforézu:
Pre prípravu 1 l pufru bolo zmiešaných 100 ml 10x koncentrovaného TGS pufru s 900 ml H₂O.
- 10 % SDS:
Pre prípravu 10 ml 10 % SDS bol zmiešaný 1 ml SDS s 9 ml H₂O.

Nanášací pufer pre 1D SDS-PAGE elektroforézu a CEGE:

- 5x riedený nanášací pufer:
Pre prípravu 10 ml nanášacieho pufru bolo zmiešaných 6,25 ml 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8, 3,75 ml glycerolu, 1g SDS a 2,5 µg BFB. Pufer bol následne alikvotovaný po 200 µl a uskladnený pri -20 °C.

- 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8:

Na prípravu 7 ml 0,5 M Tris-HCl bolo zmiešaných 3,5 ml Tris-HCl a 3,5 ml H₂O, následne bolo pH roztoku upravené na hodnotu 6,8.

Pracovný roztok pre BCA metódu:

- Pracovný roztok pre BCA metódu bol pripravený zmiešaním Reagentu A s Reagentom B v pomere 50:1.

Roztok 8 M močoviny v 50 mM AMBICu:

- Roztok 50 mM AMBICu bol pripravený rozpustením 0,1976 g AMBICu v 50 ml H₂O.
- Roztok 8 M močoviny v 50 mM AMBICu bol pripravený rozpustením 7,2 g močoviny v 15 ml 50 mM AMBICu.

Roztoky pre chromatografiu:

- Mobilá fáza A (0,1 % FA v H₂O):
Pre prípravu 300 ml mobilnej fázy A bolo rozpustených 300 µl FA v 300 ml H₂O.
- Mobilá fáza B (0,1 % FA v ACN):
Pre prípravu 300 ml mobilnej fázy B bolo rozpustených 300 µl FA v 300 ml ACN.
- Roztok pre nanášanie vzorky na LC-MS/MS (1 % ACN s 0,05 % TFA v H₂O):
Pre prípravu 300 ml roztoku pre nános vzoriek boli zmiešané 3 ml ACN s 0,15 ml TFA v 296,85 ml H₂O.

Roztok pre elúciu peptidov z CEGE:

- Roztok (50 % ACN s 0,1 % TFA):
Pre prípravu 10 ml elučného roztoku bolo zmiešaných 5 ml ACN s 10 µl TFA a 4,99 ml H₂O.

Roztok pre extrakciu peptidov u 1D SDS-PAGE A CEGE:

- 50 % ACN:
Pre prípravu 1 ml 50 % ACN bolo zmiešaných 500 µl ACN a 500 µl H₂O.
- Roztok (0,1 % TFA v 80 % ACN):
Pre prípravu 5 ml extrakčného roztoku bolo zmiešaných 5 µl TFA s 4 ml ACN a 995 µl H₂O.

Roztok pre fixáciu gélu z 1D SDS-PAGE a CEGE:

- Fixačný roztok:

Fixačný roztok bol pripravený zmiešaním MeOH, H₂O a AA v pomere (50:45:5; 250 ml:225ml:25 ml).

Roztoky pre premývanie purifikovaných peptidov (CEGE):

- Roztok na premývanie (1 % ACN s 0,1 % TFA):

Pre prípravu 5 ml roztoku bolo zmiešaných 5 µl TFA s 50 µl ACN a 4945 µl H₂O.

- Roztok na premývanie (80 % ACN s 0,1 % TFA):

Pre prípravu 5 ml roztoku bolo zmiešaných 5 µl TFA s 4 ml ACN a 995 µl H₂O.

Roztoky pre prípravu gélov u 1D SDS-PAGE a CEGE:

- 10 % APS:

Pre prípravu 1 ml 10 % APS bolo zmiešaných 100 µl APS a 900 µl H₂O.

- 10 % SDS:

Pre prípravu 1 ml 10 % APS bolo zmiešaných 100 µl SDS a 900 µl H₂O.

- 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8:

Pre prípravu 150 ml 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8 bolo rozpustených 27,23 g Tris bázy v 80 ml H₂O, pH bolo upravené na 8,8 použitím HCl a následne bol roztok doriedený na objem 150 ml pomocou H₂O.

- 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8:

Pre prípravu 100 ml 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8 bolo rozpustených 6,06 g Tris bázy v 60 ml H₂O a pH bolo upravené pridaním HCl a roztok bol následne doriedený na objem 100 ml pridaním H₂O.

Roztoky pre purifikáciu peptidov:

- 0,5 % AA:

Pre prípravu 2 ml 0,5 % AA bolo zmiešaných 10 µl AA a 1990 µl H₂O.

- 80 % ACN:

Pre prípravu 5 ml 80 % ACN bolo zmiešaných 4 ml ACN a 1 ml H₂O.

- 0,1 % TFA:

Pre prípravu 5 ml 0,1 % TFA bolo zmiešaných 5 µl TFA a 4995 µl H₂O.

- Roztok (1 % ACN s 0,1 % TFA):

Pre prípravu 1 ml roztoku bolo zmiešaných 10 µl ACN s 1 µl TFA a 989 µl H₂O.

- Roztok B (2 % ACN s 0,1 % FA):

Pre prípravu 5 ml roztoku bolo zmiešaných 5 μ l TFA s 100 μ l ACN a 4895 μ l H₂O.

Roztoky pre redukciu, alkyláciu a štiepnie proteínov u vzoriek po 1D SDS-PAGE a CEGE:

- 50 mM IAA:

Pre prípravu 50 mM IAA bolo 375 μ l 1 M IAA nariedených H₂O na celkový objem 7,5 ml.

- 50 mM TCEP:

Pre prípravu 50 mM TCEP bolo 375 μ l 1 M TCEP nariedené H₂O na celkový objem 7,5 ml.

Roztoky pre redukciu, alkyláciu a štiepnie proteínov u vzoriek po precipitácií proteínov ACN:

- 0,05 M DTT:

Pre prípravu 1 ml 0,05 M DTT bolo rozpustených 7,71 mg DTT v 1 ml H₂O.

- 0,05 M IAA:

Pre prípravu 0,05 M IAA bolo rozpustených 9,25 mg IAA v 1 ml H₂O.

Roztok pre rozpustenie vzoriek po odparení:

- Roztok C (1 % ACN s 0,05 % TFA):

Na prípravu 1 ml roztoku bolo zmiešaných 10 μ l ACN s 0,5 μ l TFA a 989,5 H₂O.

Roztoky pre štiepenie proteínov trypsínom u 1D SDS-PAGE a CEGE:

- 50 mM AA:

Na prípravu 1 ml 50 mM AA bolo zmiešaných 2,86 μ l AA a 997 μ l H₂O.

- EtMf pufer (50 mM EtMF s 10 % ACN o pH 8,3):

Pre prípravu 25 ml EtMf pufru bolo zmiešaných 158 μ l EtMf s 2,5 ml ACN a 22,3 ml H₂O, pH bolo upravené pomocou AA alebo EtMf.

- Trypsín (500 ng· μ l⁻¹):

Trypsín o koncentrácií 500 ng· μ l⁻¹ bol pripravený rozpustením 100 μ g trypsínu v 200 μ l 50 mM AA.

- Trypsínový pufer (trypsin o koncentrácií 500 ng·µl⁻¹ nariadený 80x v EtMf pufru):
Trypsínový pufer bol pripravený zmiešaním 93,8 µl 500 ng·µl⁻¹ trypsinu na konečný objem 7,5 ml pomocou EtMf pufru.

3.1.4 Prístrojové vybavenie

- Analytické váhy (Scaltec SBC 21, Scaltec, Nemecko)
- Aparatúra pre CEGE (Mini Prep Cell, Bio-Rad, USA)
- Aparatúra pre odsatie vzoriek pod vákuom (TOMTEC, USA)
- Centrifuga (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Nemecko)
- Elektroforetická aparatúra (Mini-PROTEAN[®] Tetra Cells, Bio-Rad, USA)
- HLB matrica (Oasis[®] HLB µElution Plate 30µm, Waters, USA)
- Hmotnostný spektrometer (Orbitrap Elite[™] Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer, Thermo Scientific, USA)
- Inkubátor (MS Incubator, MS Major Science, USA)
- Kvapalinový chromatograf (UltiMate 3000 RSLCnano System, Thermo Scientific, USA)
- Minicentrifuga (MiniSpin, Eppendorf, Nemecko)
- Nanoelektrosprejový zdroj (EASY-Spray, Thermo Scientific, USA)
- Ohrevné hniezdo (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Nemecko)
- pH/mV Meter (UltraBASIC p-LAB, UB-10, Denver Instrument, USA)
- Separačná kolóna (EASY-Spray, PepMap[®] C18, 3 µm, 100 Å, 75 µm x 15 cm, Thermo Scientific, USA)
- Skener pre gély (GS-800 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad, USA)
- Spektrometer (Multi Plate Reader EnSpire(R), Perkin Elmer, USA)
- Trap kolóna (Acclaim PepMap C18, 5 µm, 100 Å, 100 µm x 2 cm, NanoViper, Thermo Scientific, USA)
- Trepačka (Vortex, Eppendorf, Nemecko)
- Vákuová odparka (Concentrator 5301, Eppendorf, Nemecko)
- Výrobník vody (Direct-Q 3 UV Water Purification System, Merck, Nemecko)
- Zdroj napätia (PowerPac[™] Basic Power Supply, Bio-Rad, USA)
- Zdroj vákua (WP6122050, MILLIPORE, USA)

3.1.5 Software

- Excel 12.0.4518.1014 (Microsoft Corporation, USA)

Program bol použitý pre vyhodnotenie dát z programu Perseus.

- MaxQuant 1.5.2.8 (Computational Systems Biochemistry, Nemecko)

Program bol použitý pri identifikácií peptidov/proteínov z nameraných MS a MS/MS spektier z hmotnostného spektrometru.

- Perseus 1.5.1.6 (Computational Systems Biochemistry, Nemecko)

Program bol použitý pre vyhodnotenie identifikovaných a kvantifikovaných proteínov.

- Quantity one 4.6.9 (Bio-Rad, USA)

Program umožnil skenovanie gélu a následnú úpravu získaných obrázkov.

3.2 Metódy

3.2.1 Postupy k stanoveniu hladiny ľudského irisínu zo séra

Pre izoláciu irisínu boli navrhnuté nasledujúce postupy, ktoré sú znázornené na obrázku č. 4.

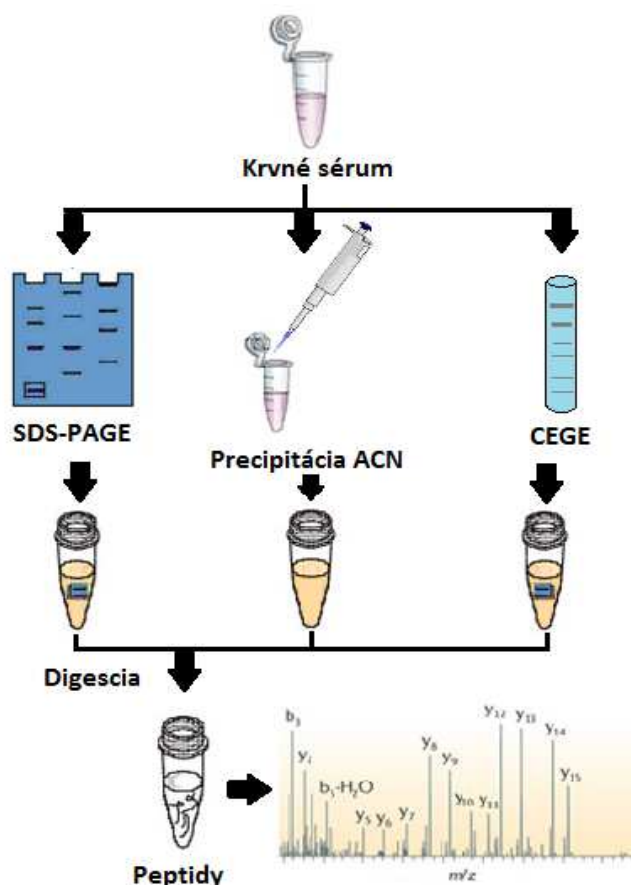
Prvý postup využíva 1D SDS-PAGE separáciu proteínov, na základe ich molekulovej hmotnosti. Tento prístup vychádza z práce Jedrychowski *et al.* (2015), kde detegovali prítomnosť irisínu prostredníctvom protilátky v oblasti 12 kDa, čo je irisínova predpokladaná molekulová hmotnosť. Po separácii proteínov na 1D SDS-PAGE elektroforéze boli vyrezané pásy gélu v oblasti 10 až 15 kDa. Proteíny z týchto pásov boli podrobené digescii v géle a získane peptidy boli po purifikácii analyzované na LC-MS/MS.

