

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Zuzana Macháčová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Identifikace proteomických
molekulárních cílů molekul
s protinádorovým účinkem**

Bakalářská práce

Zuzana Machačová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Mgr. Jana Václavková

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jany Václavkové s použitím zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis:

SOUHRN

Bakalářská práce se věnuje identifikaci proteomických molekulárních cílů molekul s protinádorovým účinkem.

Literární přehled je zaměřen na vědní obor proteomiku. V úvodní kapitole jsou popsány odvětví, přístupy a metody proteomického studia. Další kapitola je věnována způsobům identifikace molekulárních cílů molekul s protinádorovým účinkem. Samostatnou kapitolou práce je také problematika proteinu Ca^{2+} ATPázy sarko/endoplazmatického retikula (SERCA), což je molekulární cíl řady potenciálních protinádorových léčiv. Jedná se o membránovou pumpu sarko/endoplazmatického retikula svalových buněk. Protein transportuje vápenaté ionty z cytosolu do endoplazmatického retikula za současné spotřeby energie z ATP. V průběhu let se ukázalo, že SERCA proteiny hrají významnou roli v homeostáze Ca^{2+} ve všech savčích buňkách a že jejich inhibice může vést k buněčné smrti. Exprese SERCA proteinu je v některých transformovaných buněčných liniích snížena, což znamená, že některé rakovinové buňky jsou k apoptóze zprostředkované Ca^{2+} náchylnější. Proto je inhibice aktivity SERCA proteinu využívána v protinádorové terapii. Bylo zjištěno, že jedním z inhibitorů aktivity proteinu je trilobolid, jehož problematice se věnuje poslední kapitola.

Experimentální část je zaměřena na metodu afinitní purifikace pro identifikaci molekulárních cílů protinádorových léčiv v buňce. Molekula, jejíž molekulární cíl v buňce chceme identifikovat, je imobilizována na magnetické, případně agarosové, kuličky. Pro navázání molekuly na kuličky byla využita tzv. "click" chemie, tzn. reakce alkynu (na testované molekule) a azidu (na kuličkách) za vzniku velmi stabilního triazolu. Navázaná testovaná molekula byla inkubována s celobuněčným proteinovým lyzátem nádorové linie. Proteiny, které jsou molekulárními cíli, se váží na imobilizovanou molekulu, zbylé proteiny jsou v dalších krocích odmyty a molekulární cíle jsou identifikovány proteomickými metodami.

SUMMARY

This bachelor's thesis deals with the identification of proteomic molecular targets of molecules with anticancer effect.

The literature review focused on one of the science fields called proteomics. There are described approaches and methods of proteomic study in this chapter. The next chapter is devoted to methods of identifying molecular targets of molecules with anticancer effect. A separate chapter of the work describes the problematics of sarco/endoplasmic Ca^{2+} ATPase (SERCA), which is the molecular target of molecules with anticancer effect. It is a membrane pump of sarcoendoplasmic reticulum of muscle cells. The protein transports calcium ions from the cytosol into the endoplasmic reticulum while consuming energy from the ATP in the same time. Over the years have been shown that SERCA proteins play a significant role in Ca^{2+} homeostasis in all mammalian cells and their inhibition can cause the death of cells. Reduced SERCA expression in some transformed cell lines means that some cancer cells are more prone to Ca^{2+} mediated apoptosis. Therefore, inhibition of SERCA protein activity is used in anticancer therapy. It has been found that one of the inhibitors of the protein activity is trilobolide, which problematics is discussed in the last chapter.

The experimental part is focused on the method of affinity purification for identification of the molecular targets of antitumor drugs in the cell. A molecule which molecular targets we want to identify in the cell is immobilized on magnetic or agarose beads. The so-called "click chemistry" has been used for the binding of the molecules to the beads. It is the reaction of alkyne (on the tested molecule) and azide (on the beads) to form a very stable triazole. The bounded tested molecule was incubated with the whole cell tumor protein lysate. Proteins, which are molecular targets, bind to an immobilized molecule. Remaining proteins are washed away and molecular targets are identified by proteomic methods.

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Janě Václavkové za odborné vedení, připomínky a čas, který mi věnovala, a za pomoc při zpracování experimentální části. Poděkování patří také Ústavu molekulární a translační medicíny Univerzity Palackého za možnost využití jejich laboratoří. Práce byla podporována Národním programem udržitelnosti (LO1304) a grantem EU-OPENSREEN (LM015063).

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Proteomika	3
3.1.1	Přístupy k proteomickému studiu.....	3
3.1.2	Metody proteomického studia.....	6
3.1.2.1	Chromatografické metody.....	6
3.1.2.2	Elektromigrační metody.....	9
3.1.2.3	Western blotting.....	12
3.1.2.4	Hmotnostní spektrometrie.....	13
3.1.2.5	Proteomické metody kvantifikace v hmotnostní spektrometrii využívající značení proteinů.....	18
3.1.2.6	Metody absolutní kvantifikace v hmotnostní spektrometrii.....	23
3.1.2.7	Label-free kvantifikace v hmotnostní spektrometrii	24
3.2	Identifikace molekulárních cílů.....	25
3.2.1	DARTS.....	26
3.2.2	Metoda afinitní purifikace.....	27
3.2.2.1	Click chemie, mědí katalyzovaná azid-alkynová cykloadiční reakce (CuAAC) 29	
3.3	Trilobolid	32
3.4	Protein SERCA	37
4	Materiál a metody.....	45
4.1	Biologický materiál.....	45
4.2	Použité soupravy a chemikálie.....	45
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	49
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	50
4.4.1	Click reakce.....	50
4.4.2	Měření fluorescence.....	50
4.4.3	Kultivace buněk, SILAC značení.....	50

4.4.4	Příprava buněčných lyzátů, měření koncentrace proteinů.....	51
4.4.5	Metoda afinitní purifikace.....	54
4.4.6	SDS-PAGE.....	55
4.4.7	Stříbření gelu.....	56
4.4.8	Western blotting.....	56
5	Výsledky.....	58
5.1	Fluorescence agarosových a magnetických kuliček.....	58
5.2	Detekce proteinů stříbřením.....	59
5.3	Detekce proteinů po western blottingu.....	63
6	Diskuze.....	66
7	Závěr.....	67
8	Literatura.....	68

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

1DE	One-dimensional gel electrophoresis; jednorozměrná gelová elektroforéza
2DE	Two-dimensional gel electrophoresis; dvojrozměrná gelová elektroforéza
AMK	Aminokyselina
APEX	Absolute protein expression; absolutní proteinová exprese
AQUA	Absolute quantification of proteins; absolutní kvantifikace
ATP	Adenozin trifosfát
BN-PAGE	Blue native polyacrylamide gel electrophoresis; nativní gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
CI	Chemical ionization; chemická ionizace
CuAAC	Cu ^I -catalyzed azide-alkyne click chemistry reaction; mědí katalyzovaná click reakce mezi azidem a alkynem
DARTS	Drug Affinity Responsive Target Stability
EI	Electron ionization; ionizace elektrony
ESI	Electrospray ionization; ionizace elektrosprejem
FT-ICR	Fourierova transformace iontové cyklotronové rezonance
GC	Gas chromatography; plynná chromatografie
GFC	Gel-filtration chromatography; gelová filtrační chromatografie
GPC	Gel-permeation chromatography; gelová permeační chromatografie
HPLC	High performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICAT	Isotope coded affinity tag; izotopově kódovaná afinitní značka
IEC	Ion exchange chromatography; Iontoměničová (ionexová) chromatografie
IEF	Izoelektrická fokusace
INF- γ	Interferon γ
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantification; izobarická značka pro

	relativní a absolutní kvantifikaci
LC	Liquid chromatography; kapalinová chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LEC	Liquid-exclusion chromatography; kapalinová vylučovací chromatografie
LSC	Liquid-solid chromatography; kapalinová chromatografie s pevnou fází
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization; ionizace prostřednictvím matricí asistované laserové desorpce
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MS	Mass spectrometry; hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
PAI	Protein abundance index; index hojnosti proteinů
pI	Izoelektrický bod
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s přídavkem dodecylsíranu sodného
SEC	Size exclusion chromatography; velikostně vylučovací chromatografie
SELDI	Povrchově zesílená laserová desorpce; surface-enhanced laser desorption/ionization
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase; Ca ²⁺ ATPáza sarko/endoplazmatického retikula
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture; stabilní izotopové značení aminokyselinami
SL	Sekviterpenový lakton
SPAAC	Strain-promoted azid-alkyne click reakce

Tb	Trilobolid
Tg	Thapsigargin
TMT	Tandem mass tag; tandemová hmotnostní značka
TOF	Time of flight; analyzátor doby letu

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Srovnání bottom-up a top-down metody.....	16
Obr. 2: Blokové schéma HPLC aparatury.....	19
Obr. 3: Schéma základních ionizačních technik.....	25
Obr. 4: Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru.....	26
Obr. 5: Schéma kvadrupólové iontové pasti.....	27
Obr. 6: Schéma TOF (time of flight) analyzátoru.	27
Obr. 7: Schéma analyzátoru FT-ICR.	28
Obr. 8: Schéma Orbitrapu.	28
Obr. 9: Rozdíly v metabolickém a chemickém značení.	29
Obr. 10: Schéma SILAC experimentu.....	31
Obr. 11: Schéma experimentu s využitím iCAT značení.	32
Obr. 12: Struktura iTRAQ značky.	33
Obr. 13: Schéma skládání iTRAQ značek a jejich fragmentace pomocí MS/MS.	33
Obr. 14: Struktura tandemové hmotnostní značky.	34
Obr. 15: Pracovní postup pro relativní kvantifikaci pomocí značení 10plex TMT.....	34
Obr. 16: Label-free kvantifikace.....	36
Obr. 17: Schéma postupu metody DARTS.....	38
Obr. 18: Obecný princip afinitní purifikace.....	39
Obr. 19: Schéma afinitní purifikace probíhající na koloně.....	40
Obr. 20: Princip strain-promoted azid-alkynové click reakce SPAAC.....	41
Obr. 21: Princip ligace tetrazinu s alkenem.....	42
Obr. 22: Mědí katalyzovaná azid-alkynová cykloadiční reakce.....	42
Obr. 23: Schéma obecné CuAAC reakce a strukturální vzorce (1) THPTA jakožto urychlujícího ligandu a (2) aminoguanidinu jakožto aditiva.....	43

Obr. 24: Chemická struktura (1) trilobolidu (3) thapsigarginu.....	44
Obr. 25: Timoj trojlaločnatý (<i>Laser trilobum</i>).....	45
Obr. 26: Pohled na SERCA protein se zvýrazněným místem pro vazbu thapsigarginu.....	46
Obr. 27: Syntéza konjugátů Tb-porfyriu prostřednictvím reakce CuAAC.....	47
Obr. 28: Konjugát Tb-Bodipy (převzato z Jurášek <i>et al.</i> , 2014).....	48
Obr. 29: Architektura SERCA proteinového Ca ²⁺ transportéru.....	49
Obr. 30: Konformační změny SERCA proteinu během katalytického cyklu transportu Ca ²⁺ ...51	
Obr. 31: Analogická forma E2 proteinu SERCA s navázaným thapsigarginem.....	53
Obr. 32: Znázornění rozdílné konformace SERCA proteinu (převzato a upraveno dle Toyoshima <i>et al.</i> , 2002) v přítomnosti Ca ²⁺ (E1Ca ²⁺ ; struktura uvedená vlevo) a v nepřítomnosti Ca ²⁺ avšak s navázaným thapsigarginem (E2(TG); struktura uvedená vpravo).....	53
Obr. 33: Schéma pracovního postupu při využití SILAC značení.....	62
Obr. 34: Schéma pracovního postupu bez využití SILAC značení.....	63
Obr. 35: Elektroforetogram SILACových kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS po vizualizaci stříbřením.....	68
Obr. 36: Elektroforetogram SILACových kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS po vizualizaci stříbřením s druhým proplachem 50 mM Tris s 0,1% SDS.....	69
Obr. 37: Elektroforetogram kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS po vizualizaci stříbřením bez SILAC značení se zachovaným druhým proplachem 50 mM Tris s 0,1% SDS.....	70
Obr. 38: Elektroforetogram kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS po vizualizaci stříbřením s jedním proplachem 50 mM Tris s 0,1% SDS a jedním 50 mM Tris s 0,5% SDS navíc.....	71
Obr. 39: Detekce SERCA proteinu na PVDF membráně u SILACových kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS.....	72
Obr. 40: Detekce SERCA proteinu na PVDF membráně u kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS bez SILAC značení.	73

1 ÚVOD

Bakalářská práce je zaměřena na identifikaci molekulárních cílů molekul s protinádorovým účinkem. Identifikace molekulárních cílů je důležitá pro pochopení mechanismu účinku potenciálních léčiv. Je nutné osvětlit vazbu léčiva, či kandidáta na léčivo na proteiny, které se účastní biologických procesů v buňce. Pochopení biologických procesů při fyziologických a patologických stavech buňky je nezbytným krokem ve vývoji léčiv.

V současné době se při objevování nových léků využívají proteomické techniky založené na afinitě. Důležitými prostředky sloužícími k identifikaci proteinu, či sady proteinů z různých buněčných lyzátů jsou v tomto případě speciálně navržené ligandy (sondy, inhibitory, či kandidáti na léčiva). Velmi podstatným a důležitým nástrojem pro identifikaci a kvantifikaci proteinů je kapalinná chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Rylová et al., 2015).

V této práci je studován protein SERCA a jeho interakce s léčivem trilobolidem. SERCA je proteinová pumpa, která dopravuje ionty vápníku z cytoplazmy do sarko/endoplazmatického retikula a v cytosolu tak udržuje nízkou hladinu vápníku (Primeau, 2018). V průběhu let se ukázalo, že SERCA proteiny hrají významnou roli v homeostáze Ca^{2+} ve všech savčích buňkách a že jejich inhibice může vést k buněčné smrti. Exprese SERCA proteinu je v některých transformovaných buněčných liniích snížena, což znamená, že některé rakovinové buňky jsou k apoptóze zprostředkované Ca^{2+} náchylnější. Proto je inhibice aktivity SERCA proteinu využívána v protinádorové terapii (Michelangeli *et* East, 2011). Bylo zjištěno, že jejím přirozeným inhibítozem je thapsigargin. Thapsigargin je z důvodu inhibičního účinku na buněčnou proliferaci považován za potenciální lék pro cílenou léčbu rakoviny (Xu et al., 2004). Analogem thapsigarginu je trilobolid. Předpokládá se, že vazebná místa pro trilobolid a thapsigargin jsou identická z důvodu velmi podobné struktury obou molekul. Vystává tak myšlenka, zda by se pro cílenou léčbu rakoviny nedal využít i trilobolid. V návaznosti na studie Tomanová et al., 2015 a Jurášek et al., 2014 jsem provedla experiment na bázi afinitní purifikace, abych osvětlila vazbu trilobolidu na molekulární cíl SERCA.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je nastudování literatury týkající se problematiky tématu této práce, získání schopnosti kultivovat buněčné linie a zvládnutí metody afinitní purifikace včetně následné analýzy molekulárních cílů metodou SDS-PAGE a UHPLC/MS-ESI/LTQ-Orbitrap, zpracování a interpretace naměřených dat.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Proteomika

Proteomika se zabývá studiem proteinů, zejména studiem jejich struktury, role a funkce v organismu. Proteiny jsou podstatné buněčné komponenty každého živého organismu (Shah *et Misra*, 2011), jejichž studium poskytuje globální a integrovaný pohled na jednotlivé buňky, organismy a celou biologii (Graves *et Haystead*, 2002).

Termín proteomika se poprvé objevil roku 1994 v práci profesora M. Wilkinse (Wilkins *et al.*, 1995). Proteomika byla definována jako rozsáhlá charakterizace celého proteinového komplementu buněčné linie, tkáně nebo organismu (Graves *et Haystead*, 2002). Téměř nahradila to, co bylo dříve nazýváno chemií bílkovin. Původní, a ještě klasická, konotace proteomiky je charakterizací kompletní sady proteinů kódovaných genomem daného organismu (Wilkins *et al.*, 1995).

Studium proteinů bylo po objasnění funkce a dekodování genomu dalším významným a očekávaným krokem. Studium proteinů je však oproti studiu genomu podstatně složitější, jelikož genom, na rozdíl od proteomu, zůstává více, či méně konstantní (Shah *et Misra*, 2011). Při snaze o charakterizaci proteomu dané buňky nebo organismu je proto potřeba si uvědomit, že se jedná o strukturu dynamickou, která se neustále během biochemických interakcí s genomem a prostředím mění (Graves *et Haystead*, 2002). Pojem proteom (protein complement of the genome) se stejně jako pojem proteomika poprvé objevil v práci profesora Wilkinse (Wilkins *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 2010; Burkhardt *et Sickmann*, 2011). Proteom je sice přímým produktem genomu, ale může se měnit v závislosti na odlišných podmínkách v různých tkáních organismu. Počet proteinů v proteomu přesahuje počet genů. Tato skutečnost je dána alternativním sestřihem genů a posttranslačními modifikacemi (Wilkins *et al.*, 1995). Proteom tak můžeme definovat jako celou sadu proteinů, která se exprimuje uvnitř buňky v daném časovém bodě za definovaných podmínek na podkladu informace kódované v genomu daného organismu (Parker *et al.*, 2010; Burkhardt *et Sickmann*, 2011).

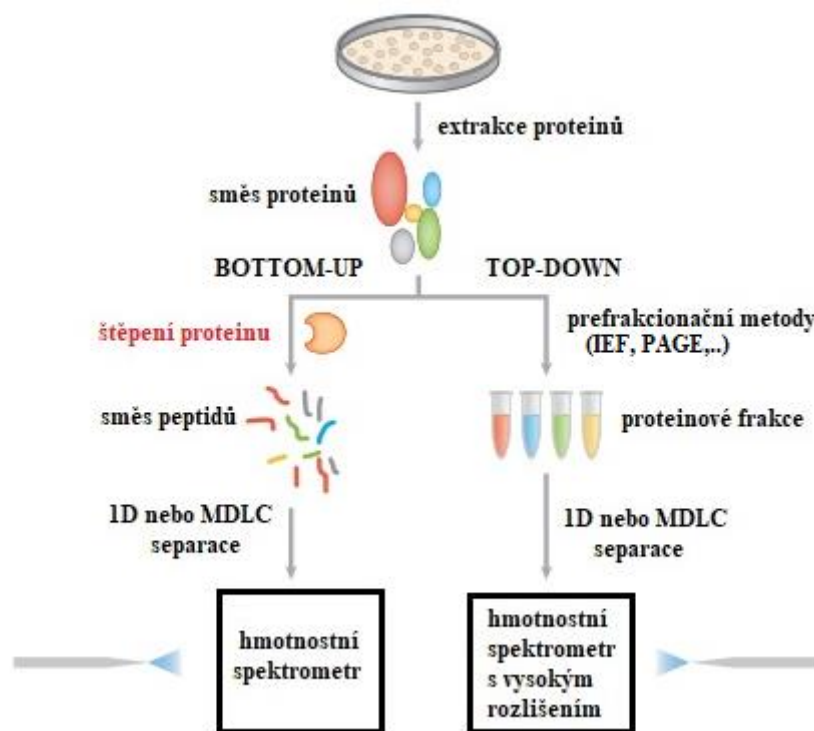
3.1.1 Přístupy k proteomickému studiu

Proteomických přístupů existuje celá řada a pohlížet na ně můžeme jak z hlediska metodologie, tak z hlediska cílů a účelů (Chmelík, 2005). Obecně lze proteomické přístupy použít pro profilování proteomu, pro srovnávací analýzu exprese dvou, nebo více vzorků proteinů, pro studium lokalizace a identifikace posttranslačních modifikací a pro studium interakcí protein-protein (Chandramouli *et Qian*, 2009).

Analytická proteomika je založena na separaci bílkovin ze složitých komplexů a směsí, jejich charakterizaci metodou hmotnostní spektrometrie a na bioinformatickém zpracování získaných údajů. Cílem je identifikace bílkovin, stanovení molekulové hmotnosti,

určení sekvence aminokyselin a určení postranlačních modifikací. **Strukturální proteomika** se zabývá studiem struktury bílkovin, tvorbou a stabilitou nativní konformace a snaží se poznatky využít při modifikacích bílkovin pro specifické účely. **Funkční proteomika** se krom funkce proteinů zabývá studiem komplexních životních procesů. Zabývá se molekulárními drahami zapojenými do procesu vzniku a projevu rozličných onemocnění za účelem studia jejich léčby (Chmelík, 2005). **Diferenční (srovnávací) proteomika** je založena na analýze komplexu bílkovin. Má za cíl identifikovat molekulární cíle (proteiny), které se účastní různých fyziopatologických stavů, s využitím gelových i negelových přístupů (Monteoliva *et al.*, 2004). Sleduje tak změny ve složení daných proteinů při různých stavech (normální/patologický stav) organismu. **High-throughput proteomika** je zaměřena na získávání velkého množství údajů o proteinech, čehož je využíváno pro screeningové účely. **High-coverage proteomika** se zabývá získáváním údajů o sekvenci aminokyselin včetně postranlačních modifikací bílkovin s cílem co nejvyššího pokrytí primární struktury (tj. stanovením pořadí co nejvyššího počtu aminokyselinových zbytků v proteinu), což je důležité při studiu role bílkovin v životních procesech (Chmelík, 2005).

Klasickými postupy při identifikaci proteinů jsou „bottom up“ a „top down“ analýzy (Obr. 1). **Top-down proteomika** je postup identifikace intaktních bílkovin (Resing *et al.*, 2005), při němž je protein nejprve ze směsi izolován a poté bez předchozího proteolytického štěpení charakterizován hmotnostním spektrometrem. Přístup přináší informace o molekulové hmotnosti, sekvenci aminokyselin i postranlačních modifikacích (Chmelík, 2005). **Bottom-up proteomika** představuje postup identifikace bílkovin po proteolytickém štěpení (Resing *et al.*, 2005). Prvně jsou proteiny izolovány ze směsi, poté rozštěpeny na peptidy a ty jsou charakterizovány hmotnostní spektrometrií (Chmelík, 2005). V poslední době byly vyvinuty dvě populární strategie bottom-up proteomiky. Jedná se o metody využívající značení (chemické značení izotopy, značení izobarickými značkami, značení metabolickými izotopy) a metody bez značení, tzv. label-free kvantifikace (Swiatly *et al.*, 2018).



Obr. 1: Srovnání bottom-up a top-down metody (převzato a upraveno dle Zhang *et al.*, 2014). Oba přístupy začínají izolováním proteinových směsí z požadovaných biologických vzorků. Rozdíl tkví v tom, že při bottom up postupu jsou proteinové směsi enzymaticky, nebo chemicky štěpeny na peptidy, kdežto u top down proteomiky se provádí fáze prefrakcionace. Poté jsou směsi peptidů nebo proteionové frakce separovány 1D elektroforézou nebo vícerozměrnou kapalinovou chromatografií MDLC (Multi-Dimensional Liquid Chromatography). Pro přesnou identifikaci a charakterizaci proteinů se využívají hmotnostní spektrometry.

Shot-gun proteomika představuje postup, při němž je neseparovaná směs bílkovin nejdřív enzymaticky rozštěpena na směs peptidů, které jsou separovány (nejčastěji HPLC) a potom detekovány tandemovou hmotnostní spektrometrií. Shot-gun proteomika se zaměřuje na kvantifikaci změn v množství bílkovin mezi vzorky, zejména pomocí značení proteinů (Chmelík, 2005; Resing *et al.*, 2005). Štěpení proteinů pomocí proteázy představuje klíčový prvek v typickém shot-gun proteomickém experimentu. Doposud je proteolytické štěpení převážně prováděno trypsinem, a to především z důvodu jeho vysoké specifity, široké dostupnosti a snadnosti použití (Giansanti *et al.*, 2016). Trypsin je běžným proteolytickým enzymem využívaným v proteomických metodách, protože jde o velmi agresivní, ale specifickou proteázu, která štěpí na karboxylových koncích lysinových a argininových zbytků, pokud nenásleduje prolin (Olsen *et al.*, 2004). Dalšími, o něco méně využívanými, proteázami jsou chymotrypsin, LysC, LysN, AspN, GluC a ArgC (Giansanti *et al.*, 2016).

3.1.2 Metody proteomického studia

Proteiny tvoří složité směsi a komplexy. Aby se snížila složitost vzorků, je předpokladem pro proteomický výzkum, tedy vizualizaci, identifikaci a charakterizaci proteinů, fáze frakcionace (Graves *et* Haystead, 2002). Kvantitativní analýzy proteinů se dosahuje nejčastěji kombinací separace proteinů, zejména elektroforetické nebo chromatografické separace, s hmotnostní spektrometrií (MS), nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií (Gygi *et al.*, 1999, Swiatly *et al.*, 2018). Zavedení hmotnostní spektrometrie představovalo významný průlom v analýze proteinů. Vzhledem k tomu, že se techniky MS rychle vyvíjejí, jsou hojně využívány v biomedicínských vědách i klinickém výzkumu (Swiatly *et al.*, 2018). Separační techniky lze rozdělit do dvou hlavních skupin metod – metod na bázi gelu nebo metod založených na jiném než gelovém principu (Burkhart *et* Sickmann, 2011).

3.1.2.1 Chromatografické metody

Chromatografie je důležitá biofyzikální technika, která umožňuje separaci, identifikaci a čištění složek směsi pro kvalitativní a kvantitativní analýzu (Coskun, 2016). Separace molekul chromatografií je založena na využití jemných rozdílů ve fyzikálních vlastnostech molekul ve vzorcích. Závisí tak na jejich rozpustnosti ve vodě, rozpustnosti v organických rozpouštědlech, kladném, nebo záporném náboji a velikosti. Obecně je tedy chromatografie založena na principu, kdy se od sebe navzájem oddělují molekuly ze směsi. Tato směs je aplikována na povrch, nebo do nitra pevné, či kapalně stacionární fáze a pohybem plynné, nebo kapalně mobilní fáze dojde k rozdělení složek směsi (Asenjo *et* Andrews, 2009; Coskun, 2016). Poskytuje o separovaných složkách dvě základní informace. Jedná se o stupeň retence udávající charakteristiku molekulární struktury a intenzitu signálu vztahující se k množství složky (Nagy *et* Vékey, 2008).

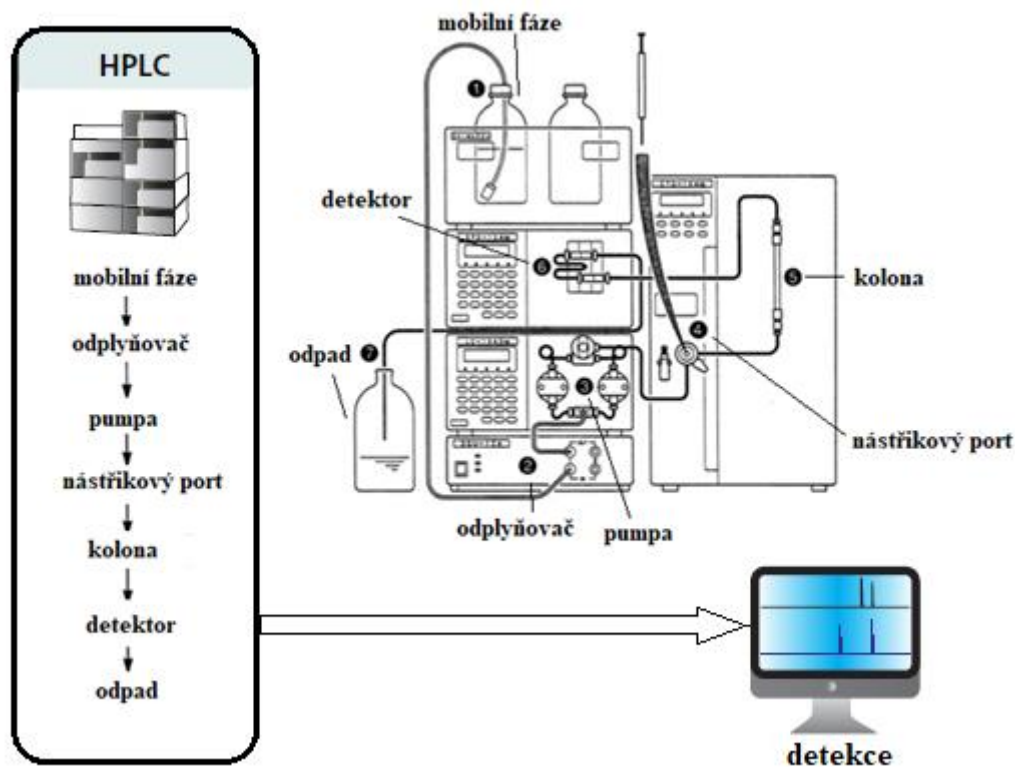
Stacionární fází je v chromatografii pevná fáze, nebo kapalná fáze ukotvená na povrchu pevné fáze. Mobilní fáze proudící přes stacionární fází je plynná, nebo kapalná. Pokud je mobilní fáze kapalná, označuje se chromatografie jako kapalinová (LC; liquid chromatography), a pokud se jedná o plyn, pak se nazývá plynová chromatografie (GC; gas chromatography). Chromatografické metody jsou velmi účinné pro separaci a identifikaci malých molekul – aminokyselin, sacharidů a mastných kyselin. Metody afinitní chromatografie jsou však účinnější při separaci makromolekul – nukleových kyselin a proteinů (Coskun, 2016).