Druhý postup využíva precipitáciu proteínov zo séra pomocou acetonitrolu, čo umožňuje vyzrážanie predovšetkým vysoko abundantných proteínov. Postupné zvyšovanie obsahu ACN malo viesť k rôznym stupňom precipitácie proteínov vo vzorke a tým aj k zníženiu komplexity vzorky. Po centrifugácii bol odobraný supernatant, ktorý bol podrobený trypsinovému štiepeniu v roztoku. Získané purifikované peptidy z rôzneho stupňa precipitácie proteínov boli následne podrobené LC-MS/MS analýze.

Tretí postup pre izoláciu irisínu využíva kolónovú preparatívnu gélovú elektroforézu (GEGE). Táto metóda umožňuje nanosenie väčšieho množstva vzorky na gél v porovnaní s 1D SDS-PAGE elektroforézou. Po separácii proteínov bol gél narezaný na malé plátky (2 mm). Proteíny z týchto gélových plátok boli podrobené digescii v gélu a získane peptidy boli po purifikácii analyzované pomocou LC-MS/MS.

Proteínové vzorky po aplikácii vybraných metód boli následne podrobené enzymatickému štiepeniu v alkalickom prostredí (pH 8) cez noc. Samotnému štiepeniu predchádzal redukčný krok, kedy cysteniny spojené disulfidickými mostíkmi reagujú s DTT. Zredukované cysteiny boli karbamidometylované reakciou s IAA, aby sa zabránilo opätovnému spojeniu disulfidických mostíkov. Inkubácia s trypsínom prebiehala v alkalickom prostredí (pH 8) cez noc.

Vzniknutá peptidová zmes po štiepení proteínov bola prečistená pomocou C18 kolón, kvôli odstráneniu solí a prípadných gélových kontaminantov.



Obr. 4 Prehľad navrhnutých postupov pre separáciu a identifikáciu irisínu zo sér.

3.2.1.1 1D SDS-PAGE elektroforéza

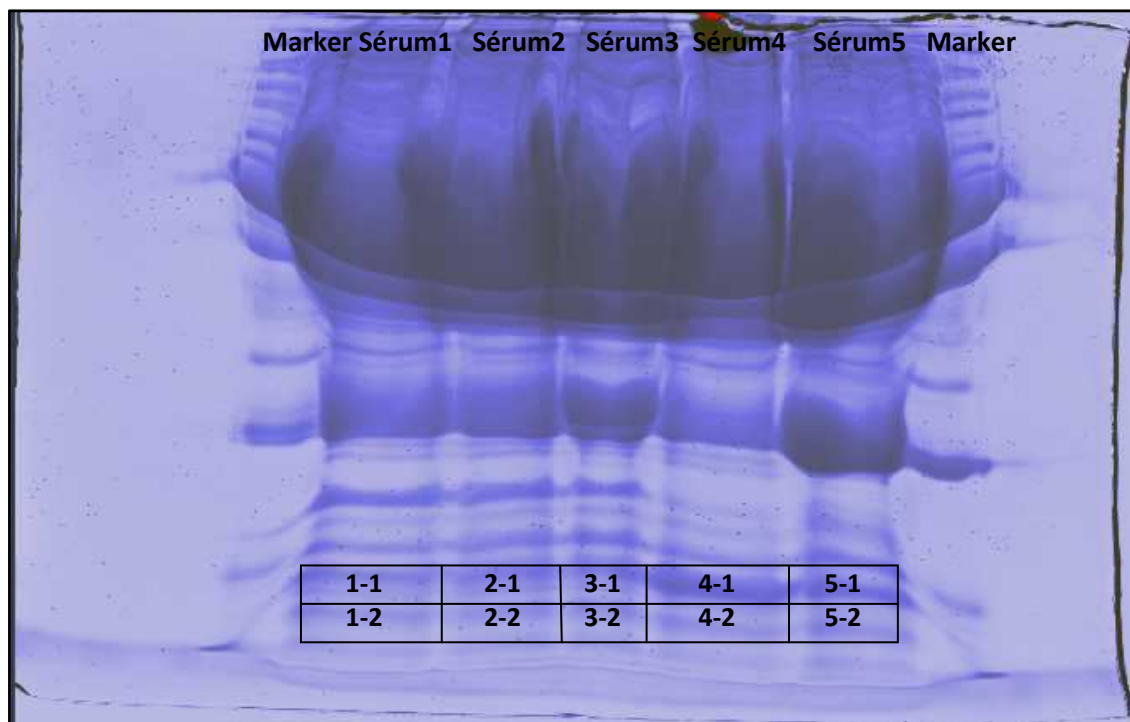
Príprava vzorky a 1D SDS-PAGE elektroforéza

Celkom bolo spracovaných päť rôznych vzoriek krvných sér na 1D SDS-PAGE elektroforéze.

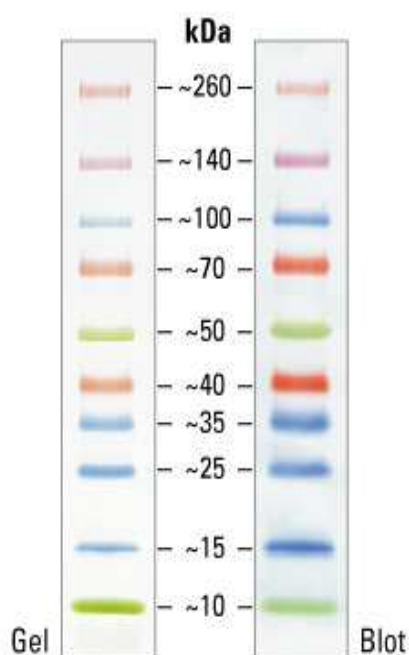
Na prípravu separačného gélu bolo použitých 6 ml 30 % akrylamidu, 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8, 4,95 ml destilovanej H₂O, 0,15 ml 10 % SDS, 6 µl TEMED a na záver bolo pridaných 0,15 ml 10 % APS. Takto pripravená zmes bola vliata do 3/4 predpripravenej kazety. Tuhnúci gél bol prekrytý tenkou vrstvou ButOH vytrepáného s H₂O. Po polymerizácii separačného gélu bol ButOH odobraný. Na separačný gél bol nanesený zaostrovací gél, ktorý bol namiešaný z 0,825 ml 30 % akrylamidu, 0,625 ml 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8, 3,5 ml H₂O, 50 µl 10 % SDS, 10 µl TEMED a na záver 50 µl 10 % APS. Aparatúra pre elektroforézu, do ktorej bol vložený polyakrylamidový gél, bola naplnená elektródovým pufrom. Na jednu jamku polyakrylamidového gélu bolo nanesených 300 µg proteínov.

Pri príprave vzorky na 1D SDS-PAGE bolo použitých 10 µl 1M DTT, 6 µl 5x koncentrovaného nanášacieho pufu a 300 µg proteínov. Objem pripravenej vzorky bol upravený pridaním príslušného množstva destilovanej H₂O, tak aby bol výsledný objem 30 µl. Takto pripravené vzorky boli zahriate v ohrevnom hniezde pri 99 °C po dobu 5 min. Vzorky boli ďalej ochladené na laboratórnu teplotu, premiešané na trepačke a stočené na minicentrifuge.

Na polyakrylamidový gél bolo nanesených 30 µl vzorky (jamka 2-6, Obr. 5). Bolo použitých 5 µl molekulového markeru na jamku (jamka 1 a 7, Obr. 5, 6). Po nanesení vzoriek do jamiek zaostrovacieho gélu bolo nastavené napätie pre elektroforézu na 100 V. Po doputovaní vzorky na rozhranie separačného gélu bolo napätie zvýšené na 120 V. Po ukončení elektroforézy bol gél vybratý z kazety na Petriho misku a fixovaný vo fixačnom roztoku po dobu 10 min., následne trikrát premytý destilovanou H₂O po dobu 10 min. Gél bol farbený Coomassie brilliant blue 15 min. a trikrát premytý destilovanou H₂O po dobu 10 min. Takto pripravený gél bol vložený do H₂O a uschovaný v chladničke pri 8 °C do ďalšieho dňa.



Obr. 5 12 % Polyakrylamidový gél farbený pomocou Coomassie brilliant blue, vyznačené úseky boli podrobené ďalšiemu spracovaniu a následnému meraniu na LC-MS/MS.



Obr. 6 Molekulový marker pre 1D SDS-PAGE, ktorý bol použitý pre sledovanie proteínovej separácie počas elektroforézy. Každý pás predstavuje proteínový štandard o známej molekulovej hmotnosti, ktorý slúži k dohľadaniu molekulovej hmotnosti proteínu zo vzorky. (Multicolor Broad Range Protein Ladder, CN 26634, Thermo scientific) (prevzaté z thermofisher.com - Thermo Fisher Scientific).

Redukcia, alkylácia a štiepenie proteínov po 1D-SDS PAGE elektroforéze

Pásky v oblasti 12 a 15 kDa, kde očakávame výskyt irisínu, boli pomocou skalpela vyrezané a podrobené následnému trypsínovému štiepeniu proteínov. Vyrezané pásky boli nakrájané na kocky o veľkosti 1x1 mm a premyté 400 µl ACN po dobu 5 min.

Redukcia disulfidických mostíkov bola uskutočnená pridaním 150 µl 50 mM TCEP po dobu 10 min., nasledovalo premytie 400 µl H₂O a 400 µl ACN.

Pridaním 150 µl 50 mM IAA boli SH skupiny alkylované po dobu 60 min. za tmy. Po alkylácii boli vzorky premyté 400 µl H₂O a 400 µl ACN (dvakrát po dobu 5 min.), v poslednom kroku premývania 400 µl 50 % ACN po dobu 5 min.

Proteíny boli štiepené pridaním 150 µl trypsínového pufru počas noci pri 37 °C.

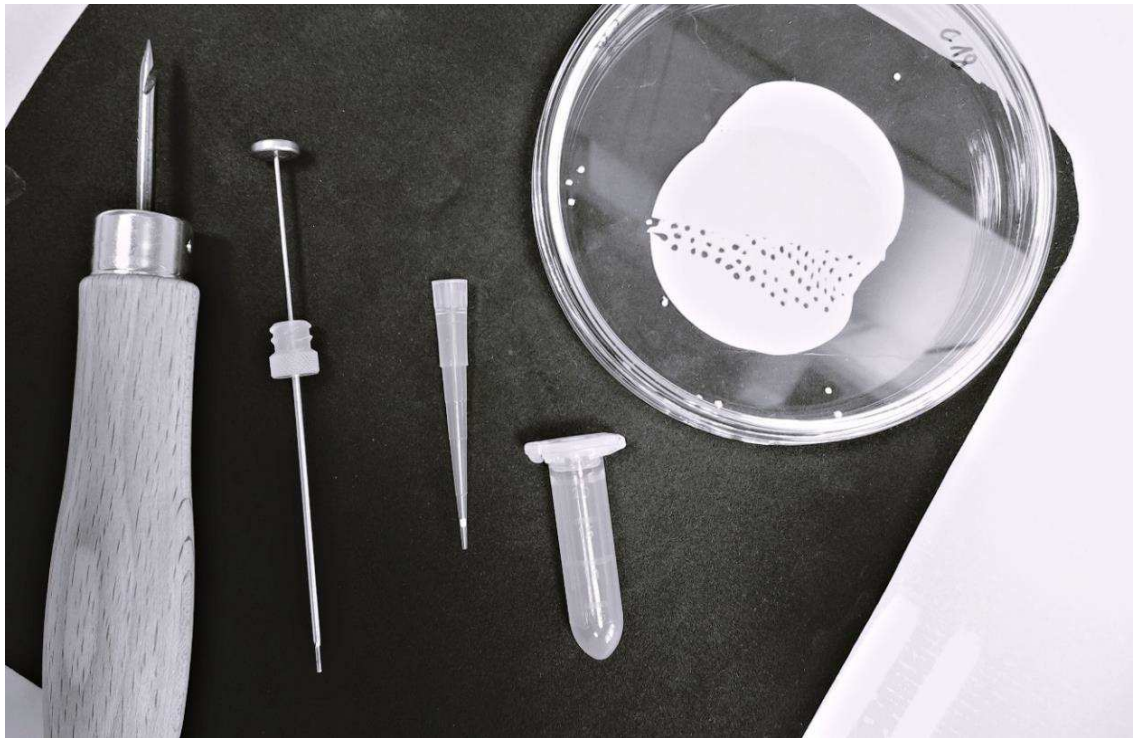
Extrakcia peptidov

Po štiepení boli vzorky ochladené na laboratórnu teplotu. Vzorky boli stočené a kvapalný obsah bol prenesený do nových mikroskúmaviek. Peptidy boli extrahované do 100 µl extrakčného roztoku po dobu 10 min., potom bol obsah prenesený do mikroskúmaviek. V druhom kroku bolo pridaných 150 µl 0,1 % TFA po dobu 10 min. a obsah bol prenesený do mikroskúmaviek. V treťom kroku bolo pridaných 100 µl 50 % ACN po dobu 10 min., obsah bol prenesený do mikroskúmaviek. Spojené extrakty boli odparené vo vákuovej odparke a následne rozpustené v 150 µl 1 % ACN s 0,1 % TFA v H₂O.

Purifikácia peptidov

Peptidy boli purifikované prostredníctvom metódy Stage tip C18. Boli pripravené 200 µl pipetovacie špičky so sorbentom C18, ktorý bol pomocou ihly vyrezaný z C18 sorbentu (Obr. 7). Špičky boli umiestnené do pripravených 2 ml mikroskúmaviek.

Reverzná fáza C18 bola premytá nanesením 150 µl MeOH a centrifugovaná pri 3500 x g, 21 °C po dobu 3 min. Na reverznú fázu bolo pridaných 150 µl 80 % ACN a potom 150 µl 0,5 % AA, stáčenie prebiehalo za rovnakých centrifugačných podmienok ako v prvom kroku premývania. Kvapalina zachytená v mikroskúmave bola odstránená do odpadu.



Obr. 7 StageTip C18: ilustračný obrázok manuálnej prípravy špičky so sorbentom C18 (prevzaté z Broskevičová, 2016).

Na C18 boli nanesené vzorky o objeme 150 μ l a opäť centrifugované za rovnakých podmienok. C18 bola premytá 150 μ l 0,5 % AA a centrifugovaná pri 3 500 g, 21 °C po dobu 3 min. Stage tip bola prenesená do novej zbernej 1,5 ml skúmavky.

Peptidy boli eluované z C18 špičky pomocou 150 μ l 80 % ACN. Eluáty boli odparované vo vákuovej odparke pri 30 °C.

Získaná peptidová zmes bola rozpustená v 50 μ l 1 % ACN s 0,05 % TFA v H₂O a prenesená do označenej vialky pre následnú LC-MS/MS analýzu.

3.2.1.2 Precipitovanie proteínov zo séra pomocou ACN

Príprava vzorky a meranie proteínovej koncentrácie pomocou BCA meódy

Precipitáciou proteínov pomocou ACN bola analyzovaná vzorka séra č.1.

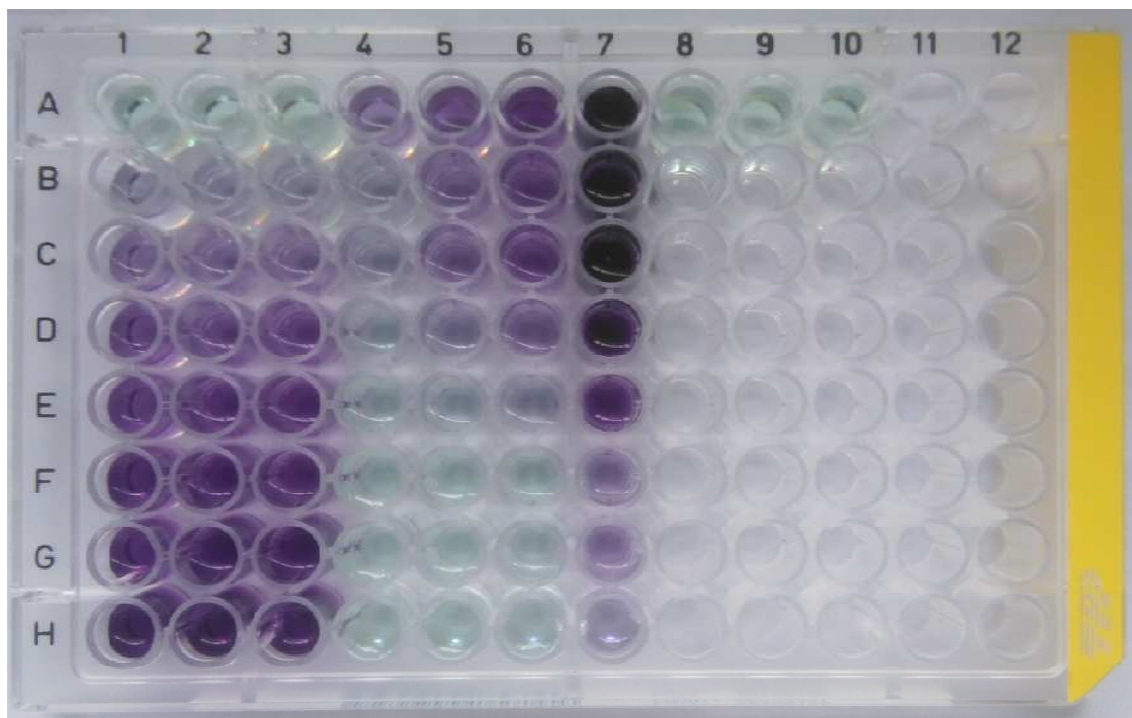
Precipitácia 20 μ l vzorky bola realizovaná pridaním ACN v rozsahu objemov 4 μ l až 30 μ l (Tab. 1) a následne centrifugovaná pri 12 000 x g, 21 °C po dobu 10 min. Po ukončení centrifugácie bol odobraný supernatant o rovnakom objeme ako bol prídavok ACN (Tab. 1) a odparený vo vákuovej odparke. Odparená vzorka bola rozpustená pridaním 5 μ l roztoku B.

Takto pripravené vzorky boli podrobené meraniu celkovej proteínovej koncentrácie pomocou BCA metódy. Vzorky boli nariadené, tak aby odpovedali čo najbližšej koncentrácií albuminového štandardu (Obr. 8). Na 96 jamkovú doštičku bolo nanosených 25 µl albuminových štandardov (125 - 2000 µg·ml⁻¹), 25 µl blankov (H₂O a roztok B) a 25 µl každej vzorky (Obr. 8). Do každej zaplnenej jamky bolo pridaných 200 µl pracovného roztoku pre BCA metódu, následovala inkubácia po dobu 30 min. pri 37 °C. Následne bola meraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 562 nm na spektrometre Multi Plate Reader EnSpire.

Tab. 1 Schéma laboratórneho postupu prípravy vzoriek pri postupe precipitácie proteínov zo séra pomocou ACN.

Názov vzorky	Vzorka 0	Vzorka 4	Vzorka 8	Vzorka 12	Vzorka 16	Vzorka 20	Vzorka 25	Vzorka 30
Vzorka [µl]	20	20	20	20	20	20	20	20
ACN [µl]	0	4	8	12	16	20	25	30
Centrifugácia 12000 g, 12 min.								
Odber supernatantu [µl]	0	4	8	12	16	20	25	30
Odpareníe vzoriek								
Roztok B [µl]*	10	10	10	10	10	10	10	10
Riedenie 250X: Vzorka [µl]/roztok B [µl]	1/249	1/249	1/249	1/249	1/249	1/249	1/249	1/249
Riedenie 100X: Vzorka [µl]/roztok B [µl]	1/99	1/99	1/99	1/99	1/99	1/99	1/99	1/99
Riedenie 50X: Vzorka [µl]/roztok B [µl]	1/49	1/49	1/49	1/49	1/49	1/49	1/49	1/49
Riedenie 5X: Vzorka [µl]/roztok B [µl]	5/20	5/20	5/20	5/20	5/20	5/20	5/20	5/20
Meranie koncentrácie: BCA metóda								

* Roztok B (2 % ACN s 0,1 % FA)



Obr. 8 96 jamková doštička z merania proteínovej koncentrácie vzoriek pomocou BCA metódy. Blank H₂O v sekcii A1-3, albumínové štandardy (125 - 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v sekcii B-H, každý štandard sa nachádza trikrát v riadku (1-3), vzorky riedené 250x sú v stĺpci 4, vzorky riedené 100x v stĺpci 5, vzorky riedené 50x v stĺpci 6, vzorky riedené 5x v stĺpci 7. Vzorky sú rozradené vzostupne, podľa obsahu pridaného ACN (0-30 μl) od A po H. Blank roztoku B sa nachádza v sekcii A8-10.

Redukcia, alkylácia a štiepenie proteínov u vzoriek po precipitácii proteínov ACN

Na základe nameranej koncentrácie bolo odobrané požadované množstvo vzorky so stanoveným obsahom proteínov (Tab. 2) a doriedené na objem 100 μl roztokom 8 M močoviny v 50 mM AMBICu. K vzorkám bolo pridaných 0,5 μl 0,05 M DTT, inkubácia po dobu 30 min. pri 56 °C. Po inkubácii bolo k vzorkám pridaných 1,4 μl 0,05 M IAA, následovala inkubácia po dobu 30 min. v tme pri laboratórnej teplote. Reakcia bola uhasená pridaním 1,6 μl 0,05 M DTT.

Proteíny boli naštiepené pridaním 1 μg Lys-C ku každej vzorke, inkubované 2 h pri 30 °C. Následne bol pridaný 1 μg trypsínu a vzorky boli inkubované cez noc pri 37 °C. Štiepenie bolo zastavené oxyslením vzoriek pomocou TFA na pH 2.

Tab. 2 Množstvo proteínov pre lyzínove a trypsínove štiepenie v jednotlivých vzorkách.

Názov vzorky	Vzorka 0	Vzorka 4	Vzorka 8	Vzorka 12	Vzorka 16
Množstvo proteínov pre štiepenie [μg]	20	20	20	10	2,5
Odobratý objem zo vzorky [μl]	22,1	75,0	66,1	69,6	22,4

Purifikácia peptidov na HLB matrici

Kolóna s HLB matricou pre purifikáciu peptidov bola premytá 500 μl MeOH, ktorý bol odsatý vákuom, následne bola kolóna premytá 500 μl 80 % ACN s 0,1 % TFA, ktorý bol taktiež odsatý vákuom. Equilibrácia kolóny sa uskutočnila nanesením 1 ml 0,1 % TFA a odsatím za pomoci vákua.

V ďalšom kroku boli na kolónu nanesené vzorky a odsaté vákuom. Nasledovalo dvojité premytie pomocou 1 ml 0,1 % TFA v H_2O .

Odpadná nádoba bola odobratá a peptidy boli eluované do novej zbernej doštičky pridaním 500 μl 80 % ACN s 0,1 % TFA a vákua.

Eluované peptidy boli odparené vo vákuovej odparke. Po odparení boli rozpustené v 100 μl roztoku C a prenesené do označenej vialky pre následnú LC-MS/MS analýzu.