Adsorpční chromatografie je populární metoda pro purifikaci a separaci proteinů pomocí adsorbentu (nosiče), který vytváří stacionární fází (Chase, 1994). Adsorbent se liší polaritou a pro každý experiment je třeba zvážit jeho výběr. Stacionární fáze je polárnější než fáze mobilní (Nagy *et* Vékey, 2008). Pokud je vzorek polárnější než adsorbent, hovoříme o chromatografii na reverzní fází, kdy se využívá C18 sorbentu. Separace prováděné

s adsorbentem s reverzní fází C18 (oktadecylový řetězec) jsou časově náročné, protože eluce systémů rozpouštědel obsahujících vodu je obecně pomalá. Pro tyto typy separací je nejlepší použít střednětlaký chromatografický systém MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography), nebo vysokotlaký chromatografický systém nebo HPLC (Meyers, 2001).

Nejčastěji používanou adsorpční metodou je kolonová chromatografie, při které je skleněná kolona naplněná adsorbentem (Meyers, 2001). Na kolonu (stacionární fázi) se nejprve nanese vzorek, který se má oddělit, a pak se použije promývací pufr (mobilní fáze). Tím je zajištěn jejich průtok vnitřním materiálem kolony a probíhá frakcionace (Coskun, 2016). Je-li molekula rozpuštěna v kapalině, je vedena sloupcem pevných částic, kterým se pohybuje pomaleji než rozpouštědlo. Některé molekuly interagují se sorbentem více, jiné méně a na základě toho mají různý eluční čas (Bird, 1989).

Pro maximální efektivnost chromatografické kolony by měla mít molekula vzorku dostatečnou příležitost k tomu, aby přišla do styku se stacionární fází. Jedním z prostředků, jak toho dosáhnout, je jednoduše učinit kolonu větší. Mnohem úspěšnějším přístupem je však vytvoření co nejmenších částic stacionární pevné fáze. Zmenšení velikosti částic stacionární fáze přináší ovšem praktické problémy, jelikož se zmenšujícím se prostorem mezi jednotlivými částicemi vzrůstá tlak. Pro metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC; high performance liquid chromatography) se proto musí využívat pevných fází, které těmto vysokým provozním tlakům odolávají (Bird, 1989). HPLC je instrumentální forma kapalinové chromatografie, která využívá stacionárních fází tvořených malými částicemi, čímž se dosahuje účinnějších separací. Metoda se vyvinula v pozdních šedesátých letech (Moreno-Arribas et Polo, 2003). Součástí HPLC aparatury (Obr. 2) je výkonné vysokotlaké čerpadlo, které umožňuje průtok mobilní fáze úzkou kolonou, v níž jsou ukotveny částice stacionární fáze velké zpravidla od 5 μm do 250 μm . Díky tomuto dosahuje HPLC vyšší účinnosti látek za kratší dobu ve srovnání s klasickou kolonovou chromatografií (Bird, 1989). HPLC je důležitý nástroj pro stanovení kovových iontů o stejné hmotnosti, ale různé elektronické konfiguraci, pro separaci komplexních směsí a pro rozlišení iontů, které by byly samotnou MS nerozlišitelné (Rekhi *et al.*, 2017).



Obr. 2: Blokové schéma HPLC aparatury
(převzato a upraveno Schimadzu [online], 2019).

Afinitní chromatografie je specifickým typem adsorpční chromatografie (LSC; liquid-solid chromatography). Afinitní chromatografie je jednou z nejrozmanitějších a nejvýkonnějších chromatografických metod pro purifikaci specifické molekuly nebo skupiny molekul z komplexní směsi specifickou interakcí solutu s ligandem, který je imobilizován (Anusha et al., 2018). Konvenční postupy purifikace proteinů jsou založeny na rozdílech ve fyzikálních a chemických vlastnostech. Pro specifické interakce jsou takové separace obvykle pracné a výtěžky nízké, a to především kvůli mnoha krokům purifikace a nízké koncentraci purifikovaných proteinů. Pro překonání těchto obtíží se využívá afinitní chromatografie (Cuatrecasas et al., 1968; Anusha et al., 2018). Afinitní chromatografie je typ kapalinové chromatografie, která využívá reverzibilní a specifické interakce ligandů s purifikovanými makromolekulami (Arora et al., 2017). Specifický ligand je k matici kovalentně připojený. Proteiny a jiné molekuly, které nevykazují afinitu k ligandu, prochází kolonou, zatímco molekuly rozpoznávající ligand se na ligand váží. Eluce navázaného proteinu je dosaženo změnou pH, nebo koncentrace soli (Wilchek, 1972, Anusha et al., 2018).

Gelová permeační chromatografie (GPC; gel-permeation chromatography) je známa pod řadou dalších názvů, jako je kapalinová vylučovací chromatografie (LEC; liquid-exclusion chromatography), gelová filtrační chromatografie (GFC; gel-filtration chromatography) či

velikostně vylučovací chromatografie (SEC; size exclusion chromatography). Stacionární fázi GPC tvoří materiály, které se neodlišují od materiálů pro adsorpční chromatografii. Hojně využívané jsou agarové, agarosové, sephadexové, polyakrylamidové či dextranové nosiče zesíťované epichlorhydrinem (Hong *et al.*, 2012). Separace proteinů v případě GPC probíhá na základě různých velikostí pórů v gelových maticích. Makromolekuly unášené mobilní fází mohou do pórů pronikat v závislosti na vlastní velikosti (Maire *et al.*, 1987, Nagy *et Vékey*, 2008). Roztok obsahující molekuly různých rozměrů se kontinuálně propouští kolonou. Molekuly, které jsou větší než póry, nemohou pronikat do gelových částic. Procházejí prostorem mezi porézními částicemi a pohybují se rychle uvnitř kolony. Molekuly, které jsou menší než póry, do pórů pronikají a opouštějí kolonu s proporcionálně delšími retenčními časy (Coskun, 2016).

Iontoměničová (ionexová) chromatografie (IEC; ion exchange chromatography) odděluje biomolekuly na základě rozdílů ve vlastnostech náboje (Cummins *et al.*, 2017). Proteiny, polynukleotidy a další biomakromolekuly v mobilní fázi odhalují na svém povrchu nabitě skupiny. Tyto nabitě skupiny interagují s opačně nabitými skupinami imobilizovanými na iontoměničovém nosiči, který tvoří stacionární fázi (Williams *et Frasca*, 1999; Jungbauer *et Hahn*, 2009). Náboj proteinu závisí na pH jeho prostředí. Hodnota pH, při níž je náboj proteinu je nulový (tj. kde počet kladných nábojů se rovná počtu záporných nábojů), je známa jako izoelektrický bod (pI). Pokud je pH větší než pI, protein bude mít záporný náboj a bude se vázat na aniontoměničové nosiče (anexy), které jsou kladně nabitě. Když je pH menší než pI, protein bude mít kladný náboj a bude se vázat na kationtoměničové nosiče (katexy), které jsou záporně nabitě (Williams *et Frasca*, 1999; Coskun, 2016).

3.1.2.2 Elektromigrační metody

Separovat proteiny s vysokým rozlišením na základě rozdílů v náboji je možné diskontinuální elektroforézou, isotachoforézou a zejména izoelektrickou fokusací (Vesterberg, 1993). O objev diskontinuální elektroforézy se zasloužili Orstein a Davis (Orstein, 1964). Diskontinuita může být v pH, pI, či koncentracích gelu. V případě pH je využito systému dvou pufřů o rozdílném pH a rozdílného elektrodového pufřu. Při diskontinuální elektroforéze se separace obvykle provádějí v polyakrylamidových gelech. Tato metoda je užitečná pro separaci komplexních směsí (Wiltfang *et al.*, 1991; Vesterberg, 1993). Při isotachoforéze se využívá systému dvou pufřů. Separované komponenty se pohybují v řadě za sebou mezi vedoucím „leading“ a zakončujícím „trailing“ iontem na základě své mobility v diskontinuálním gradientu (Gebauer *et Boček*, 1995). Při izoelektrické fokusaci je vytvořen gradient pH (pH se kontinuálně zvyšuje z anody na katodu) pomocí amfolytů (Vesterberg, 1972), nebo imobilinů. Každý protein migruje do oblasti hodnoty pH rovné svému izoelektrickému bodu. Při elektroforéze dochází k migraci elektricky nabitých molekul v roztocích v důsledku elektrického pole mezi anodou

a katodou (Orstein, 1964).

Separace na základě velikosti je dosahováno pomocí SDS-PAGE (Vesterberg, 1993). SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE) je nejvyužívanější technikou pro separaci proteinů. Využívá se pro odhad velikosti proteinu, pro posouzení čistoty bílkovin, ke kvantifikaci proteinu, k monitorování integrity proteinu, ke srovnání proteinového složení různých vzorků nebo k analýze počtu a velikosti polypeptidových podjednotek. Využívá se také při Western blottingu, dále jako druhý rozměr 2-D map či jako frakcionační metoda v shot-gun proteomice (Righetti *et* Candiano, 2011). Provádí se v prostředí 0,1% dodecylsulfátu sodného (SDS), který je ionogenním detergentem. Pozoruhodných vlastností SDS si povšimnul roku 1967 Carioca a kolektiv a zasloužil se tak o rozvoj této separační techniky. Proteiny ponechal v roztoku SDS a vypožoroval, že micely proteinů působením SDS ztratily svůj amfoterní náboj. SDS-proteinové komplexy při SDS-PAGE obsahují 1,4 g detergentu na 1 g proteinu (Pitt-Rivers *et* Impiombato, 1968). Tím získají uniformně negativní celkový náboj, který je konstantní (Righetti *et* Candiano, 2011). Principem metody je pohyb molekul na základě jejich velikosti a pohyblivosti v polyakrylamidovém gelu. Velká rozlišovací schopnost je zajištěna diskontinuálním systémem pufrů. Liší se pufr pro přípravu zaostřovacího a separačního gelu a pufr pro přípravu gelů se liší od pufru elektrodového (Smith, 1984).

Nejvyužívanějším systémem je Laemmliho (Tris-glycinový) systém pufrů. Pro přípravu zaostřovacího a separačního gelu jsou použity dva pufrы o rozdílném pH a třetí je elektrodový pufr, který tvoří elektrolyt. Zaostřovací („stacking“) gel funguje na principu isotachoforézy, při které dochází ke zužování zóny mezi nejrychleji a nejpomaleji se pohybujícím iontem (Gebauer *et* Boček, 1995; Smith, 1984). Vedoucím („leading“) iontem je Cl⁻. Ukončujícím („trailing“) iontem je glycin, který se v gelu pohybuje nejpomaleji, jelikož nenesе žádný náboj. Proteiny se pohybují mezi oběma ionty a dochází k jejich zakoncentrování (Laemmli, 1970; Smith, 1984). Laemmliho systém má však nedostatečnou rozlišovací schopnost pro proteiny menší než 10 kDa. Detekuje proteiny ležící velikostně za hranicí 100 kDa, ale proteiny pod 10 kDa nejsou detekovány vůbec, nebo jsou detekovány pouze částečně. V průběhu let proto byla provedena některá důležitá vylepšení SDS-PAGE (Righetti *et* Candiano, 2011). Metodu SDS-PAGE upravili Schägger a von Jagow. Schägger-von Jagowův diskontinuální systém slouží k detekci malých proteinů. Využili Tris derivát glycinu, tricin. Tricin slouží v katodovém pufru jako zakončující ion, k separaci navíc dochází již v zaostřovacím gelu (Schägger *et* von Jagow, 1987). Teprve na počátku 90. let 20. století byl publikován univerzální systém pro separaci proteinů od 1 do 100 kDa. Jednalo se o nový vícefázový pufrový systém, který byl založen na teorii vícefázové zónové elektroforézy (Wiltfang *et al.*, 1991). Dalším vylepšením metody byl objev Blue Native elektroforézy (BN-PAGE), která slouží zejména k analýze membránových proteinů. Na proteiny, které si zachovávají enzymatickou aktivitu, by se nenavázalo správné

množství SDS. Proto se do katodového pufru přidává barvivo Coomassie blue G250, které proteinům dodává negativní náboj stejně jako SDS a proteiny tak migrují k anodě (Schägger *et* von Jagow, 1991).

Kombinací izoelektrické fokusace s SDS-PAGE lze provádět dvourozměrnou gelovou elektroforézu, která poskytuje vysoké rozlišení (Vesterberg, 1993). Při dvojrozměrné elektroforéze (2DE) jsou proteiny odděleny na základě dvou odlišných vlastností – dle jejich náboje (pI) v prvním rozměru a posléze podle jejich molekulové hmotnosti v druhém rozměru (Joshi *et* Patil, 2017). Při jednorozměrné elektroforéze (1DE) se proteiny separují na základě molekulových hmotností v rozmezí od 10 do 300 kDa. 1D gel má nižší rozlišovací schopnost a využívá se zejména k charakterizaci bílkovin, které jsou již po určité fázi čištění (Graves *et* Haystead, 2002; Chevalier, 2011). Přestože jsou přístupy 2DE vytlačovány analýzou vzorků hmotnostním spektrometrem, využívá se stále pro analýzu biologických vzorků v diferenciací proteomice pro odlišení vzorků z nemocného pacienta od pacienta zdravého (Viglio *et al.*, 2018). 2DE řeší proteiny na základě izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti. Vysoké rozlišení této technologie umožňuje separaci a charakterizaci proteinů s posttranslačními modifikacemi, které ovlivňují jejich stav nabití. 2DE se vyznačuje vysokou reprodukovatelností, což ji řadí mezi centrální technologie pro následné analýzy, které identifikují posttranslační modifikace (Zong *et al.*, 2008).