3.2.1.3 Kolónova preparatívna gélova elektroforéza (CEGE)

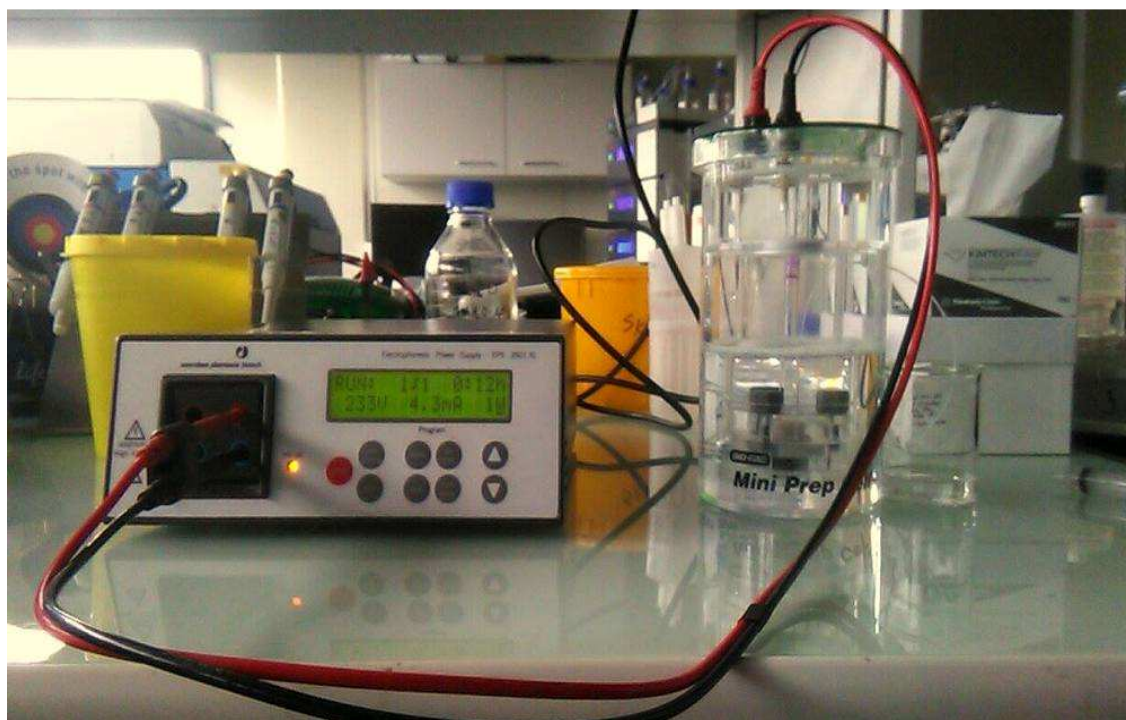
Príprava vzorky a postup pri CEGE elektroforéze

CEGE elektroforéza bola využitá pri separácii proteínov zo vzorky séra č. 1, kde bolo celkovo nanesených 4,165 mg proteínov.

Separčný gél bol pripravený zmiešaním 3,3 ml H_2O , 4 ml 30 % akrylamidu, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8, 0,1 ml 10 % SDS, 0,1 ml 10 % APS a na záver boli pridané 4 μl TEMED. Zmes bola vliata do trubičky, zmočenej Repen silanom, do výšky 90 mm. Naliata zmes bola prekrytá vrstvou H_2O . Po polymerizácii gélu, bola z jeho povrchu odliata vrstva H_2O . Zaostrovací gél bol pripravený z 1,4 ml H_2O , 0,33 ml 30 % akrylamidu, 0,25 ml 0,5 M Tris-HCl o pH = 6,8, 0,02 ml 10 % SDS, 0,02 ml 10 % APS

a ako posledný bol pridaný TEMED o objeme 4 μ l. Vrstva zaostrovacieho gélu bola naliata od 90 mm do 100 mm výšky stĺpca. Gél bol opäť preliaty vrstvou H₂O. Po polymerizácii bol gél nachystaný pre separáciu proteínov. Gél bol prenesený do predpripraveného CEGE systému. Separačná trubička bola prepláchnutá elektródovým pufrum. Elektródový pufer bol naliaty do spodnej a dvoch horných nádrží CEGE systému.

Vzorka bola pripravená pridaním 40 μ l 5x riedeného nanášacieho pufru, 162,3 μ l 1 M DTT do 25 μ l vzorky a zahriata v ohrevnom hniezde na 98 °C po dobu 5 min. Vzorka ochladená na laboratórnu teplotu bola premiešaná, stočená na minicentrifuge a nanesená na predpripravený polyakrylamidový gél. Zdroj bol nastavený na konštantný výkon 1 W (Obr 9). Po ukončení elektroforézy, bol gél fixovaný vo fixačnom roztoku po dobu 10 min. a následne trikrát premytý v destilovanej H₂O (Obr. 10). Gél bol ďalej uskladnený v H₂O pri 4 °C v chladničke.



Obr. 9 Ilustračný obrázok aparatury Mini Prep Cell pre separáciou proteínov.



Obr. 10 Ilustračný obrázok 12 % polyakrylamidového gélu po prebehnutj CEGE elektroforéze, kedy bol gél zafixovaný vo fixačnom roztoku a premytý H₂O. Gél je na obrázku nachystaný k nakrájaniu na plátky pomocou skalpela.

Redukcia, alkylácia a štiepenie proteínov vzoriek z CEGE elektroforézy

Gél z trubičky bol premytý v H₂O a narezaný na 2 mm plátky. Každý plátok bol narezaný na 1 x 1 mm kocky, ktoré boli prenesené do čistej mikroskúmavky. Nakrájane plátky boli premyté 400 µl ACN po dobu 5 min.

Následne bola uskutočnená redukcia, alkylácia a štiepenie proteínov (viď. podkapitola 3.2.1.1).

Extrakcia peptidov

Peptidy z gélu boli extrahované pomocou 200 µl extrakčného roztoku a po uplynutí 10 min. bol kvapalný obsah prenesený do nových mikroskúmaviek. Následne boli peptidy extrahované 300 µl 0,1 % TFA, po 10 min. na trepačke bol obsah pozbieraný do nových mikroskúmaviek. Posledný krok extrakcie peptidov z gélu bol pomocou 200 µl 50 % ACN, po 10 min. na trepačke bol kvapalný obsah opäť pozbieraný do mikroskúmaviek. Extrakty boli odparené vo vákuovej odparke a potom rozpustené v 150 µl 1 % ACN s 0,1 % TFA v H₂O.

Purifikácia peptidov na HLB matrici

Na purifikačnú kolónu bol nenesený 1 ml MeOH, ktorý bol odsatý a následne bola kolóna trikrát premytá 1 ml 80 % ACN s 0,1 % TFA a 1 ml 1 % ACN s 0,1 % TFA.

Odpadná nádoba bola vymenená za zbernú dosku. Vzorky boli nanosené na doštičku s HLB matricou, po odsatí boli vzorky ešte raz prepipetované na HLB matricu, po druhom nanosení bol obsah odsatý do odpadu. Kolóna bola trikrát premytá 1 ml 1 % ACN s 0,1 % TFA. Následne bola vymenená zberná odpadná doska za novú elučnú dosku. K elucii peptidov z kolóny došlo nanosením 250 μ l 50 % ACN s 0,1 % TFA, tento krok sa opakoval ešte raz. Eluáty boli prenesené do čistých mikroskúmaviiek a boli odparené v odparke. Čisté pepetidy boli rozpustené v 100 μ l roztoku C a prenesené do vialiek pre následnú LC-MS/MS analýzu.

3.3 LC-MS/MS analýza

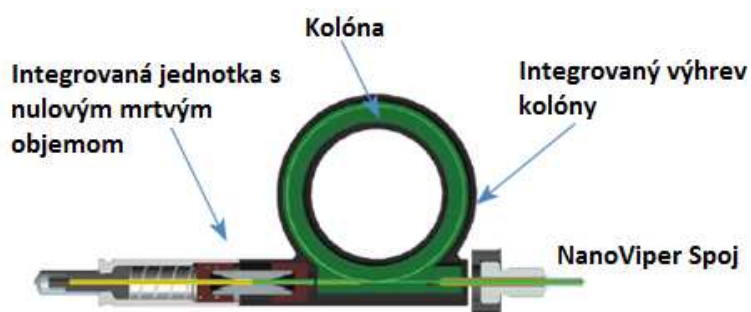
Všetky merania prebiehali na kvapalinovom chromatografe Dionex UltiMate 3000 RSLCnano System v spojení s hmotnostným spektrometrom Orbitrap Elite™ cez ionizačný zdroj EASY-Spray Source.

Chromatografická separácia prebehla za použitia separačnej kolóny EASY-Spray Pep/Map® C18, 3 μ m, 120 Å, 75 μ m x 15 cm; Obr. 11). Kolóna má zabudovanú sprejovaciu kapiláru a používa sa v kombinácii s nanoelektrosprejovým zdrojom EASY-SPRAY (Obr. 12). Pre nástrek vzorky na kolónu bola použitá nanášacia mobilná fáza o zložení 1 % ACN s 0,05 % TFA v H₂O. Nástrekový objem bol 20 μ l. Mobilná fáza A bola tvorená 0,1 % FA v H₂O a mobilná fáza B bola tvorená 0,1 % FA v ACN. Peptidová zmes bola nanosená mobilnou fázou o prietoku 6 μ l·min⁻¹ najskôr nanosená na trap kolónu Acclaim PepMap100 (C18, 5 μ m, 100 Å, 300 μ m x 5 mm) po dobu 5 min. Po uplynutí tejto doby došlo k prepnutiu ventilu a zachytené peptidy boli eluované do kolóny.

Bola uskutočnená nelineárna gradientová separácia o celkovej dobe 95 min. Na začiatku gradientu boli použité 2 % mobilnej fázy B po dobu 5 min., potom bolo zloženie mobilnej fázy zvyšované na 35 % po dobu 60 min. Počas 3 min. bolo zloženie mobilnej fázy zvýšené z 35 % na 90 %. Po dobu 5 min. bolo zloženie mobilnej fázy 90 % B, behom 2 min. kleslo na 2 % B a bolo udržiavané ďalších 20 min. až do konca

analýzy (Graf 1). Separácia bola gradientová (Graf 1) s prietokom mobilnej fázy $300 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1}$. Celová doba analýzy bola 95 min.

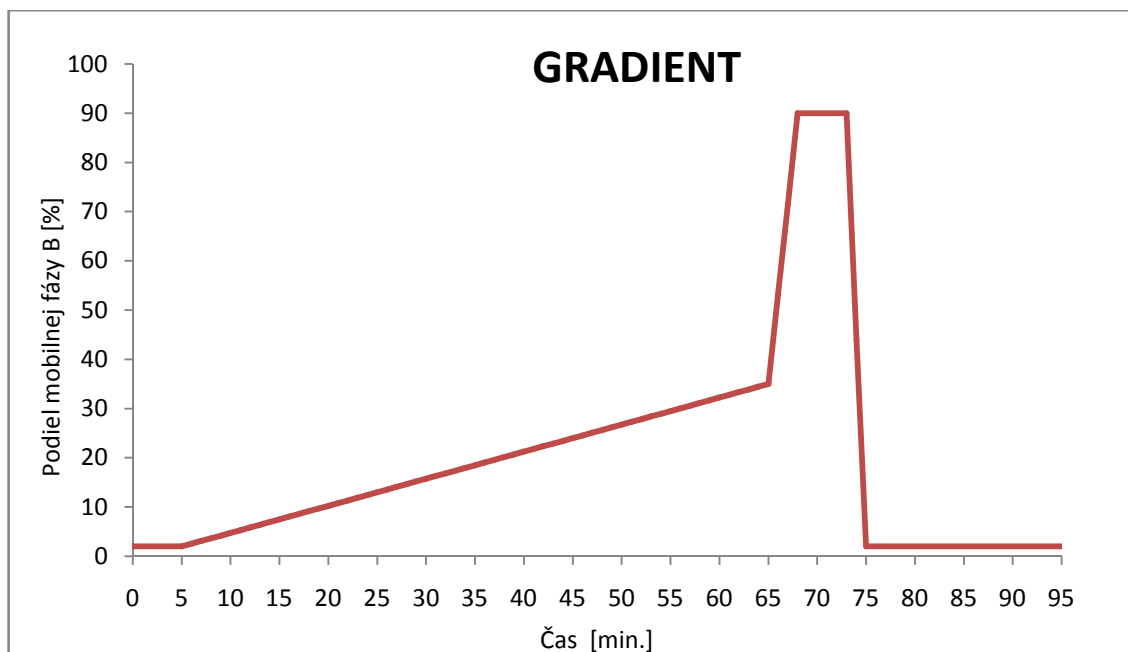
Analýza peptidov bola uskutočnená na hmotnostnom spektrometri Orbitrap Elite™. Meranie prebiehalo v pozitívnom móde. MS dáta boli získane v hmotnostnom rozsahu 300 až 1700 m/z a pri rozlíšení 120 000. MS/MS dáta boli získané po CID fragnemtácií v iontovej pasci, pričom boli vyberané 2+, 3+ a 4+ nabité prekursorové ionty. Minimálna požadovaná intenzita pre MS/MS analýzu bola nastavená na 1000. Hodnota kolíznej energie (CE) odpovedala 35 %. Hodnota aktivačnej energie (Q) bola 0,25 a aktivačný čas bol nastavený na 10 ms. Dynamická exklúzia prekursorov bola umožnená po dobu 70 s.