Vizualizace jednotlivých proteinových produktů (bandů) se obvykle provádí buď *in situ* v samotné matici, polyakrylamidovém gelu, nebo po přenosu (blottingu) separovaných proteinů na polymerní membránové nosné materiály. Preferovanou metodou barvení v gelu je posteletroforetické *in situ* barvení separovaných proteinů. Proteiny, které jsou inherentně zbarveny, lze snadno pozorovat přímo v polyakrylamidových gelech po vystavení světlu ve viditelném spektru. U drtivé většiny proteinů vyžaduje však vizualizace použití barviv nebo značek. Mnoho organických barviv a značek, které byly upraveny pro detekci proteinů v polyakrylamidových gelech, byly odvozeny od barviv původně používaných v textilním průmyslu. Mezi nejčastěji používaná organická barviva patří Amidočern 10B, Ponceau S, Coomassie Brilliant Blue R-250 (R = načervenalý odstín) a Coomassie Brilliant Blue G-250 (G = zelenkavý odstín; CBB-G). Vyvinuta byla také barvení na bázi anorganických kovových solí. Zejména bylo vyvinuto velké množství postupů barvení stříbrem, které je až stokrát citlivější než zmíněné metody barvení (Wirth *et* Romano, 1995). Stříbření gelů vizualizuje proteiny již v množství 10 ng. Barvení stříbrem bylo uvedeno do praxe roku 1979 Switzerem, Merrilem a Shifrinem (Switzer *et al.*, 1979). Základní princip stříbření je založen na donor-akceptorovém mechanismu. Ionty stříbra, které jsou akceptorem, se ve formě barviva na bázi stříbra přidávají na bílkovinný vzorek. Funkční skupiny tohoto bílkovinného vzorku jsou donorem elektronu. Stříbro v přítomnosti donorů elektronů prochází redukcí a je přeměněno na

volné kovové stříbro, což se projevuje charakteristickým zbarvením (Shah *et Misra*, 2011). Postupné fáze barvení stříbrem jsou fixace proteinů sloužící k odstranění interferujících sloučenin, senzibilizace ke zvýšení citlivosti a kontrastu barvení, impregnace stříbrem a nakonec vývoj obrazu (Chevallet *et al.*, 2007).

3.1.2.3 Western blotting

V návaznosti na Southern blotting, sloužící k přenosu molekul DNA na membránu (Southern, 1975), se rozvíjely myšlenky, zda je možný i přenos proteinů. Realizovat tyto myšlenky se podařilo až H. Towbinovi roku 1979. Metoda byla demonstrována na ribozomálních proteinech přenesených z gelu obsahujícího močovinu. Imobilizované proteiny byly detekovány pomocí imunologických postupů (Towbin *et al.*, 1979; Towbin, 2009). Nezávisle na Towbinovi prováděl výzkum W. N. Burnette a kolektiv jeho laboratoře. Namísto polyakrylmočovinných gelů však laboratoř vsadila na SDS-polyakrylamidové gely. Metodu přenosu proteinů z SDS-polyakrylamidových gelů na nitrocelulózovou membránu Burnette nazval Western blottingem. Proteiny jsou na membráně uchyceny adsorpcí, či kovalentní vazbou (Burnette, 1981; Burnette, 2009; MacPhee, 2010).

Obecný princip Western blottingu je složen z několika kroků. Proces začíná přípravou vzorku (může zahrnovat extrakci buněčných proteinů z komplexní směsi či kvantifikaci koncentrace) a pokračuje elektroforetickou separací proteinů v gelové matrici. Po elektroforetické separaci jsou proteiny přeneseny na membránu (Bass *et al.*, 2017). Membrána je umístěna přímo na gelu, a tím je zajištěn přenos proteinů v zrcadlovém zobrazení (MacPhee, 2010). Typicky se využívají membrány z nitrocelulózy nebo polyvinylidendifluoridu (PVDF). Na PVDF membrány se váží proteiny hydrofobními interakcemi (Tonkinson *et Stillman*, 2002). Hydrofobní povaha PVDF membrán vyžaduje počáteční aktivaci membrány namáčením v methanolu, aby mohlo dojít k infiltraci pufu a vazbě proteinů (Mansfield, 1995). Přenos bílkovin na PVDF membrány může být také inhibován vysokými koncentracemi SDS, takže před přenosem by měly být gely promyty v destilované vodě a potom ekvilibrovány v přenosovém katodovém pufru (Mozdzanowski *et al.*, 1992).

Barvení blotovacích membrán umožňuje vizualizaci navázaných proteinů a umožňuje monitorovat účinnost přenosu na membránu. Amidočerní umožňuje detekci přenesených proteinů na jakýkoliv typ membrány v množství větším než 50 ng/produkt. Produkty se jeví jako tmavě modré pruhy na světle modrém pozadí. Amidočerní má citlivost podobnou citlivosti Coomassie blue, ale je rychlejší metodou. Coomassie blue R-250 lze použít na většinu typů membrán s výjimkou nitrocelulózové. Vysoké koncentrace organických rozpouštědel v barvivo nitrocelulózovou membránu rozpouští. Ponceau S je nejméně citlivou metodou barvení bílkovin. Přenesené proteiny se musí vyskytovat v množství větším než 200 ng/produkt. Jeví se jako

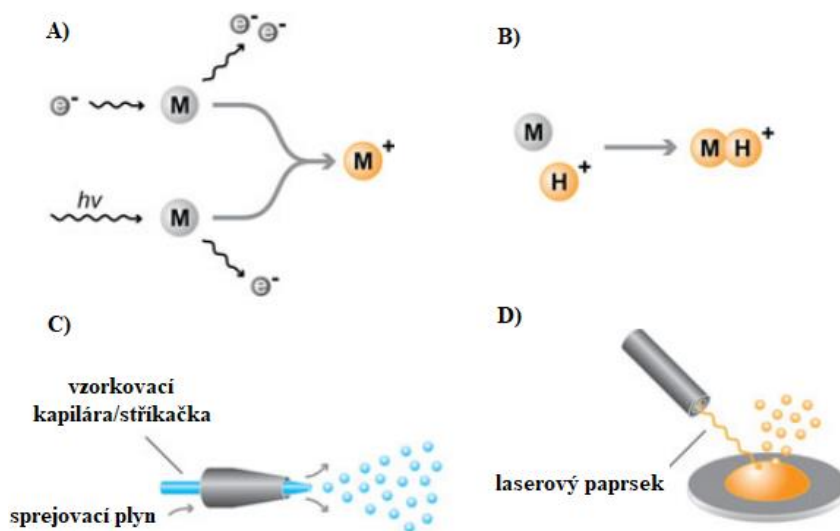
červené pruhy na růžovém pozadí. Hlavní výhody barvení Ponceau je to, že v podstatě všechny skvrny mohou být odstraněny prodlouženým odbarvením. To je výhodné pro znovupoužití membrány pro barvení jinou detekční metodou, např. imunoblotování. Naopak citlivou metodou je barvení koloidním zlatem, kdy se produkty jeví jako červené pruhy na růžovém pozadí. Metodou lze vizualizovat proteiny přenesené v množství 2 ng/produkt. Podobnou citlivost má stříbření membrán (Goldman *et al.*, 2016). Specifická detekce proteinů se provádí pomocí primárních protilátek, přičemž vzniklý komplex se dále vizualizuje vazbou se značenou sekundární protilátkou. Jelikož by primární protilátka mohla reagovat s nescifickými proteiny, provádí se po elektroblottingu blokování membrány, aby se pravděpodobnost nescifické vazby protilátky snížila. Snížení nescifické vazby lze docílit využitím inertních proteinů BSA, či odtučněného mléka. (Bass *et al.*, 2017).

3.1.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Proteomika na bázi hmotnostní spektrometrie se stala nepostradatelným nástrojem umožňujícím analýzu proteinových vzorků. Hmotnostní spektrometrie separuje nabitě částice na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). Její vysoká selektivita a citlivost umožňuje objasnění primárních sekvencí včetně posttranslačních modifikací peptidů a proteinů, kromě toho může být použita také k identifikaci protein-proteinových interakcí (Sickmann, 2011). Jelikož peptidy vykazují širokou škálu různých fyzikálně-chemických vlastností, jako je velikost, náboj či hydrofobicita, vedou tyto odlišnosti k velkým rozdílům v hmotnostně spektrometrické odezvě. Pro přesnou kvantifikaci je nutné porovnávat každý jednotlivý peptid. Pro studium diferenčních změn v proteomu jsou často využívány kvantifikační metody hmotnostní spektrometrie (Bantscheff *et al.*, 2007). Techniky MS se také využívají ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC) nebo kapilární elektroforézou, které umožňují vysoké rozlišení (Swiatly *et al.*, 2018).

Principem metody je ionizace chemických sloučenin, tvorba nabitých molekul a měření jejich poměru hmotnosti k náboji. Prvním krokem v MS analýze je ionizace (Obr. 3). Ta má za následek vytvoření nabitých částic – iontů (Awad *et al.*, 2014). Tradiční **ionizační metoda elektrony (EI; electron ionization)** využívá k ionizaci elektrony a pracuje pouze ve vakuu, zatímco analyty se již nachází v plynné fázi. Paprsky elektronů jsou tvořeny zahřátým kovovým vláknem (např. wolframovým) a tyto elektrony jsou elektricky urychlovány a směřovány tak, aby se srazily s odpařeným vzorkem, což způsobuje vylučování elektronů z analytů a následné vytváření kladně nabitých radikálových kationtů. Tyto podmínky nejsou vhodné pro velké molekuly. Vzhledem k omezením spojeným s ionizací EI byly zavedeny metody **chemické ionizace (CI)**. CI závisí na interakci mezi energetickými elektrony a neutrálními molekulami, což má za následek tvorbu nabitých iontů, které budou interagovat s analyty a produkovat protonované druhy. Podobně jako u ionizace EI, tato metoda představuje určitá omezení, pokud

jde o hmotnostní rozsah. Hlavním problémem obou zmíněných metod ionizace je neschopnost ionizovat tepelně nestabilní polární biologické sloučeniny (El Aneed *et al.*, 2009). V poslední době je v klinické proteomice široce využívána ionizace elektrosprejem a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI; matrix assisted laser desorption/ionization) a její varianta povrchově zesílená laserová desorpce (surface-enhanced laser desorption/ionization; SELDI) spojená s analyzátozem doby letu TOF (Swiatly *et al.*, 2018). Při **ionizaci elektrosprejem (ESI; electrospray ionization)** je vzorek v roztoku aplikován kapilárou, či jehlou do iontového zdroje. Pomocí elektrického napětí, které může být na základě povahy analytu buď negativní, nebo pozitivní, dochází k produkci nabitých kapiček vzorku, které jsou odpařovány. Tomuto jevu se říká nebulizace. Odpařování nastává buď zvýšením teploty, nebo proudem inertního plynu (např. dusíku). Kapičky zmenšují odpařováním svůj objem a následně proběhne tzv. Coulombická exploze, kdy dojde k rozpadnutí kapiček na vícenásobně nabitě ionty. Ionty putují dále do spektrometru, kde jsou analyzovány (Awad *et al.*, 2014). Při **ionizaci laserem za přítomnosti matrice (MALDI)** dochází k přechodu vysokomolekulárních látek do plynné fáze odpařením roztoku vzorku v matrici. Analyt je smísen s matricí (využívá se α -kyano-4-skořicová a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina), je nanesen na kovovou desku a odpaření je způsobeno krátkým laserovým pulsem (Medhe, 2018a).

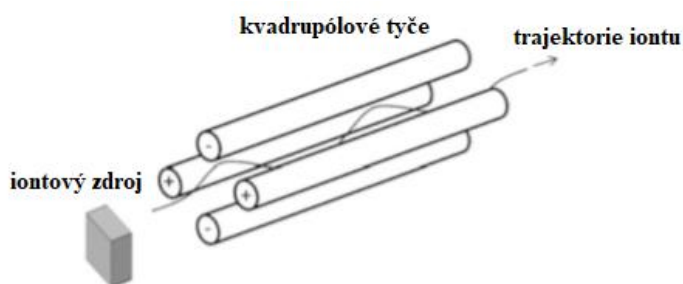


Obr. 3: Schéma základních ionizačních technik (převzato a upraveno dle Pól *et al.*, 2010). (A) elektronová ionizace, (B) chemická ionizace, (C) ionizace elektrosprejem, (D) desorpční ionizace.

Po procesu ionizace jsou ionty odděleny na základě poměru m/z v hmotnostním analyzátozu (Awad *et al.*, 2014). V hmotnostním spektrometru je izolace iontů obvykle elektricky poháněna, i když tradiční analyzátory, konkrétně magnetické sektory, využívají magnetické pole, které ovlivňuje separaci iontů. Pokud jde o dostupné metodiky, existuje opět mnoho systému podobně jako u procesu ionizace. V současné době jsou široce používány tyto

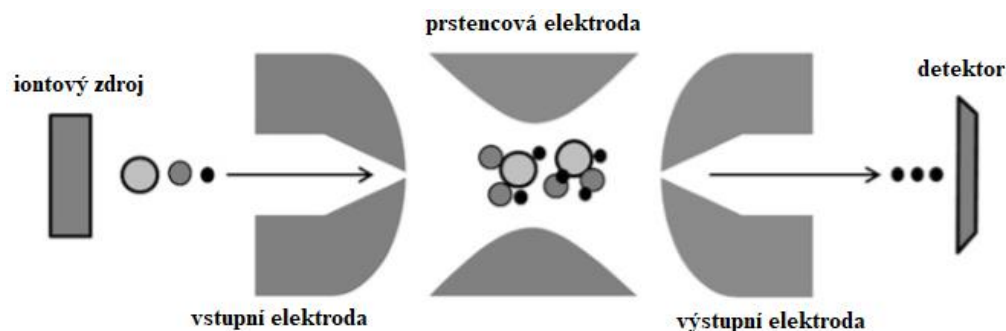
analyzátoři: kvadrupól, kvadrupólová iontová past, analyzátor doby letu (TOF; time of flight), iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a Orbitrap (El Aneed *et al.*, 2009; Haag, 2016).

Princip **kvadrupólového hmotnostního analyzátoru** byl poprvé popsán v padesátých letech fyzikem Paulem Wolfgangem (El Aneed *et al.*, 2009). Kvadrupóly (Obr. 4) se skládají ze čtyř válcových, nebo hyperbolických tyčí, které jsou k sobě paralelní. Protilehlé tyče mají stejnou polaritu a tyče sousední mají polaritu opačnou (Ekman *et al.*, 2009, Haag, 2016). Tyče jsou elektricky propojeny a je na ně aplikován radiofrekvenční potenciál. Potenciál stejnosměrného proudu je pak superponován přes RF potenciál. Kombinace obou potenciálů způsobuje, že ionty oscilují, když procházejí kvadrupólem ve směru z. V závislosti na potenciálu stejnosměrného proudu a frekvenci radiofrekvenčního potenciálu budou mít pouze ionty určitého m/z stabilní trajektorii. Ionty s nestabilní trajektorií narazí do tyčí a odfiltrují se (Haag, 2016).



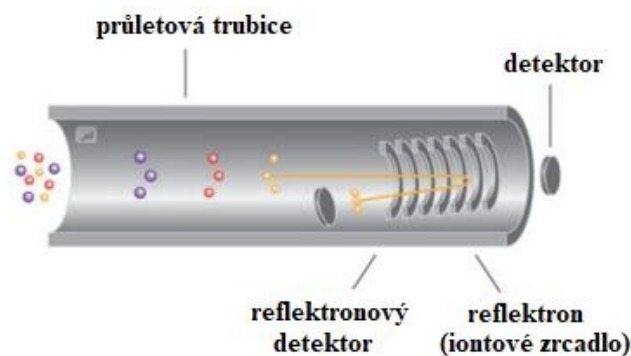
Obr. 4: Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru
(převzato a upraveno dle Haag, 2016).