Obr. 11 Prierez EASY-Spray kolonou s popisom jednotlivých častí (prevzaté z Kioyonami, 2012).



Obr. 12 Ionový zdroj EASY-spray s vloženou EASY-Spray kolonou (prevzaté z Kioyonami, 2012).



Graf 1 Schéma gradientovej elúcie pri LC-MS/MS analýze.

3.4 Spracovanie a vyhodnotenie LC-MS/MS dát

Pre vyhodnotenie nameraných dát z hmotnostného spektrometra bol použitý program MaxQuant (1.5.2.8.) s následujúcim nastavením. Dáta boli prevyhľadane prostredníctvom algoritmu Andromeda, ktorý je súčasťou programu MaxQuant, proti ľudskej UniProt databáze. Ako fixná modifikácia bola nastavená karbamidometylácia cysteínu. Ako variabilné modifikácie boli nastavené N-koncová acetylácia a oxidácia metionínu. Trypsín bol nastavený ako proteáza, u ktorej bolo nastavené maximálne vynechanie dvoch po sebe idúcich štiepných miest. Ostatné parametre zostali vo svojom vychádzajúcom nastavení. Na vyhodnotenie identifikovaných a kvantifikovaných proteínov bol použitý program Perseus (1.5.1.6). Pre záverečné spracovanie výsledkov bol použitý program Excel (12.0.4518.1014) a webová aplikácia plot.ly (www.plot.ly).

3.4.1 Analýza dát

Analýza dát umožnila získať zoznam identifikovaných proteínov, tzv. proteomický profil, v každej vzorke, spoločne s génom ich produkcie. V získanom zozname proteínov bola vyhľadaná prítomnosť irisínu alebo aspoň génu, ktorý je zodpovedný za jeho tvorbu.

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Experimentálna časť tejto bakalárskej práce bola zameraná na zavedenie proteomickej metódy, umožňujúcej detekciu prítomnosti irisínu a zároveň jeho citlivú kvantifikáciu pomocou hmotnostnej spektrometrie. V rámci práce boli vybrané tri metódy, ktorými boli vzorky séra spracované a zároveň cielené na detekciu irisínu. Prvou z nich bola analýza pásov z 1D SDS-PAGE elektroforézy v oblasti 10 až 15 kDa, nasledovala metóda precipitácie proteínov krvného séra prostredníctvom ACN pri ktorej došlo k prečisteniu séra a ako posledná bola zvolená kolónova gélová preparatívna elektroforéza (CEGE), ktorá umožnila prácu s niekoľkokrát väčším množstvom proteínov ako tomu bolo v predošlých dvoch prístupoch.

Doposiaľ posledná štúdia zaoberajúca sa detekciou a kvantifikáciou ľudského irisínu tandemovou hmotnostnou spektrometriou preukázala prítomnosť irisínu v krvnom sére na úrovni $3,6 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ u účastníkov bez zvýšenej aeróbnej činnosti a $4,3 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ u účastníkov vykazujúcich zvýšenú aeróbnu aktivitu. Táto štúdia potvrdila predošlú štúdiu, podľa ktorej je hladina ľudského irisínu regulovaná vytrvalostným cvičením (Jedrychowski *et al.*, 2015; Bostorm *et al.*, 2012), táto publikácia bola zároveň bazálnou štúdiou, z ktorej sme vychádzali v predkladanej experimentálnej časti. Štúdia bola zameraná na stanovenie hladiny irisínu v ľudskom sére, optimalizáciou prípravy vzorky a priamou detekciou irisínových peptidov LC-MS/MS analýzou. V iných štúdiách sa podarilo identifikovať unikátny irisínový peptid v rezoch z oblasti 32 kDa a 24 kDa, ktoré v predošlých imunoblotoch vykazovali reaktivitu s anti-FNDC5 protilátkou. K redukcii molekulovej hmotnosti došlo deglykolizáciou a to z 32 kDa na 24 kDa (Lee *et al.*, 2014; Bostorm *et al.*, 2012).

Napriek diskutabilnej existencii irisínu (Albrecht *et al.*, 2015) a vo veľkej miere rozdielných detekčných limitoch pre irisín (Albrecht *et al.*, 2015; Buscemi *et al.*, 2017; Oelmann *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014), bola v štúdií Jedrychowski *et al.* (2015) jednoznačne preukazná detekcia unikátnych peptidov irisínu v ľudskom sére pomocou LC-MS/MS.

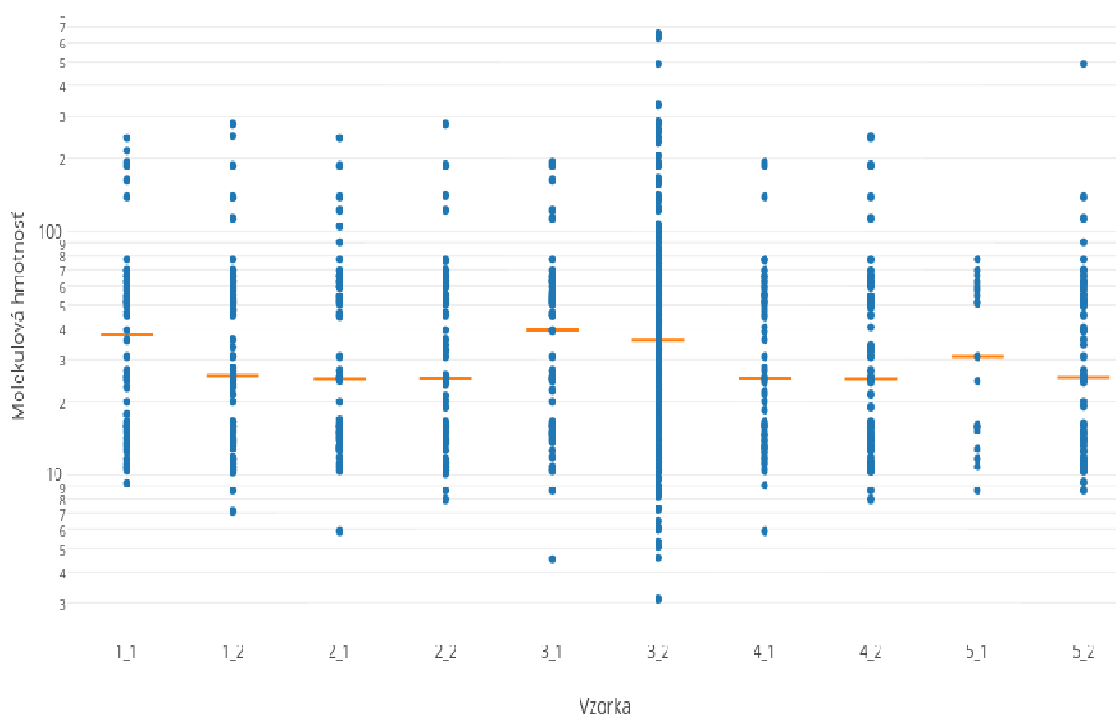
4.1 Spracovanie vzorky pomocou 1D SDS-PAGE elektroforézy

Vzorky krvného séra boli podrobené 1D SDS-PAGE elektroforéze. V štúdií Jedrychowski *et al.* (2015) bola imunoblotom potvrdená prítomnosť irisínu na úrovni 12 kDa, a preto sme v experimentálnej časti vyrezávali pásy v oblasti 10 a 15 kDa u

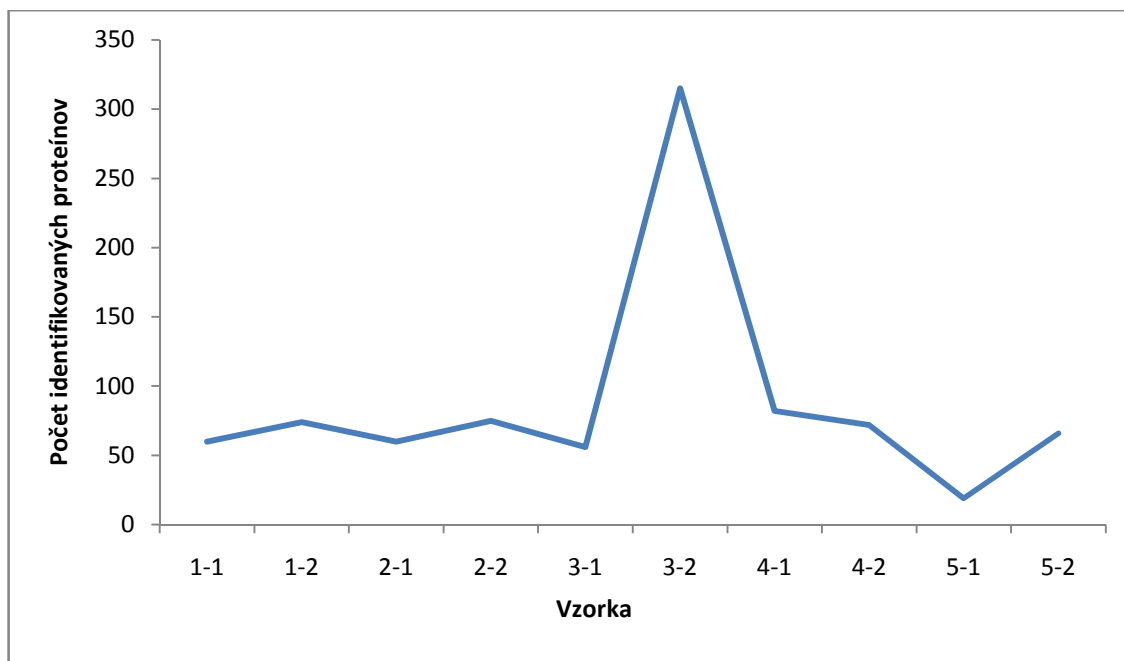
našich vzoriek (5 rôznych ľudských sér). Jednotlivé pásy gélu boli následne podrobené štiepeniu proteínov v géle a získané peptidy boli analyzované na LC-MS/MS. U každej vzorky bol získaný proteomický profil obsahujúci zoznam identifikovaných proteínov a génov. Vo všetkých vzorkách bola overená prítomnosť irisínu, alebo génu, ktorým je irisín produkovaný.

Prítomnosť irisínu nebola potvrdená ani v jednej zo skúmaných vzoriek, tak ako nebola potvrdená ani prítomnosť FNDC5 génu v žiadnej vzorke.

Bol vypočítaný medián z molekulových hmotností proteínov nachádzajúcich sa v jednej vzorke a následne bol vyneseny do grafu (Graf 2). Graf zobrazuje aj molekulové hmoty jednotlivých nameraných proteínov vo vzorkách z jednotlivých pásov z 1D SDS-PAGE gélu. Na základe mediánu je možné sledovať klesajúcu tendenciu molekulových hmotností v reze z oblasti 15 kDa (označenie: vzorka x_1) oproti rezu z oblasti 10 kDa (označenie: vzorka x_2). Ďalej bol zhotovený graf zobrazujúci počet identifikovaných proteínov v jednotlivých vzorkách (Graf 3).



Graf 2 Zobrazenie molekulových hmôt identifikovaných proteínov (modré bodky) jednotlivých vzoriek (sérum 1-5). Oranžovo je vyznačený medián molekulových hmotností, ktorý je počítaný z molekulových hmotností všetkých proteínov v jednej vzorke. Vzorky vyrezané z gélu z oblasti 10 kDa sú označené x_1 a z oblasti 15 kDa ako vzorka x_2.



Graf 3 Počet identifikovaných proteínov v jednotlivých vzorkách z 1D SDS-PAGE elektrofózy.