Dalším typem analyzátoru je **kvadrupólová iontová past**. První zmínka o tomto typu analyzátoru pochází z práce Paula a Steinwedela z roku 1960 (Paul *et Steinwedel*, 1960). Kvadrupólová iontová past (Obr. 5) je analyzátor, který funguje na stejném principu jako kvadrupólový analyzátor. Rozdíl je však v geometrii. Iontová past je tvořena třemi elektrodami. Jedná se o dva hyperbolické talíře (vstupní a výstupní elektrody) umístěné po stranách hyperbolického prstence, který je třetí elektrodou (Haag *et al.*, 2016). Na prstencovou elektrodu uprostřed je přiváděno vysokofrekvenční napětí. Ionty z iontového zdroje se přenáší do pasti skrz otvor ve vstupní elektrodě a díky elektromagnetickému poli a inertnímu plynu jsou v analyzátoru zadržovány. Vypuzení iontů skrz otvor výstupní elektrody nastává v závislosti na poměru m/z po změně pole. Ionty dále pokračují k detektoru (Hofman *et Stroobant*, 2007).



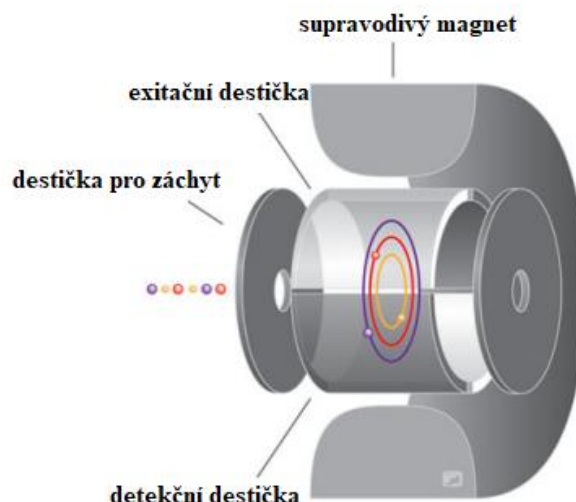
Obr. 5: Schéma kvadrupólové iontové pasti (převzato a upraveno dle Haag, 2016).

Metodika **TOF analyzátoru** byla poprvé popsána v polovině 20. století (Stephens, 1946) a znovu objevena byla až v 90. letech (Brown *et* Lennon, 1995). Lineární analyzátor doby letu spoléhá na volný let ionizovaných molekul v trubici o délce 1–2 m, než dosáhnou detektoru. Pokud jsou dva ionty vytvořeny současně se stejným nábojem, dosáhnou detektoru na základě své hmotnosti. Hlavní výhodou analyzátoru TOF na rozdíl od kvadrupólových přístrojů je to, že všechny vytvořené ionty se nakonec dostanou do detektoru. Vylepšením klasického TOF analyzátoru byl přídavek reflektoru (Obr. 6). Reflektornový mód byl zaveden pro lepší rozlišení, jelikož dráha a doba letu iontu je prodloužena. Ion nedopadá na lineární detektor na konci trubice, ale dráha letu je obrácena reflektorem na reflektorný detektor (El Aneed *et al.*, 2009; Pól *et al.*, 2010).



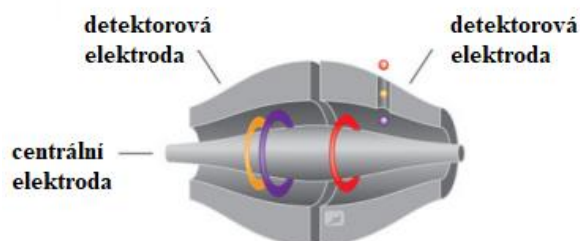
Obr. 6: Analyzátor doby letu s reflektorem (převzato a upraveno dle Pól *et al.*, 2010).

Analyzátor FT-ICR (Obr. 7) určují poměr m/z měřením cyklotronové frekvence iontů v pevném magnetickém poli (Haag, 2016). Metodu představil roku 1974 Comisarow a Marshall (Comisarow *et* Marshall, 1974). Vychází z pohybu iontů v magnetickém poli. Pokud se iont dostane do silného magnetického pole tvořeného supravodivým magnetem, začne se s určitou frekvencí pohybovat po kruhové trajektorii. Každá hodnota m/z tak má charakteristickou frekvenci, která se do škály m/z převede Fourierovou transformací. (Comisaro *et* Marshall, 1974; Nikolaev *et al.*, 2014).



Obr. 7: Schéma analyzátoru FT-ICR (převzato a upraveno dle Pól *et al.*, 2010).

Dalším typem analyzátoru je **Orbitrap**. Vyznačuje vysokým rozlišením a byl vyvíjen s cílem vytvoření ideálního hmotnostního spektrometru (Eliuk *et Makarov*, 2015). Ionty zde vlivem elektrických polí obíhají centrální elektrodu a současně oscilují s frekvencí, která je závislá na jejich poměru m/z . Oscilace se snímá vnějšími detekčními elektrodami (Obr. 8). Frekvence iontů o určité m/z se získávají Fourierovou transformací a posléze jsou převedeny na klasické hmotnostní spektrum (Makarov, 2000).

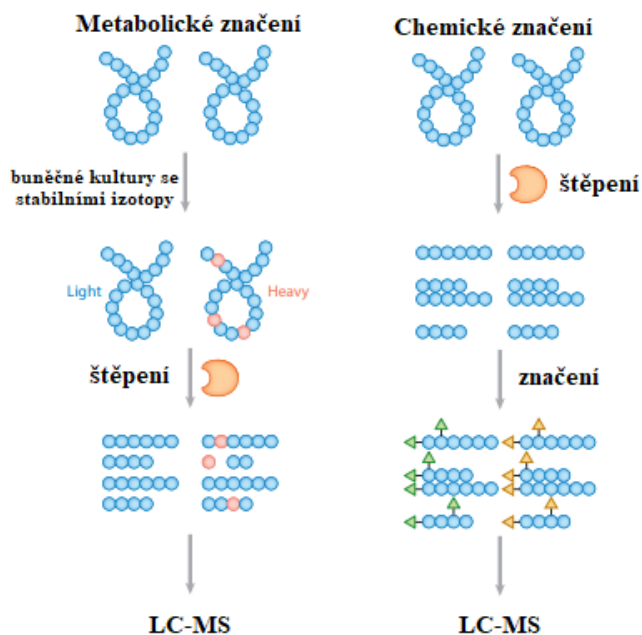


Obr. 8: Schéma Orbitrapu (převzato a upraveno dle Pól *et al.*, 2010).

Podstatnou součástí hmotnostního spektrometru je detektor. Ten detekuje aktuální signál generovaný průchodem nebo dopadem iontů. Výstup dat detektoru po amplifikaci je nahráván. Nejstarším a nejjednodušším typem detektoru je fotografická deska, která detekuje všechny ionty a intenzita značky na filmu je úměrná množství iontů. Dnes je nejvyužívanějším detektorem elektronový násobič (electron multiplier), který využívá sekundární elektronovou emisi. Počet uvolňovaných sekundárních elektronů je přímo úměrný typu dopadající primární částice, její energii a vlastnostem povrchu, na který částice dopadá (Medhe, 2018b).

3.1.2.5 Proteomické metody kvantifikace v hmotnostní spektrometrii využívající značení proteinů

Metody kvantifikace proteinů pomocí MS jsou využívány pro studium diferenčních změn v proteomu (Bantscheff *et al.*, 2007). Provádí se relativní kvantifikace pomocí značení proteinů stabilními izotopy, nebo absolutní kvantifikace za využití syntetických peptidových standardů. Inkorporace stabilních izotopů (Obr. 9) do proteinů může být metabolická, enzymatická, nebo chemická (Bantscheff *et al.*, 2007, Ong *et Mann*, 2006).



Obr. 9: Rozdíly v metabolickém a chemickém značení (převzato a upraveno dle Zhang *et al.*, 2014). Metabolické značení: Proteiny jsou označeny metabolicky za použití kultury obohacené izotopem. Lehké a těžké proteinové směsi jsou získány z buněčné kultury, poté štěpeny, analyzovány LC-MS a kvantifikovány. Chemické značení: Při izobarickém značení jsou bílkoviny obvykle označeny izobarickými značkami, které umožňují kvantifikaci pomocí MS/MS díky reportérové skupině značky, po proteolytickém štěpení.

Značení stabilními izotopy je založeno na zavedení rozdílové hmotnostní značky ve formě malé chemické látky, štítku, do proteinu. Toto označení umožňuje srovnávací kvantifikaci proteinů v jednom vzorku. Štítek mění hmotnost peptidu či proteinu a neovlivňuje jeho analytické vlastnosti (Faktor *et al.*, 2012). Stabilní izotopové značení bylo zavedeno v roce 1999 třemi nezávislými laboratořemi (Gygi *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 1999; Veenstra *et al.*, 1999; Bantscheff *et al.*, 2007).

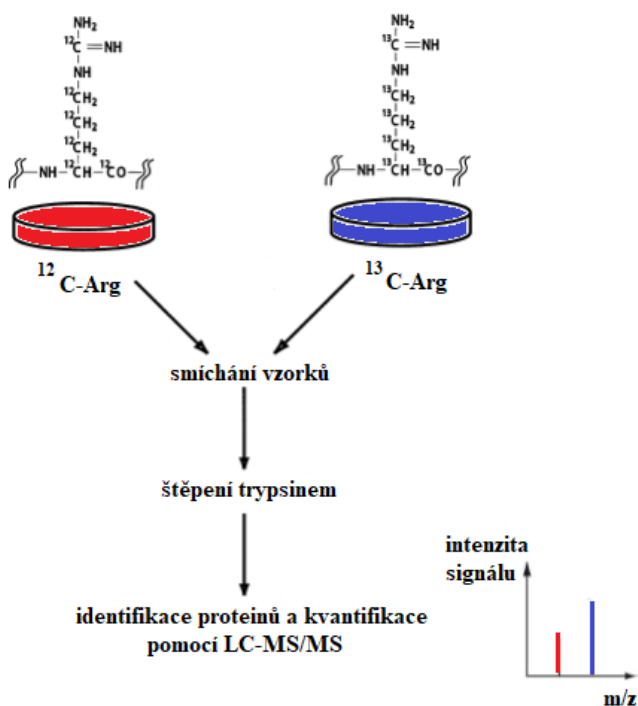
Postup metabolického značení byl původně popsán pro celkové značení bakterií za použití buněčného kultivačního média obohaceného o ^{15}N (Oda *et al.*, 1999), širší popularitu

však získal ve formě stabilního značení proteinů izotopicky značenými aminokyselinami v buněčné kultuře (SILAC) zavedeného Mannem a spolupracovníky v roce 2002, která využívá izotop ^{13}C (Ong *et al.*, 2002). Alternativními stabilními izotopy jsou dále, ^{18}O a ^2H (Oda *et al.*, 1999). Postup značení proteinů stabilními izotopy je použitelný pro všechny buněčné systémy, které mohou být pěstovány v izotopově obohaceném médiu. Vzhledem k tomu, že hmotnostní spektrometr dokáže rozpoznat hmotnostní rozdíl mezi označenou a neoznačenou formou peptidu, kvantifikace je dosaženo porovnáním intenzit jejich signálů (Bantscheff *et al.*, 2007). Mezi nejběžnější strategie značení proteinů patří ICAT (izotopově kódovaná afinitní značka), iTRAQ (izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci), TMT (Tandem Mass Tag) a již zmíněný SILAC (Swiatly *et al.*, 2018).

Značení pomocí metody SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) je strategie metabolického značení *in vivo*, která využívá stabilní izotopově značené aminokyseliny v růstovém médiu. Toto stabilní izotopové značení aminokyselinami v buněčné kultuře je jednoduchý a přitom výkonný přístup kvantitativní proteomiky na bázi hmotnostní spektrometrie (MS). V růstovém médiu jsou přirozeně se vyskytující (lehké) aminokyseliny nahrazeny značenými těžkými aminokyselinami a buňky pěstované v tomto médiu do sebe těžké aminokyseliny zainkorporují (Ong *et al.*, 2002; Ong *et Mann*, 2006). Označené esenciální aminokyseliny se přidávají přímo ke kultivačním médiím deficientním na dané esenciální aminokyseliny. Jsou proto začleněny do všech bílkovin a poté dále syntetizovány a zakódovány do proteomu (Ong *et al.*, 2002). Tyto těžké aminokyseliny nemají žádný vliv na morfologii buněk nebo rychlost jejich růstu. Proteiny, nebo peptidy z neoznačených a značených vzorků jsou smíchány v poměru 1:1. Poté je provedena redukce disulfidových vazeb, které jsou před opětovnou oxidací ochráněny alkylací. Vzorky jsou štěpeny trypsinem, přečištěny a analyzovány pomocí MS. Jsou odděleny hmotnostním rozdílem specifickým pro rezidua, který odpovídá počtu stabilních izotopových značek, a tedy i počtu značených aminokyselinových zbytků v analytu. Intenzita signálu z lehkých a těžkých vzorků poskytuje kvantitativní srovnání jejich relativních výskytů ve směsi (Ong *et Mann*, 2006).

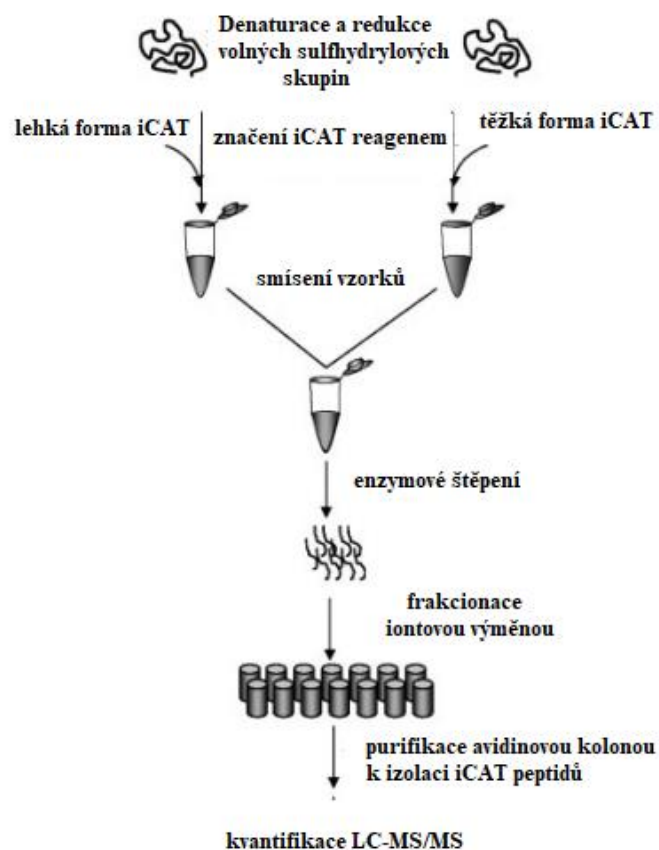
Experiment SILAC (Obr. 10) rozdělujeme na dvě fáze. V adaptační fázi se buňky pěstují paralelně v lehkém nebo těžkém SILAC médiu, aby bylo umožněno úplné začlenění aminokyselin. Kultivace obou typů buněk probíhá za stejných podmínek. Teprve po adaptační fázi jsou obě skupiny buněk rozlišitelné pomocí MS (Ong *et Mann*, 2006). Metoda umožňuje srovnání buněčných proteomů procházejících různými stavy (Chen *et al.*, 2015). V experimentální fázi mohou být například obě buněčné populace diferenciatně ošetřeny, což indukuje změny proteomu. Vzorek se posléze smísí, subproteom může být očištěn frakcionací, štěpen na peptidy a je analyzován pomocí MS k identifikaci a kvantifikaci proteinů (Ong *et Mann*, 2006). Kromě diferenciatního ošetření mohou být buněčné populace vystaveny působení

hypoxii, či teplotnímu stresu (Bousquet *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2018).