4.2 Spracovanie vzorky pomocou precipitácie ACN

K vzorkám krvného séra bol pridaný ACN v objeme, tak aby bol docielený rôzny stupeň precipitácie proteínov. Bolo preukázané, že ACN extrakčná metóda vedie k precipitácii vysokoabundantných proteínov s vyššou molekulovou hmotnosťou (Kay *et al.*, 2008). Po precipitácii proteínov v jednotlivých vzorkách bola zmeraná koncentrácia proteínov pomocou BCA metódy a bol vyhodnotený úbytok proteínov pre jednotlivé vzorky (Tab. 3). Z nameraných dát bolo možné sledovať relatívne strmý trend úbytku proteínov až k 44 % zastúpeniu ACN vo vzorke. U 50 % a väčšieho zastúpenia ACN boli proteíny takmer úplne vyprecipitované zo vzorky. Pre následnú LC-MS/MS analýzu boli vybrané vzorky s dostatočným neprecipitovaným obsahom proteínov (Tab. 3). LC-MS/MS umožnila získať proteomický profil piatich vzoriek (sérum 1-5).

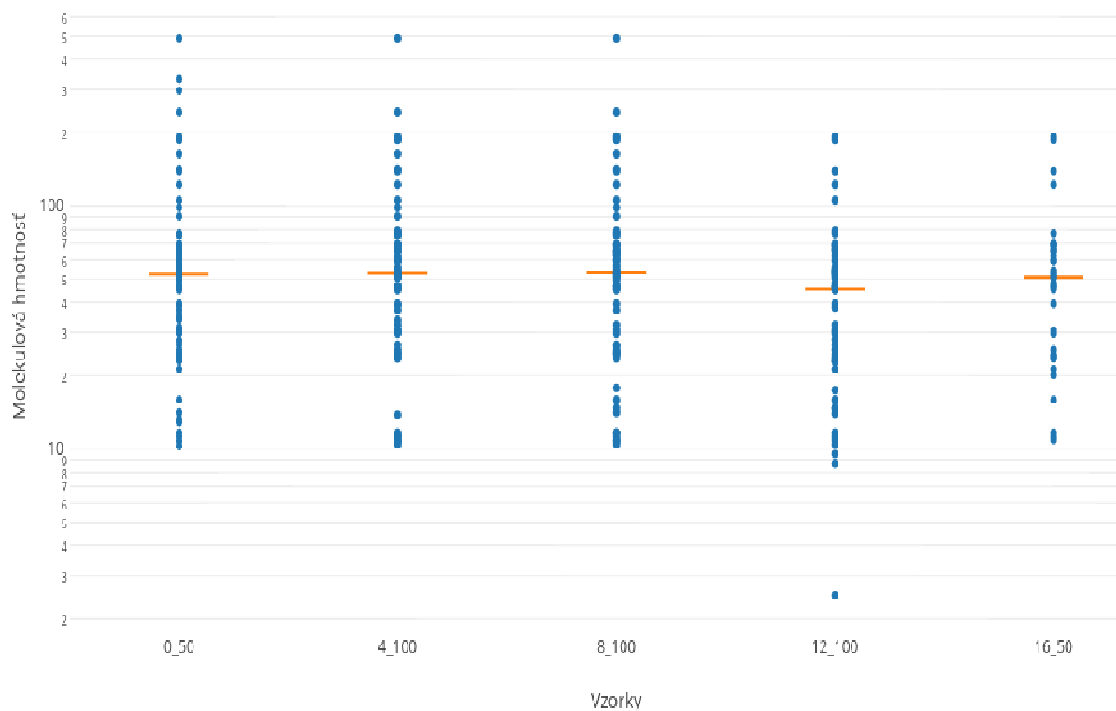
Tab. 3 Zobrazenie úbytku proteínov vo vzorkách v závislosti od zastúpenia ACN.

Vzorka	Celkový objem zmesi (ACN a sérum) [μl]	ACN [%]	Úbytok proteínov [%]
0*	20	0	0,0
4*	24	17	33,9
8*	28	29	57,6
12*	32	38	83,9
16*	36	44	94,7
20	40	50	98,9
25	45	56	99,0
30	50	60	99,4

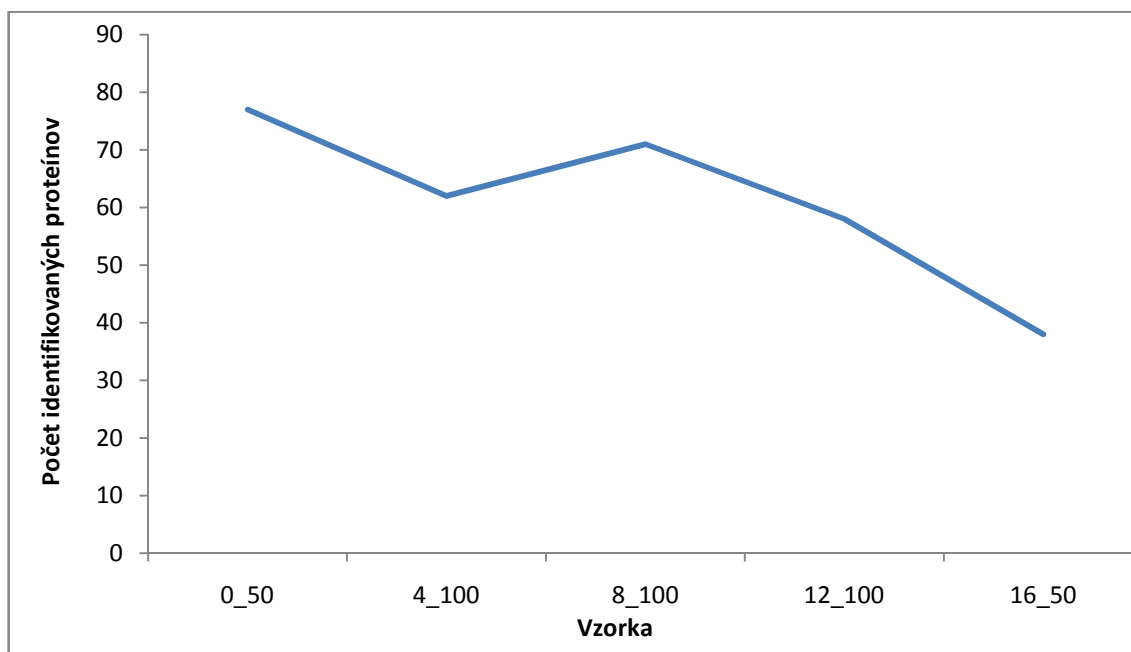
* označené vzorky boli analyzované na LC-MS/MS.

Irisín nebol identifikovaný v žiadnej zo vzoriek analyzovanej na LC-MS/MS, taktiež nedošlo k identifikácii FNDC5 génu.

Z molekulových hmotnosti identifikovaných proteínov bol vo vzorkách vypočítaný medián. K veľmi miernemu poklesu mediánu došlo v posledných dvoch vzorkách. Graf 4 zobrazuje identifikované proteíny vo vzorke vzhľadom k ich molekulovej hmotnosti spolu s vyznačeným mediánom ich molekulovej hmotnosti. Zo získaných dát je zrejmé, že počet identifikovaných proteínov s vyššou molekulovou hmotnosťou je výrazne nižší s vyššou mierou precipitácie ako počet proteínov o nižšej molekulovej hmotnosti. ACN precipitáciou sa nám podarilo vyprecipitovať prítomnosť vysokoabundantných proteínov o vyššej molekulovej hmotnosti, ktoré by teoreticky mohli znemožniť detekciu nízkomolekulárnych proteínov (napr. irisínu). V prípade posledných dvoch vzoriek s úbytkom proteínov 83,9 % a 94,7 % došlo k najvýraznejšej redukcii mediánu molekulovej hmotnosti. Graf 5 zobrazuje počet identifikovaných proteínov v jednotlivých vzorkách, bol pozorovaný pokles v počte identifikovaných proteínov v závislosti s mierou precipitácie proteínov. Vo vzorke 8_100 došlo s najväčšou pravdepodobnosťou ku kontaminácii z prostredia, a preto je počet proteínov vyšší ako vo vzorke 4_100.



Graf 4 Zobrazenie proteínov jednotlivých vzoriek v závislosti od ich molekulovej hmotnosti s vyznačením mediánu (oranžová). Medián bol počítaný z molekulových hmotností všetkých proteínov v jednej vzorke. Popis vzorky: Názov vzorky - % úbytok proteínov vo vzorke (0_50 - 0 %; 4_100 - 33,9 %; 8_100 - 57,6 %; 12_100 - 83,9 %; 16_50 - 94,7 %).



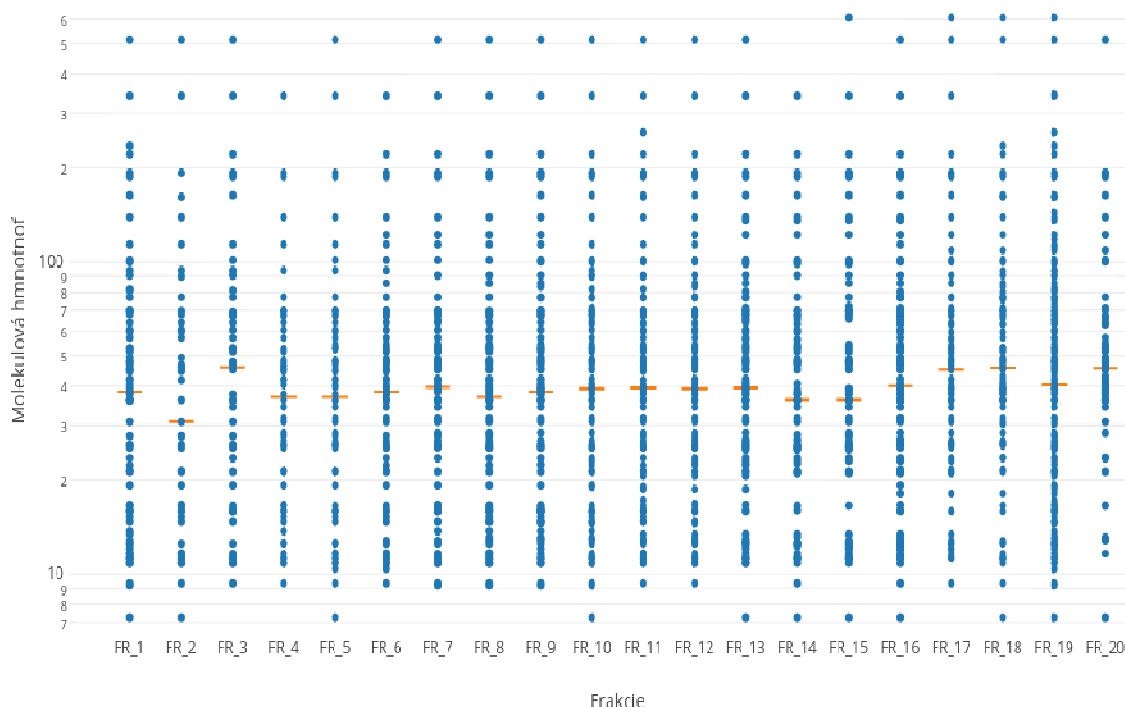
Graf 5 Počet identifikovaných proteínov v jednotlivých vzorkách. Popis vzorky: Názov vzorky - % úbytok proteínov vo vzorke (0_50 - 0 %; 4_100 - 33,9 %; 8_100 - 57,6 %; 12_100 - 83,9 %; 16_50 - 94,7 %).