Obr. 10: Schéma SILAC experimentu (převzato a upraveno dle Ong *et al.*, 2002). Buňky se zpočátku pěstují paralelně v lehkém nebo těžkém SILAC médiu, poté jsou vzorky smíchány v poměru 1:1 a provádí se štěpení trypsinem. Po štěpení probíhá identifikace proteinů a kvantifikace pomocí LC-MS/MS.

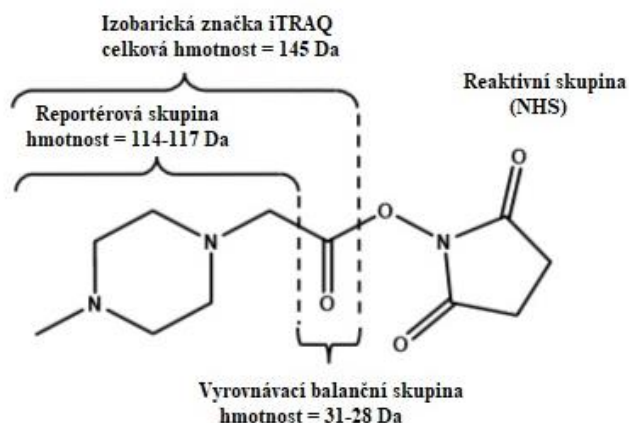
Značení pomocí metody iCAT představili v roce 1999 Aebersold a jeho skupina. Jedná se o metodu využívající izotopově kódované afinitní značky (iCAT; Isotope Coded Affinity Tag) pro relativní kvantifikaci proteinové abundance. Izotopově kódovaná afinitní značka je v rámci této metody připojena k určitým aminokyselinám ve všech proteinech v populaci. Po štěpení proteinu na peptidy jsou označené peptidy afinitně purifikovány nově začleněnou afinitní značkou. Metoda využívá diferenciálního značení cysteinových zbytků v proteinech stabilními izotopy k významnému snížení složitosti proteomu a peptidových směsí, které je třeba identifikovat při jednom jediném tandemovém MS experimentu (Gygi *et al.*, 1999). Původní těžké iCAT reagenty obsahovaly 8 atomů deuteria, lehké obsahovaly vodíky. Kvůli interakcím atomů deuteria se stacionární fázi kolony se od těchto značek upustilo a začaly se využívat iCAT s izotopem ^{12}C pro lehkou a ^{13}C pro těžkou verzi značky (Yi *et al.*, 2005). Principem metody je označení dvou vzorků, jeden z nich je označen lehkou, druhý těžkou variantou izotopové značky (Obr. 11). Značka se kovalentně váže na cysteinové zbytky. Vzorky jsou dále spojeny a štěpeny za pomoci enzymů. Označené fragmenty jsou izolovány avidinovou chromatografií a analyzovány pomocí HPLC/MS (Oda *et al.*, 2002; Colangelo *et Williams*, 2006).



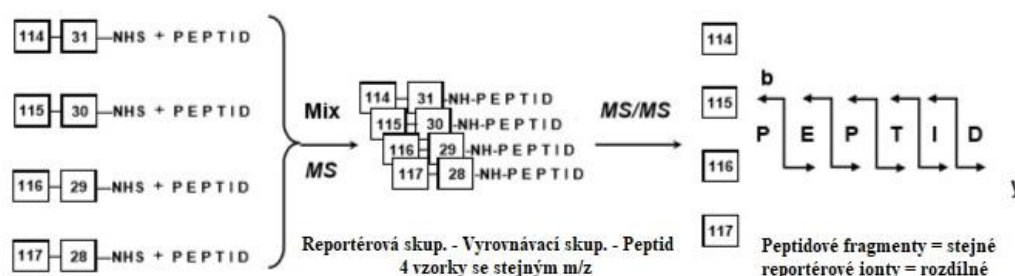
Obr. 11: Schéma experimentu s využitím iCAT značení (převzato a upraveno z Yi *et al.*, 2005). Principem metody je označení dvou vzorků, jeden z nich je označen lehkou, druhý těžkou variantou izotopové značky. Vzorky jsou dále spojeny a štěpeny za pomoci enzymů. Poté probíhá frakcionace iontovou výměnou a purifikace vzorku. Vzorky jsou kvantifikovány pomocí LC-MS/MS

Značení pomocí metody iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification) je přístup založený na derivatizaci primárních aminoskupin v intaktních proteinech za použití izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci. Byl poprvé představen roku 2004 a od té doby se hojně využívá k analýze proteinové exprese v různých variantách buněčných systémů a tkáňových vzorků (Ross *et al.*, 2004, Wiese *et al.*, 2007). Izobarická značka iTRAQ se skládá ze tří částí (Obr. 12). První část tvoří reportérová skupina, druhou částí je vyrovnávací balanční skupina a třetí je reaktivní skupina. Reaktivní skupina se váže na aminoskupinu peptidu, a tím umožňuje označení většiny peptidů ve vzorku, aniž by ztratila informaci o posttranslačních modifikacích proteinů. Metoda umožňuje současně identifikovat a kvantifikovat proteiny ze čtyř až osmi vzorků v jedné analýze díky rozdílné hmotnosti reportérové skupiny (Obr. 13), která se pohybuje v rozmezí 114–117 Da, nebo 113–121 Da (Wiese *et al.*, 2007; Faktor *et al.*, 2012). Místo pro 120 Da reportérovou skupinu je ponecháno prázdné kvůli přítomnosti fenylyalaninového iontu (Johnson *et al.*, 2012). Rozdíly

v hmotnosti jsou dány obohacením skupiny o stabilní isotopy. Hmotnost je kompenzována vyrovnávací skupinou obsahující rovněž stabilní isotopy tak, aby všechny reagenty iTRAQ byly izobarické, tedy aby měly stejnou hmotnost. Pro kvantifikaci metodou iTRAQ musí být použita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Při MS1 mají izobarické značky stejnou hmotnost, rozdíly v hmotnosti reportérové skupiny jsou detekovány až v MS2 (Wiese *et al.*, 2007; Faktor *et. al.*, 2012).



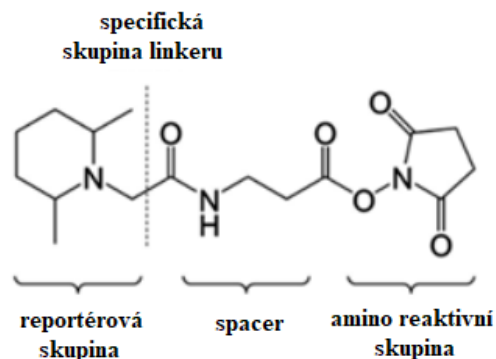
Obr. 12: Struktura iTRAQ značky (převzato a upraveno dle Ross *et al.*, 2004).



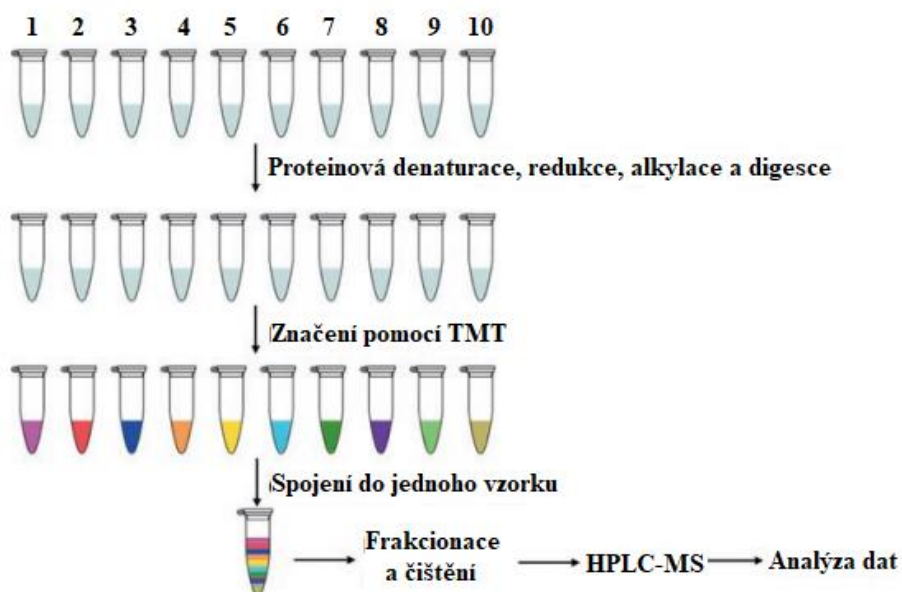
Obr. 13: Schéma skládání iTRAQ značek a jejich fragmentace pomocí MS/MS (převzato a upraveno dle Ross *et al.*, 2004).

Tandemové hmotnostní značky (TMT; Tandem Mass Tag) jsou obdobou iTRAQ značení. Jedná se o chemické štítky používající se pro přesnou kvantifikaci proteinů. Tandem označuje použití tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) pro analýzu těchto značek (Thompson *et al.*, 2003). TMT značka se skládá ze čtyř modulů. Skládá se z reaktivní skupiny, spaceru, reportérové skupiny a specifické skupiny linkeru (Obr. 14). Specifická skupina linkeru zajišťuje odštěpení reportérové skupiny během fragmentace (Vaudel *et al.*, 2010; Zhang *et Elias*, 2017). TMT značky umožňují analýzu až 10 vzorků najednou (Obr. 15). Těchto 10 různých proteinových vzorků je denaturováno, redukováno, alkylováno a štěpeno na peptidové vzorky. Tyto vzorky peptidů jsou značeny pomocí TMT a poté spojeny do jednoho

vzorku. Kombinovaný vzorek se frakcionuje pomocí kapalinové chromatografie. Po přečištění se každý vzorek podrobí HPLC-MS analýze a data se potom analyzují, aby se získala identita a relativní kvantifikace proteinů (Zhang *et Elias*, 2017).



Obr. 14: Struktura tandemové hmotnostní značky (převzato a upraveno dle Zhang *et Elias*, 2017).



Obr. 15: Pracovní postup pro relativní kvantifikaci pomocí značení 10plex TMT (převzato a upraveno dle Zhang *et Elias*, 2017). Deset různých proteinových vzorků je denaturováno, redukováno, alkylováno a štěpeno na peptidové vzorky. Vzorky peptidů jsou pak značeny soupravou 10 různých TMT a poté spojeny do jednoho vzorku. Kombinovaný vzorek podléhá frakcionaci a přečištění a poté je podroben HPLC-MS.

3.1.2.6 Metody absolutní kvantifikace v hmotnostní spektrometrii

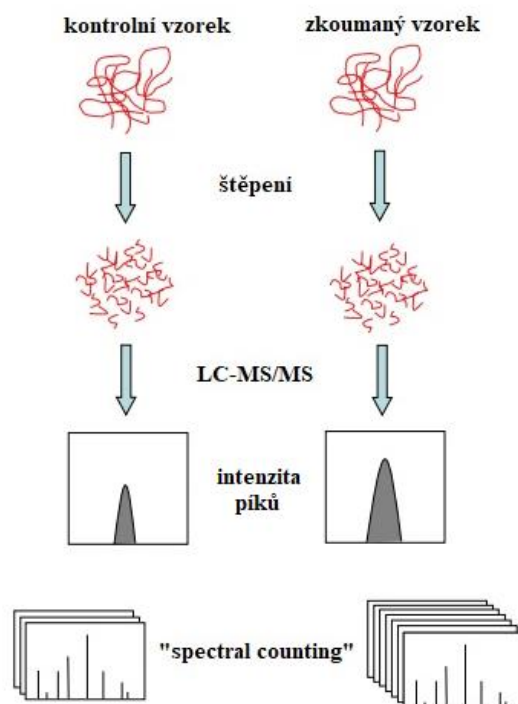
Při absolutní kvantifikaci (AQUA; Absolute Quantification of Proteins) je ke vzorku přidáno známé množství synteticky připravených peptidů značených stabilními izotopy, které

jsou stejné jako nativní peptidy ve vzorku. Metoda tedy využívá inertní standardy (Gerber *et al.*, 2003). Syntetické AQUA peptidy jsou chemicky a fyzikálně nerozeznatelné od svých endogenních protějšků s ohledem na retenční čas, účinnost ionizace a fragmentační mechanismus (Kettenbach *et al.*, 2011). AQUA peptid přesně napodobuje peptid produkovaný během proteolýzy cílového proteinu kromě toho, že je obohacen o určité stabilní izotopy (Kirkpatrick *et al.*, 2005). Jsou tedy ideálními interními standardy, které mohou být snadno zavedeny do vzorku během, nebo po štěpení proteázou (Kettenbach *et al.*, 2011). Ke vzorku je přidáno známé množství těchto standardů. Na základě známého množství přidaného peptidu AQUA a poměru intenzity obou peptidů lze vypočítat množství endogenního peptidu (Gerber *et al.*, 2003, Kettenbach *et al.*, 2011).

3.1.2.7 Label-free kvantifikace v hmotnostní spektrometrii

Metody založené na izotopovém značení nemusí být vždy pro daný protein vhodné. Alternativou jsou jim label-free metody. Label-free kvantifikace je založena na srovnávací analýze relativního proteinového množství bez využití izotopových značek (Vaudel *et al.*, 2010). Hlavní výhodou label-free kvantifikace je skutečnost, že obvykle není vyžadován další experimentální krok a že srovnávací kvantifikace může být prováděna napříč mnoha vzorky současně (Wong *et al.*, 2009). Využívají se dva přístupy, prvním je relativní kvantifikace, druhým je kvantifikace absolutní.

Relativní kvantifikace je založena na dvou principech měření (Obr. 16). Prvním je měření vrcholové (píkové) intenzity založené na změnách ploch, nebo výšek peptidových vrcholů (píků) v chromatografickém záznamu. Ion je s určitým m/z detekován a zaznamenán s určitou intenzitou v určitém čase. Výška, respektive plocha, píku je poté úměrná koncentraci peptidu ve vzorku (Zhu *et al.*, 2010). Nejdříve jsou tedy MS/MS analýzou identifikovány peptidy proteinového digestu a následně jsou mezi vzorky porovnávány plochy píků jednotlivých peptidů (Bondarenko *et al.*, 2002). Druhým principem je spectral counting, při němž se porovnává počet identifikovaných MS/MS spekter ze stejného proteinu v každé LC-MS/MS analýze (Zhu *et al.*, 2010). Přístup předpokládá, že počet získaných spekter závisí na množství proteinu ve vzorku, protože vyšší abundance proteinu typicky znamená zvýšení počtu proteolytických peptidů a naopak (Silva *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010).



Obr. 16: Label-free kvantifikace (převzato a upraveno dle Zhu *et al.*, 2010). Kontrolní a zkoumaný vzorek jsou podrobeny individuální LC-MS/MS analýze. Kvantifikace je založena na srovnání maximální intenzity stejného peptidu nebo počtu spekter stejného proteinu.

Kromě relativní kvantifikace mohou být použity label-free metody také při stanovení absolutního množství proteinů. Index hojnosti proteinů (PAI; Protein Abundance Index) definovaný jako počet identifikovaných peptidů dělen počtem teoreticky pozorovatelných tryptických peptidů pro každý protein. Tento index byl později převeden na exponenciálně modifikovaný PAI (emPAI). Modifikovaná strategie spectral counting nazývaná absolutní proteinová exprese (APEX; Absolute Protein Expression) slouží k měření absolutní koncentrace proteinu v buňce z poměru mezi množstvím bílkovin a počtu pozorovaných peptidů (Zhu *et al.*, 2010).

3.2 Identifikace molekulárních cílů

Identifikace molekulárních cílů je důležitá pro pochopení mechanismu účinku biologicky aktivních látek. Je nutné osvětlit vazbu léčiva, či kandidáta na léčivo na proteiny, které se účastní biologických procesů v buňce. Pochopení biologických procesů při fyziologických a patologických stavech buňky je nezbytným krokem ve vývoji léčiv (Rylova *et al.*, 2015). V současné době se uznává, že proteomika je slibným nástrojem pro rozvoj potenciálních terapeutických cílů. Odběr vzorků pro proteomickou analýzu je důležitým krokem při objevování terapeutických cílů. Z membránových frakcí získaných z preklinických modelů *in vitro* a *in vivo* a také z klinických vzorků mohou být detekovány molekulární vlastnosti charakteristické pro karcinomové buňky (Abdelmoez *et al.*, 2017). Moderní proteomické

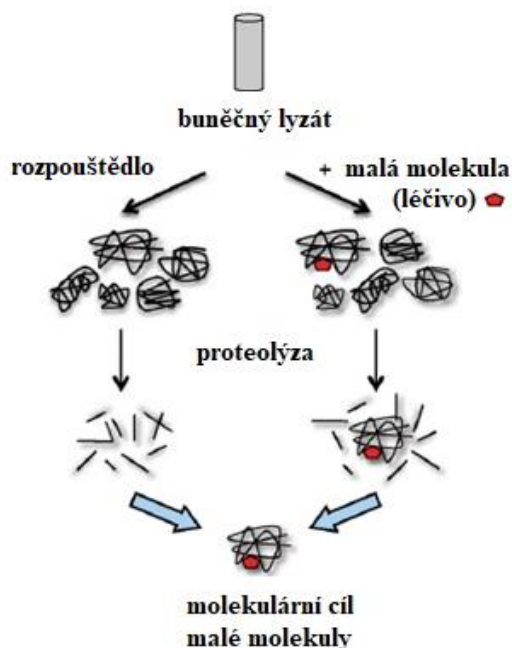
přístupy na bázi hmotnostní spektrometrie umožňují vyhledávat prometastatické proteiny a jejich funkční partnery, uplatňují se při funkční charakterizaci těchto proteinů a validaci směrem k vývoji nových diagnostických a terapeutických přístupů. Tyto proteiny lze vyhledávat pomocí necílených proteomických přístupů porovnávajících proteomy s různým metastatickým potenciálem. Paralelní analýzu většího množství nádorových vzorků zjednodušují metody značení stabilními izotopy. Vysoká citlivost a specificita MS umožňuje identifikovat a kvantifikovat proteiny zapojené do metastatických drah, které by mohly sloužit jako cenné biomarkery (Faktor *et al.*, 2012). V současné době se při objevování nových léků využívají rovněž proteomické techniky založené na afinitě. Důležitými prostředky sloužícími k identifikaci proteinu, či sady proteinů z různých buněčných lyzátů jsou v tomto případě speciálně navržené ligandy (sondy, inhibitory či kandidáti na léčiva). Velmi podstatným a důležitým nástrojem pro identifikaci a kvantifikaci proteinů je i kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Rylova *et al.*, 2015). Identifikace cílového proteinu může být někdy také prováděna bez izolace komplexu léčivo-molekulární cíl, například metodou DARTS. Jedná se o techniku, která je založena na relativní konformační stabilitě proteinu vázaného na volnou a malou molekulu (Lomenick *et al.*, 2011).

Moderní technologie v molekulární biologii poskytují základ pro objevení slibných terapeutických cílů pro nová léčiva ve výzkumu rakoviny. Je zkoumáno stále více molekul, které se mohou stát novými cílenými protinádorovými léčivy. Jakýkoliv potenciální molekulární cíl by proto měl být analyzován z hlediska úlohy při tvorbě karcinomových buněk a při získávání molekulárních vlastností souvisejících s rakovinou, jako je rezistence vůči apoptóze, nekontrolovaná buněčná proliferace, zvýšená migrace buněk, změna buněčné adheze a překonání imunitní reakce. V ideálním případě by cílový kandidát neměl být exprimován v normálních nekancerózních tkáních. Lék by měl být zaměřen pouze na maligní tkáň a terapeutické přístupy by neměly vyvolat závažné vedlejší účinky a toxicitu v normálních tkáních (Abdelmoez *et al.*, 2017).

3.2.1 DARTS

Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) je metoda pro identifikaci a studium interakce protein-ligand (Lomenick *et al.*, 2011b). Jedná se o relativně rychlou a přímou metodu umožňující identifikaci potenciálního proteinového cíle pro malé molekuly (Pai *et al.*, 2015). Tato technika je založena na principu interakce malé molekuly s cílovým proteinem (Obr. 17). Tato interakce stabilizuje strukturu cílového proteinu tak, že se stává odolným vůči proteázám (Lomenick *et al.*, 2011b). Jinými slovy metoda spočívá v poskytnutí ochrany před proteolýzou, kterou propůjčuje malá molekula cílovému proteinu (Pai *et al.*, 2015). Protein se po vazbě na malou molekulu nebo jiný ligand stává termodynamicky stabilizovaným, což vede ke snížené citlivosti cílového proteinu k degradaci proteázami. Tato

snížená proteolýza je specifická pro cílový protein (proteiny) a vyskytuje se u sloučenin s vysokou i nízkou afinitou (Lomenick *et al.* 2009; Lomenick *et al.* 2011b; Pai *et al.*, 2015).



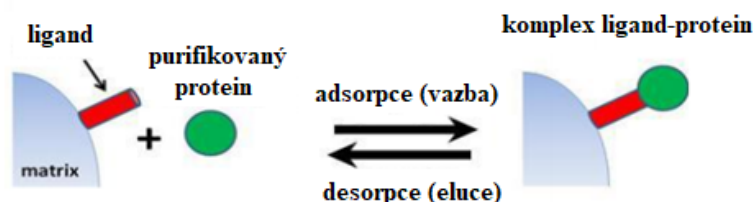
Obr. 17: Schéma metody DARTS. Při DARTS experimentech jsou proteinové vzorky inkubovány se sloučeninou zájmu a ke kontrolnímu vzorku je přidáno pouze rozpouštědlo (příp. neaktivní analog zkoumané sloučeniny). Následujícím krokem je hydrolýza proteázami (proteolýza). Vzorky se pak porovnají (nejčastěji na SDS-PAGE gelu) a v přítomnosti sloučeniny je viditelné snížení proteolýzy. Převzato a upraveno dle Lomenick *et al.*, 2011a.

Metoda DARTS je obzvláště užitečná pro počáteční identifikaci proteinových cílů malých molekul, ale může být také použita pro validaci potenciálních interakcí protein-ligand předpokládaných nebo identifikovaných jinými způsoby a pro odhad afinity interakce. Přístup je jednoduchý a výhodný, protože může být prováděn za použití buněčných lyzátů a dalších komplexních proteinových směsí (bez nutnosti purifikace bílkovin) a používá nemodifikované malé molekuly (Lomenick *et al.*, 2011b). Největší výhodou této metody je možnost využití nativní malé molekuly bez nutnosti imobilizace nebo modifikace, např. začleněním značek biotinu, fluorescenčních, radioizotopových nebo fotoafinitních značek (Pai *et al.*, 2015).

3.2.2 Metoda afinitní purifikace

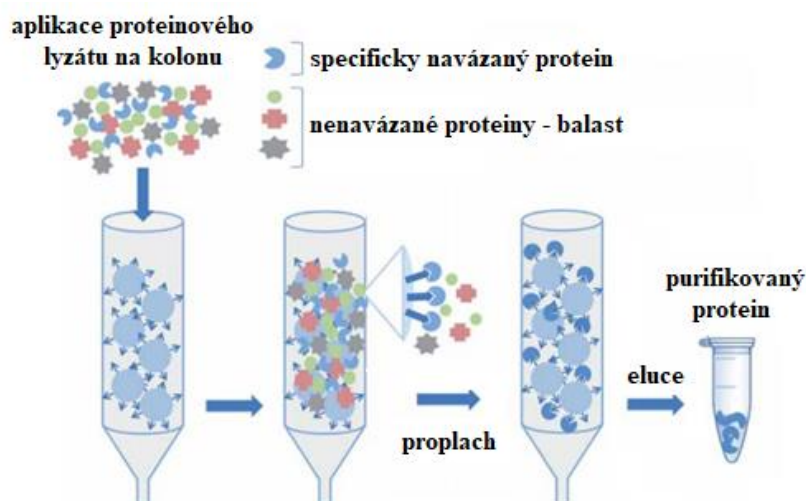
Mezi mnoha strategiemi identifikace molekulárních cílů vyvinutými v průběhu posledních několika desetiletí je také metoda afinitní purifikace. Je jedním z nejdůležitějších a nejsilnějších přístupů, neboť může přímo odhalit fyzikální interakce mezi malými molekulami a jejich biomolekulárními cíli. Vzhledem ke složitosti proteomu a různorodosti interakcí mezi malými molekulami a bílkovinami je však obtížné identifikovat skutečné specifické cíle z nespecifického pozadí (Zheng *et al.*, 2015; Anusha *et al.*, 2018).

Afinitní purifikace (Obr. 18) je technika založená na interakci mezi ligandem (sondou, kandidátem na léčivo, inhibitorem) a proteinem zájmu (cílová molekula). Tato malá cílová molekula je ukotvena na pevnou nerozpustnou matici, která slouží jako nosič (Rylova *et al.*, 2015). Následně probíhá inkubace této matrice s roztokem obsahujícím možné vazebné partnery, např. buněčný lyzát. Biomolekuly ve vzorku, které interagují s ligandem, jsou zachyceny během inkubace. Po inkubaci imobilizovaného ligandu s jeho potenciálním vazebným partnerem (či partnery) dochází k několika cyklům promytí, aby se před elucí proteinů vázaných na matici odstranily nenavázané, či nespecificky navázané biomolekuly (Anusha *et al.*, 2018; Rylova *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015). Zachycené cílové proteiny jsou eluovány puftrem, který narušuje interakci ligandového proteinu. Tyto proteiny jsou analyzovány a identifikovány různými technikami, jako je 1D, nebo 2D gelová elektroforéza, Western blotting a hmotnostní spektrometrie (Rylova *et al.*, 2015).



Obr. 18: Obecný princip afinitní purifikace (převzato a upraveno dle Anusha *et al.*, 2018).

Proces purifikace je výrazně usnadněn, pokud je v experimentu použita afinitní značka. Při afinitní chromatografii je protein přichycen na chromatografickou kolonu prostřednictvím afinitní značky ligandu (Obr. 19). Nenavázané proteiny jsou v promývacím kroku odmyty a čistý protein uvolněn specificky přidáním kompetitivního ligandu, nebo nespecificky změnou pH, iontové síly, či polaroty (Růčková *et al.*, 2014). Příkladem je biotinová značka, která je navázána na biomolekulu a může tak být použita k purifikaci biomolekuly za použití afinity k streptavidinu či avidinu (Anusha *et al.*, 2018). Dalším příkladem je reakce mezi alkynovou a azidovou skupinou (Kolb *et al.*, 2001).



Obr. 19: Schéma afinitní purifikace probíhající na koloně (převzato a upraveno dle Růčková *et al.*, 2014). V prvním kroku je proteinová směs nanesena na kolonu, kde se molekulární cíl specificky a reverzibilně váže na ligandy chromatografické matrice. V další fázi jsou nenavázané proteiny odmyty a cílový protein je uvolněn z komplexu ligand-protein elucí.

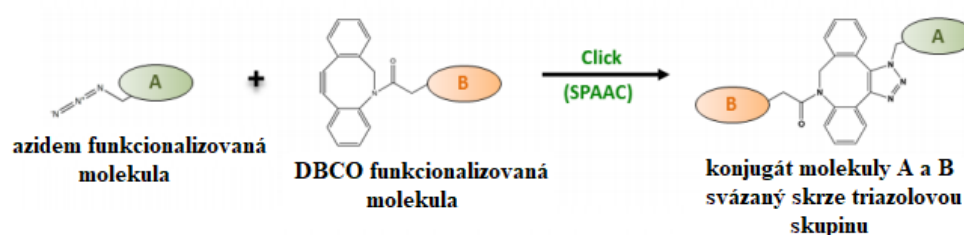
Metoda afinitní purifikace vychází z průkopnických prací ze studia interakcí mezi malými molekulami a proteiny z let 1950-1960 (Zheng *et al.*, 2015). Jako pevný nosič byla prvně při metodě afinitní purifikace použita celulóza (Lerman, 1953). Později byla využívána agaróza a Sepharosové kuličky, které jsou v současné době stále nejvyužívanějšími maticemi. Azidové agaróзовые kuličky jsou vhodné pro kovalentní záchyt terminálního alkyne a biomolekul alkynelem značených (např. konjugát alkyne-trilobolid) prostřednictvím CuAAC reakce, nebo click reakce probíhající bez katalýzy mědi (Punna *et al.*, 2005). Molekulární cíle se poté váží na alkynelem konjugovanou biomolekulu. Azidová agaróza s kovalentně navázanými proteiny bývá promývána (např. PBS s BSA), čímž se částečně odstraní nespecificky vázané proteiny (JenaBioscience, [online], 2019). Své využití při identifikaci molekulárních cílů našly také magnetické kuličky, které bývají používány za účelem zjednodušeného promývání a elučního postupu použitím silného magnetu (Ito *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2012).