4.3 Spracovanie vzorky pomocou CEGE

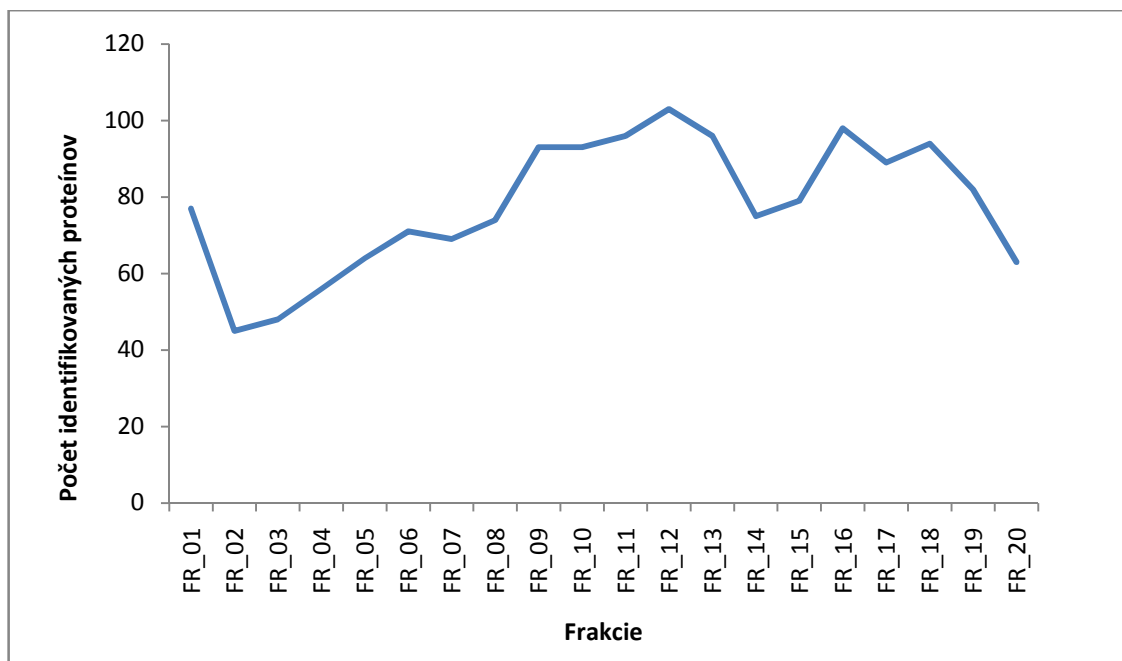
Na gél u CEGE elektroforézy bolo nanesených 4,165 mg proteínov, čo je niekoľkonásobok nanášky, ktorá bola použitá pri 1D SDS-PAGE elektroforéze (300 µg) alebo analyzovaná po precipitácii ACN (20 µg a 2,5 µg). Predpokladali sme, že takto rapidným zvýšením prídavku proteínov na kolónu dôjde k vyššej pravdepodobnosti detekcie nízko abundantných proteínov ako je irisín. Gél bol po prebehnutí elektroforézy narezaný na frakcie. Proteíny z jednotlivých gélových frakcií boli štiepené trypsínom na peptidy a tie boli analyzované na LC-MS/MS. Pre každú frakciu bol získaný proteomický profil so zoznamom identifikovaných proteínov a génov.

V získaných proteomických profiloch z jednotlivých frakcií nebol irisín nájdený ani u tejto metodiky.

Zo získaných údajov, bol opäť vypočítaný medián z molekulových hmotností identifikovaných proteínov vo frakciách a je znázornený v grafe 6. Medián mal klesajúcu tendenciu od frakcie 20 k frakcii 2, s výnimkou niekoľkých vzoriek, kde mohlo dôjsť ku kontaminácii z prostredia pri príprave vzoriek. Opäť bol zhotovený graf zobrazujúci počet identifikovaných proteínov v jednotlivých frakciách (Graf 7).



Graf 6 Zobrazenie frakcií jednotlivých vzoriek v závislosti od ich molekulovej hmotnosti s vyznačením mediánu (oranžová). Medián bol počítaný z molekulových hmotností všetkých proteínov v jednej vzorke.



Graf 7 Počet identifikovaných proteínov v jednotlivých frakciách.

4.4 Zhrnutie výsledkov

V prístupe s využitím 1D SDS-PAGE elektroforézy sa nám nepodarilo detegovať prítomnosť irisínu v pásoch v oblasti 10 a 15 kDa. Jedrychowski *et al.* (2015) imunoblotom potvrdil prítomnosť irisínu v oblasti 12 kDa a taktiež stanovili jeho koncentráciu cielenou LC-MS/MS analýzou. V tejto štúdií boli skúmane vzorky depletované od vysoko abundančného albumínu a podrobené komplexnej deglykolizácií. V našom prípade neboli vzorky deglykolizované a nedošlo ani k odstráneniu abundančných proteínov, a to s najväčšou pravdepodobnosťou znemožnilo stanovenie irisínu. Podobne ako v prípade skoršej štúdie (Albrecht *et al.*, 2015), kedy bola uskutočnená nekompletná deglykolizácia len pomocou enzýmu PNGázy F, nedošlo k detekcii irisínu western blotom v oblasti 12 kDa. Pre ďalšiu optimalizáciu tohto prístupu je zrejme, že deplécia vysoko abundančných proteínov a komplexná deglykolizácia proteínov je nevyhnutelným krokom k detekcii irisínu ako imunoblotom, tak zrejme aj hmotnostnou spektrometriou.

Precipitácia proteínov ACN sa preukázala ako nevhodujúca k umožneniu stanovenia prítomnosti irisínu v ľudskom sére. Hoci Kay *et al.* (2008) vo svojej štúdií preukázali úbytok proteínov o vysokej molekulovej hmotnosti. Tento prístup nepriniesol jednoznačné špecifické obohatenie vzorky o nízkoabundantné proteíny po

precipitácií proteínov zo séra pomocou ACN. Pravdepodobne bol irisín spolu s ostatnými proteínymi precipitovaný a nebolo ho možné detegovať na danej úrovni.

Využitím CEGE elektroforézy sa niekoľko násobne zvýšilo množstvo nanesených proteínov na kolónu, od čoho sme očakávali zvýšenie pravdepodobnosti detekcie irisínu. Zvýšenie nanesených proteínov sa preukázalo ako neefektívne a k identifikácií irisínu nedošlo. Aj u tohto prístupu by deplécia abundantných proteínov a komplexná deglykolizácia vzoriek (Jedrychowski *et al.*, 2015) by pravdepodobne mohla umožniť irisín detegovať.

5. ZÁVER

V teoretickej časti bakalárskej práce bol vypracovaný literárny úvod o irisíne a jeho všeobecných vlastnostiach, funkcii v metabolizme človeka, jeho význame a možnom terapeutickom využití irisínu v medicíne. V poslednej časti teoretického úvodu boli zhrnuté metódy, ktoré boli doposiaľ využité k detekcii irisínu.

V experimentálnej časti bakalárskej práce boli skúmane prístupy k detekcii irisínu v ľudskom sére metódou LC-MS/MS. Práca spočívala v nájdení vhodného prístupu, ktorý by bol dostatočne citlivý a cielený na identifikáciu nízkoabundantného irisínu.

Navrhnutým prístupom bola 1D SDS-PAGE elektroforéza, pri ktorej boli analyzované pásy z oblasti 10 kDa a 15 kDa, ktorá sa nepreukázala ako dostatočná k stanoveniu prítomnosti irisínu. Prístupom s využitím ACN precipitácie krvného séra sa docielilo prečistenia vzorky od vysoko abundantných proteínov o väčšej molekulovej hmotnosti, ktoré by mohli znemožniť detekciu irisínu, avšak ani tento prístup nebol úspešný. Posledným prístupom k stanoveniu irisínu bola kolónova gélová preparatívna elektroforéza, pri ktorej došlo k naneseniu väčšieho množstva proteínov ako v prípade predošlých dvoch prístupov. Ani posledný zo skúmaných prístupov nepriniesol pozitívne výsledky v podobe identifikácie irisínu.

Na základe získaných výsledkov boli v diskusii navrhnuté ďalšie postupy pre optimalizáciu vybraných prístupov, ktoré by mohli prispieť k preukázaniu irisínu v ľudskom sére.

6. LITERATÚRA

- Albrecht E., Norheim F., Thiede B., Holen T., Ohashi T., Schering L., Lee S., Brenmoehl J., Thomas S., Drevon C.A., Erickson H.P., Maak S. (2015): Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Scientific Reports* **5**:8889, <https://www.nature.com/articles/srep08889>.
- Aldhahi W., Hamdy O. (2003): Adipokines inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep* **3**, 293–298.
- Almind K., Manieri M., Sivitz W.I., Cinti S., Kahn C.R. (2007): Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2366–2371.
- Barbera M.J., Schluter A., Pedraza N., Iglesias R., Villarroya F., Giralt M. (2001): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* **276**, 1486–1493.
- Belgardt, B. F. & Bruning, J. C. (2010a): CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann NY Acad Sci* **1212**, 97–113.
- Belgardt B.F., Mauer J., Wunderlich F.T., Ernst M.B., Pal M., Spohn G., Brönneke H.S., Brodesser S., Hampel B., Schauss A.C., Brüning J.C. (2010b): Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 6028-6033.
- Boström P., Wu J., Jedrychowski M.P., Korde A., Ye L., Lo J.C., Rasbach K.A., Boström E.A., Choi J.H., Long J.Z., Kajimura S., Zingaretti M.C., Vind B.F., Tu H., Cinti S., Højlund K., Gygi S.P., Spiegelman B.M. (2012): A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481**, 463-468.
- Broskevičová L. (2016): *Typizace systémové amyloidózy pomocí hmotnostní spektrometrie*. Diplomová práce, UPOL Olomouc, Česká republika.
- Buscemi S., Corleo D, Vasto S., Buscemi C., Massenti M.F., Nuzzo D., Lucisano G., Barile A.M., Rosafio G., Maniaci V., Giordano C. (2017): Factors associated with circulating concentrations of irisin in the general population cohort of the ABCD study. *International Journal of Obesity* **42**, 398–404.
- Cai, D. (2013): Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab* **24**, 40–47.
- Cannon B., Nedergaard J. (2004): Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277–359.
- Cederberg A., Grønning L.M., Ahrén B., Taskén K., Carlsson P., Enerbäck S. (2001): FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* **106**, 563–573.
- Cinti S. (2002): Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest* **25**, 823–835.
- Cinti S. (2011): Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med* **43**, 104-15.
- Colaïanni G., Brunetti G., Colucci S.C., Grano M. (2018): Myokine—Irisin—and Its Effects Linking Bone and Muscle Function. *Bone and Mineral Metabolism* **16**, 16-21.
- Colaïanni G., Cuscito C., Mongelli T., Oranger A., Mori G., Brunetti G. (2014): Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *Int Journal Endocrinology* **2014**:902186, <https://www.hindawi.com/journals/ije/2014/902186>.
- Colaïanni G., Cuscito C., Mongelli T., Pignataro P., Buccoliero C., Liu P. (2015): The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 12157–12162.
- Dun S.L., Lyu R.M., Chen Y.H., Chang J.K., Luo J.J., Dun N.J. (2013): Irisin-immunoreactivity in neural and non-neural cells of the rodent. *Neuroscience* **240**, 155-62.
- Elsen M., Raschke S., Eckel J. (2014): Browning of white fat: does irisin play a role in humans? *J. Endocrinol* **222**, 25–38.

- Erickson H. P. (2013): Irisin and FNDC5 in retrospect: An exercise hormone or a transmembrane receptor? *Adipocyte***2**, 289–293.
- Farmer S.R. (2006): Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab***4**, 63–73.
- Feldmann H.M., Golozoubova V., Cannon B., Nedergaard J. (2009): UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab***9**, 203–209.
- Forouzanfar M., Rabiee F., Ghaedi K., Beheshti S., Tanhaei S., Shoaraye Nejati A., Jodeiri Farshbaf M., Baharvand H., Nasr-Esfahani M.H. (2015): Fndc5 overexpression facilitated neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Biol Int***39**, 629-637.
- Gesta S., Tseng Y.H., Kahn C.R. (2007): Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell***131**, 242–256.
- Gizaw M., Anandakumar P., Debela T. (2017): A Review on the Role of Irisin in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Pharmacopuncture***20**, 235-242.
- Greenberg M.E., Spiegelman B.M. (2013): Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway. *Cell Metab***18**, 649-59.
- Handschin C., Spiegelman B. M. (2008): The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature***454**, 463–469.
- Hashemi M.S, Ghaedi K., Salamian A., Karbalaie K., Emadi-Baygi M., Tanhaei S., Nasr-Esfahani M.H., Baharvand H. (2013): Fndc5 knockdown significantly decreased neural differentiation rate of mouse embryonic stem cells. *Neuroscience***231**, 296-304.
- Huang J., Romero-Suarez S., Lara N., Mo C., Kaja S., Brotto L. (2017): Crosstalk between MLO-Y4 osteocytes and C2C12 muscle cells is mediated by the Wnt/ β -catenin pathway. *JBMR Plus***1**, 86–100.
- Huh J.Y., Panagiotou G., Mougios V. (2012): FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism***61**, 1725–1738.
- Choi Y.K., Kim M.K., Bae K.H., Seo H.A., Jeong J.Y., Lee W.K., Kim J.G., Lee I.K., Park K.G. (2013): Serum irisin levels in new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract***100**, 96-101.
- Ingolia N.T., Lareau L.F., Wiessman J.S. (2011): Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell***147**, 789-802.
- Ivanov I.P., Firth A.E., Michel A.M., Atkins J.F., Baranov P.V. (2011): Identification of evolutionarily conserved non-AUG-initiated N-terminal extensions in human coding sequences. *Nucleic Acids Res***39**, 4220-4234.
- Jedrychowski M.M., Wrann Ch.D., Paulo J.A., Gerber K.K., Szpyt J., Robinson M.M., Nair K.S., Gygi S.P., Spiegelman B.M. (2015): Detection and quantification of circulating human irisin by tandem mass spectrometry. *Cell metaboloism***22**, 1-7.
- Kay R., Barton Ch., Ratcliffe L., Matharoo-Bali B., Brown P., Roberts J., Reale P., Creaser C. (2008): Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry***22**, 3255-3260.
- Kiyonami, R., Ravnsborg, C., Madsen O., Zabrouskov V. (2012): *Easy-to-use, Plug and spray ion source for robust and reproducible ultra high pressure nanoflow LC/MS*. Technical note 63546, Thermo Scientific , USA, 4 strany.
- Langin D. (2010): Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *BiochimBiophys Acta***1801**, 372-376.
- Lecker S.H., Zavin A., Cao P. (2012): Expression of the Irisin precursor FNDC5 in skeletal muscle correlates with aerobic exercise performance in patients with heart failure. *Circ Heart Fail***5**, 812–818.
- Lee P., Linderman J.D., Smith S., Brychta R.J., Wang J., Idelson C., Perron R.M., Werner C.D., Phan G.Q., Kammula U.S., Kebebew E., Pacak K., Chen K.Y., Celi F.S. (2014): Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metabolism***19**, 302-309.

- Lefterova M.I., Lazar M.A. (2009): New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab***20**, 107-14.
- Lepper C., Fan C.M. (2010): Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis***48**, 424-36.
- Li D. J., Huang F., Lu W. J., Jiang G. J., Deng Y. P., Shen, F. M. (2015): Metformin promotes irisin release from murine skeletal muscle independently of AMP-activated protein kinase activation. *Acta Physiol (Oxf)***213**, 711–721.
- Li L., Rampersad S., Wang X., Cheng X., Qu S. (2016): Serum irisin concentrations were increased after transient continuous subcutaneous insulin infusion in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract***113**, 44–47.
- Liu J.J., Liu S., Wong M.D., Tan C.S., Tavintharan S., Sum C.F. (2014): Relationship between circulating irisin, renal function and body composition in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications***28**, 208–123.
- Liu J.J., Wong M.D., Toy W.C. (2013): Lower circulating irisin is associated with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications***27**, 365–369.
- Liu S., Du F., Li X., Wang M., Duan R., Zhang J. (2017): Effects and underlying mechanisms of irisin on the proliferation and apoptosis of pancreatic β cells. *PLoS One***12(4)**: e0175498, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175498>.
- Liu T.Y., Shi C.X., Gao R., Sun H.J., Xiong X.Q., Ding L. (2015): Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the PI3K/Akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes. *Clin Sci(Lond)***129**, 839–50.
- Lowell B.B., S-Susulic V., Hamann A., Lawitts JA., Himms-Hagen J., Boyer B.B. (1993): Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature***366**, 740–742.
- McCarthy M. I. (2010): Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med***363**, 2339–2350.
- Moon H.S., Dincer F., Mantzoros C.S. (2013): Pharmacological concentrations of irisin increase cell proliferation without influencing markers of neurite outgrowth and synaptogenesis in mouse H19-7 hippocampal cell lines. *Metabolism***62**, 1131-1136.
- Moreno M., Moreno-Navarrete J.M., Serrano M., Ortega F., Delgado E., Sanchez-Ragnarsson C., Valdés S., Botas P., Ricart W., Fernández-Real J.M. (2015): Circulating irisin levels are positively associated with metabolic risk factors in sedentary subjects. *PLoS One***10(4)**: e0124100, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0124100>.
- Moreno-Navarrete J.M., Ortega F., Serrano M., Guerra E., Pardo G., Tinahones F., Ricart W., Fernández-Real J.M. (2013): Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab***98**, E769-778.
- Oelmann S., Nauck M., Völzke H., Bahls M., Friedrich N. (2016): Circulating Irisin Concentrations Are Associated with a Favourable Lipid Profile in the General Population. *PLoS ONE***11(4)**:e0154319, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0154319>.
- Park K.H., Zaichenko L., Brinkoetter M., Ankar B., Shain-Efe A., Joung K.E. (2013): Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab***98**, 4899–4907.
- Park K.H., Zaichenko L., Peter P., Davis C.R., Crowell J.A., Mantzoros C.S. (2014): Diet quality is associated with circulating C-reactive protein but not irisin levels in humans. *Metabolism***63**, 233-241.
- Park M.J., Kim D., Choi J.H., Heo Y.R., Park S.H. (2015): New role of irisin in hepatocytes: The protective effect of hepatic steatosis in vitro. *Cell Signal***27**, 1831–1839.
- Puigserver P., Wu Z., Park C.W., Graves R., Wright M., Spiegelman B.M. (1998): A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell***92**, 829–839.
- Roca-Rivada A., Castela C., Senin L.L., Landrove M.O., Baltar J., Belén Crujeiras A., Seoane L.M., Casanueva F.F., Pardo M. (2013): FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS One***8(4)**: e60563, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060563>.

- Ronti T., Lupattelli G., Mannarino E. (2006): The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)***64**, 355–65.
- Rosen E.D., Spiegelman B.M. (2006): Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature***444**, 847–53.
- Sanchis-Gomar F., Alis R., Lippi G. (2015): Circulating irisin detection: Does it really work? *Trends Endocrinol Metab.***26**, 335-336.
- Sanchis-Gomar F., Alis R., Pareja-Galeano H., Romagnoli M., Perez-Quilis C. (2014): Inconsistency in Circulating Irisin Levels: What is Really Happening? *Horm. Metab. Res***46**, 591–596.
- Seale P., Bjork B., Yang W., Kajimura S., Chin S., Kuang S., Scimè A., Devarakonda S., Conroe H.M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Rudnicki M.A., Beier D.R., Spiegelman B.M. (2008): PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature***454**, 961-967.
- Schumacher M. A., Chinnam N., Ohashi T., Shah R. S., Erickson H. P. (2013): The Structure of Irisin Reveals a Novel Intersubunit β -Sheet Fibronectin Type III (FNIII) Dimer: IMPLICATIONS FOR RECEPTOR ACTIVATION. *The Journal of Biological Chemistry***288**, 33738–33744.
- Song H., Wu F., Zhang Y., Zhang Y., Wang F., Jiang M. (2014): Irisin promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation through the ERK signaling pathway and partly suppresses high glucose-induced apoptosis. *PLoS One***9(10)**: e110273, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110273>.
- Speakman J.R. (2010): FTO effect on energy demand versus food intake. *Nature***464**, 7289.
- Stanford K. I. (2015): A novel role for subcutaneous adipose tissue in exercise-induced improvements in glucose homeostasis. *Diabetes***64**, 2002–2014.
- Tang H., Yu R., Liu S., Huwatibieke B., Li Z. (2016): Irisin inhibits hepatic cholesterol synthesis via AMPK-SREBP2 signaling. *E Bio Medicine***2016**, 139-48.
- Thaler J.P., Yi C.X., Schur E.A., Guyenet S.J., Hwang B.H., Dietrich M.O., Zhao X., Sarruf D.A., Izgur V., Maravilla K.R., Nguyen H.T., Fischer J.D., Matsen M.E., Wisse B.E., Morton G.J., Horvath T.L., Baskin D.G., Tschöp M.H., Schwartz M.W. (2012): Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest***122**, 153-162.
- The human protein atlas: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000160097-FNDC5/tissue> (5.4.2018).
- Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26634> (6.5 2018).
- Timmons J.A., Baar K., Davidsen P.K., Atherton P.J. (2012): Is irisin a human exercise gene? *Nature***488**, E9–E10.
- Tran T. T., Yamamoto Y., Gesta S., Kahn C. R. (2008): Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab***7**, 410–420.
- Travers M.E., McCarthy M.I. (2011): Type 2 diabetes and obesity: genomics and the clinic. *Hum Genet***130**, 41-58.
- Varela-Rodríguez B.M., Pena-Bello L., Juiz-Valiña P., Vidal-Bretal B., Cordido F., Sangiao-Alvarellosa S. (2016): *FNDC5* expression and circulating irisin levels are modified by diet and hormonal conditions in hypothalamus, adipose tissue and muscle. *Scientific Reports***6**: 29898, <https://www.nature.com/articles/srep29898>.
- Vaughan R.A., Gannon N.P., Barberena M.A., Garcia-Smith R., Bisoffi M., Mermier C.M., Wang H.H., Zhang X.W., Chen W.K., Huang Q.X., Chen Q.Q. (2015): Relationship between serum irisin levels and urinary albumin excretion in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications***29**, 384-389.
- Williams, L. M. (2012): Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc***71**, 521–533.
- Xiong X.Q., Chen D., Sun H.J., Ding L., Wang J.J., Chen Q., Li Y.H., Zhou Y.B., Han Y., Zhang F., Gao X.Y., Kang Y.M., Zhu G.Q. (2015): *FNDC5* overexpression and irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity. *BiochimBiophysActa***1852**, 1867-1875.
- Yang X., Enerback S., Smith U. (2003): Reduced expression of *FOXC2* and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res***11**, 1182–1191.

- Yang Z., Chen X., Chen Y., Zhao, Q. (2015): Decreased irisin secretion contributes to muscle insulin resistance in high-fat diet mice. *Int J Clin Exp Pathol***8**, 6490–6497.
- Zhang M., Chen P., Chen S., Sun Q., Zeng Q.C., Chen J.Y., Liu Y.X., Cao X.H., Ren M., Wang J.K. (2014): The association of new inflammatory markers with type 2 diabetes mellitus and macrovascular complications: a preliminary study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences***18**, 1567-1572.
- Zhang Y., Li R., Meng Y., Li S., Donelan W., Zhao Y., Qi L., Zhang M., Wang X., Cui T., Yang L.J., Tang D. (2014): Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes***63**, 514-525.

7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

1D SDS-PAGE	jednorozmerná elektroforéza v polyakrylamidovom géle v prítomnosti dodecylsulfátu sodného
AA	kyselina octová
ACN	acetonitril
AMBIC	hydrogenuhličitan amónny
APS	persultát amónny
BCA	bicinchonová kyselina
BFB	bromfenolová modrá
ButOH	butanol
CE	kolízna energia
CEGE	kolónová preparatívna gélová elektroforéza
CID	kolíziou vyvolaná disociácia
DTT	dithiotreitol
EGF	epidermálny rastový faktor
EIA	enzýmová imunoanalýza
ELISA	enzýmová imunoanalýza viazaná na sorbent
ERK	extracelulárna signálom regulovaná kináza
EtMf	etylenmorfolin
FA	kyselina mravenčia
FNDC5	proteín 5 obsahujúci fibronectínovu doménu typu III
H ₂ O	milli-Q voda
HLB	hydrofilno-lipofílny sorbent

IAA	jódoacetamid
LC-MS/MS	kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou
Lys-C	lyzín C
MeOH	metanol
MAPK	mitogénom-aktivované proteín kinázy
MS	hmotnostná spektrometria
PGC α	transkripčný koaktivátor α
PNGáza F	proteínová N-glykosidáza F
PPAR- γ	peroxizómový proliferujúci aktivačný receptor γ
Q	aktivačná energia
RIA	rádioimunoanalýza
SDS	dodecylsulfát sodný
SH skupiny	sulfanylové skupiny
TCEP	tris(2-karboxyetyl)fosfín
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín
TFA	kyselina trifluoroctová
TG	tris-glycín
TGF- α	transformačný rastový faktor- α
TGS	tris-glycín-SDS pufer
Tris-HCl	tris-hydrochlorid
UCP1	odpojovací proteín 1