3.2.2.1 Click chemie, mědi katalyzovaná azid-alkynová cykloadiční reakce (CuAAC)

Pojem „click chemistry“, tedy „chemie kliknutí“, byla poprvé zmíněna v práci Kolb *et al.*, 2001. Od tohoto roku našla click chemie své využití při objevování nových léků, v materiálovém a biotechnologickém výzkumu (Su *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2013; Evans *et al.*, 2007). Pod pojmem se schovává proces rychlé a selektivní reakce (click; kliknutí) mezi dvojicemi různých funkčních skupin dvou různých molekul za vhodných podmínek. Tyto modulární fúzní reakce sjednocují dva nenasycené reaktanty a poskytují rychlý přístup ke vzniku různých zajímavých pětičlenných a šestičlenných heterocyklů. Obecně lze click reakce

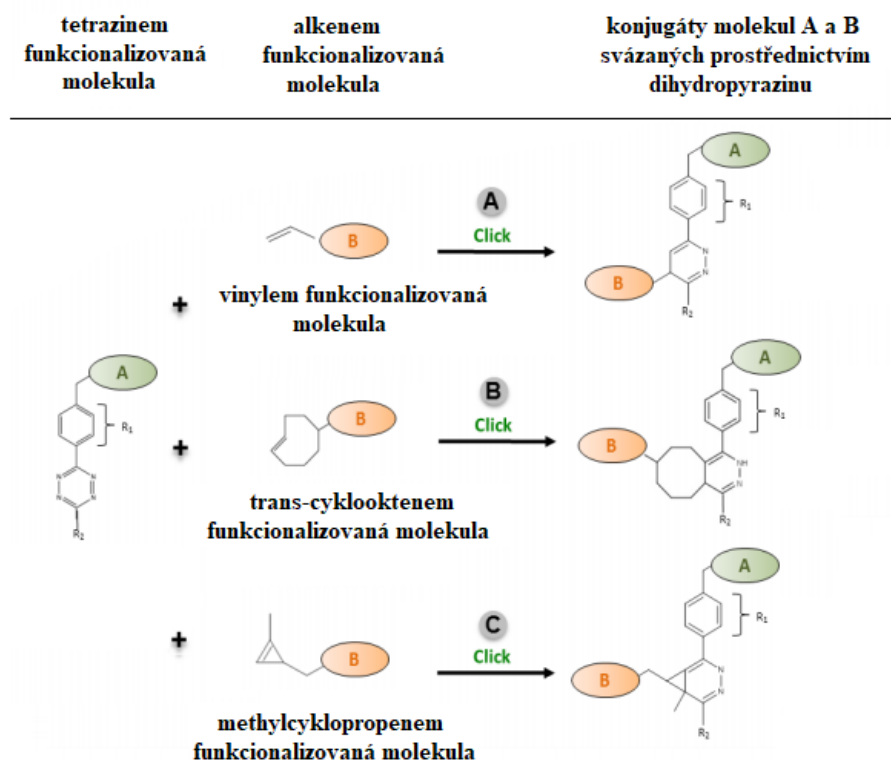
rozdělit do dvou skupin – na mědi katalyzované reakce a na reakce bez účasti mědi. Hojně využívané jsou reakce mezi alkyny a azidy (Kolb *et al.*, 2001).

Mědi katalyzovaná azid-alkynová click reakce (CuAAC; Cu^I-catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry reaction) spoléhá na přítomnost iontů Cu^I, zatímco Strain-promoted Azide-Alkyne Click reakce (SPAAC) probíhá účinně bez katalýzy kovem (Kolb *et al.*, 2001; Jewett *et al.*, 2010). Reakce SPAAC jsou založeny na použití derivátů cyklooktynů, které snižují na rozdíl od terminálních alkynů aktivační energii (Ess *et al.*, 2008; Jena Bioscience [online], 2019). Jedná se o syntézu sloučenin obsahující azidoskupinu s cykloalkyny (Obr. 20) za vzniku stabilních triazolů (Mbua *et al.*, 2011).



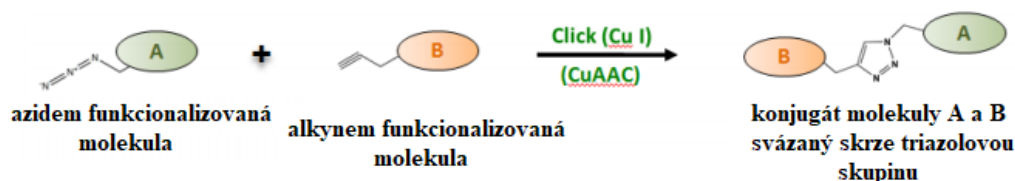
Obr. 20: Princip strain-promoted azid-alkynové click reakce SPAAC (převzato a upraveno dle Jena Bioscience [online], 2019)

Využívanou reakcí je také ligace tetrazinu s alkenem. Jde o velmi rychlou a netoxickou metodu značení, zejména vhodnou pro *in vivo* značení buněk. Tetrazinem funkcionalizovaná molekula reaguje s molekulou funkcionalizovanou alkenem (Obr. 21), čímž se vytvoří stabilní konjugát prostřednictvím dihydropyrazinové skupiny (Rieder *et Luedtke*, 2014; Jena Bioscience [online], 2019).



Obr. 21: Princip ligace tetrazinu s alkenem (převzato a upraveno dle Jena Bioscience [online], 2019). Tetrazinem funkcionální molekula reaguje s molekulou funkcionální alkenem za vzniku konjugátu obou molekul prostřednictvím dihydropyrazinové skupiny. Alkenovou skupinou může být (A) vinyl, (B) trans-cyklookten nebo (C) methylcyklopropen.

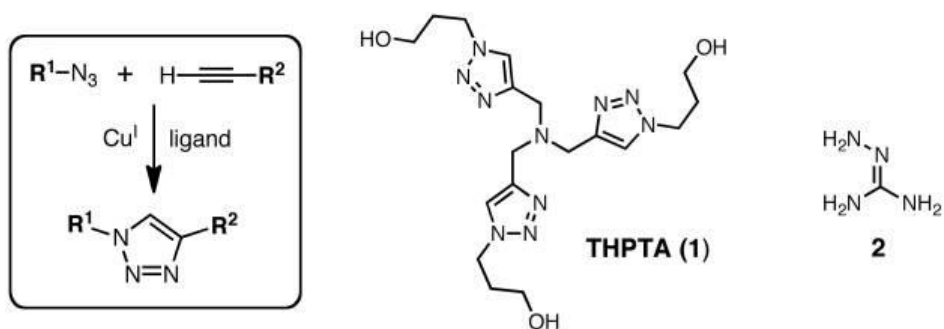
Cu^I-katalyzovaná azid-alkynová cykloadiční reakce je široce používána pro připojení molekulárních entit všech velikostí (Presolski *et al.*, 2011). Reakce probíhá mezi azidem funkcionální molekulou a molekulou funkcionální alkynelem za vzniku konjugátu svázaného triazolovou skupinou (Obr. 22).



Obr. 22: Mědi katalyzovaná azid-alkynová cykloadiční reakce (převzato a upraveno dle Jena Bioscience [online], 2019).

Vzhledem k tomu, že terminální alkyne jsou poměrně nereaktivní vůči azidům, účinnost reakce CuAAC silně závisí na přítomnosti kovového katalyzátoru, kterým je Cu^I. Zdrojem mědi může být sůl CuSO₄ s mědí v oxidačním stavu +2 (Cu^{II}), v tomto případě se však musí použít redukčních činidel, např. askorbátu sodného (Presolski *et al.*, 2011; Stanislav *et al.*, 2009). Použití reakcí CuAAC v živých buňkách je omezeno toxicitou iontů Cu^I. Tento problém je

částečně překonán použitím Cu^I chelatačních ligandů, jako je THPTA (Obr. 23). Tyto ligandy jednak zrychlují reakci CuAAC udržováním oxidačního stavu Cu^I a jednak chrání biomolekuly před oxidačním poškozením. Pokud nejsou ionty mědi řádně vázány chelatačními činidly, mohou podstupovat redoxní a disproportionační reakce a v důsledku toho poté není dodržena potřebná koncentrace Cu^I v roztoku (Presolski *et al.*, 2011).



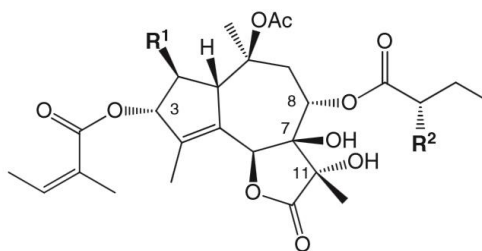
Obr. 23: Schéma obecné CuAAC reakce a strukturální vzorce (1) THPTA jakožto urychlujícího ligandu a (2) aminoguanidinu jakožto aditiva (převzato z Presolski *et al.*, 2011).

Mědi katalyzovaná Huisgenova 1,3-dipolární cykloadiční reakce, která probíhá mezi terminálními alkyny a azidy (CuAAC), je přímou metodou pro získání fluorescenčních trilobolidových (Tb) derivátů (Huisgen, 1961; Jurášek *et al.*, 2014).

3.3 Trilobolid

Trilobolid (Tb) a jeho strukturální analoga jsou seskviterpenovými laktony guaianolidového typu, které jsou široce distribuované v rodinách *Apiaceae* a *Asteraceae* (Holub *et al.*, 1986). Seskviterpenové laktony (SL) jsou aktivními složkami různých rostlin a často se používají jako rostlinná léčiva. V lidských buňkách vykazují tyto sloučeniny řadu biologických aktivit zprostředkovaných různými mechanismy působení, jako je například inhibice vápenatého přenašeče nebo alkylace (Jurášek *et al.*, 2016). Některé guaianolidové seskviterpeny vyvolaly pozornost pro své slibné protizánětlivé, antiinfekční, protinádorové a SERCA-inhibiční vlastnosti. Vzhledem k jejich alkylačním schopnostem jsou však ve většině případů toxické. Nicméně trilobolid a jeho strukturálně příbuzná analoga jsou méně toxické, jelikož díky jejich výjimečnému strukturálnímu uspořádání působí na základě specifických mechanismů (Harmatha *et al.*, 2015).

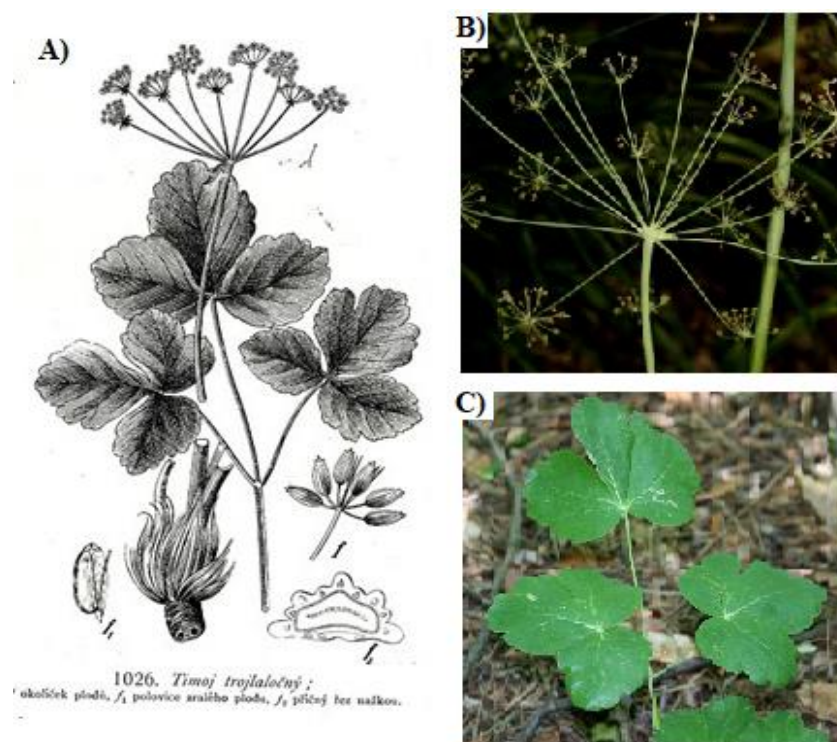
Trilobolid (Obr. 24) je strukturálně příbuzná molekula intenzivně studovaného thapsigarginu (Tg) z *Thapsia garganica L.* O thapsigarginu se z důvodu jeho inhibičního účinku na buněčnou proliferaci uvažuje jako o potenciálním léku pro cílenou léčbu rakoviny. Tg je znám jako silný a selektivní inhibitor Ca^{2+} -ATPázy sarko/endoplazmatického retikula (SERCA; Harmatha *et al.*, 2013; Tomanová *et al.*, 2015, Xu *et al.*, 2004).



1. trilobolide: $R^1 = H$; $R^2 = CH_3$
2. 2-acetoxytrilobolide: $R^1 = OCOCH_3$; $R^2 = CH_3$
3. thapsigargin: $R^1 = O\text{-octanoyl}$; $R^2 = H$

Obr. 24: Chemická struktura (1) trilobolidu (3) thapsigarginu
(převzato z Harmatha *et al.*, 2013).

Tb byl izolovaný z timoje trojlaločného, *Laser trilobum* (L.) Borkh (Harmatha *et al.*, 2013). Timoj trojlaločný je rostlina z čeledi miříkovitých, vysoká přes jeden metr, charakteristická svou lysou a nahoře větvitou lodyhou (Obr. 25). Vybíhající spodní listy se skládají ze tří dlouze řapíkatých lístků. Lístky jsou hluboce trojdílné, nebo trojklanné a jejich úkrojky se podobají listům orlíčku (*Aquilegia*). Proto se ve starších literaturách setkáváme s druhým názvem pro rostlinu – Timoj orlíčkolistý. Rostlina vytváří okolíky skládající se z četných paprsků. Kvítky jsou bílé a rozvíjí se v červnu a červenci. Plodem je podlouhle vejčitá nažka. Po každé polovině plodu se táhne 9 podélných, nitkovitých žeber (Grulich, 1997; Polívka, 1900). Vyskytuje se v horských středoevropských lesích, těžiště rozšíření má tento druh na Balkánském poloostrově. v České republice byla rostlina zatím pozorována jen v Diváckém lese u Hustopečí na jižní Moravě (Grulich, 1997; Botany.cz [online], 2019).



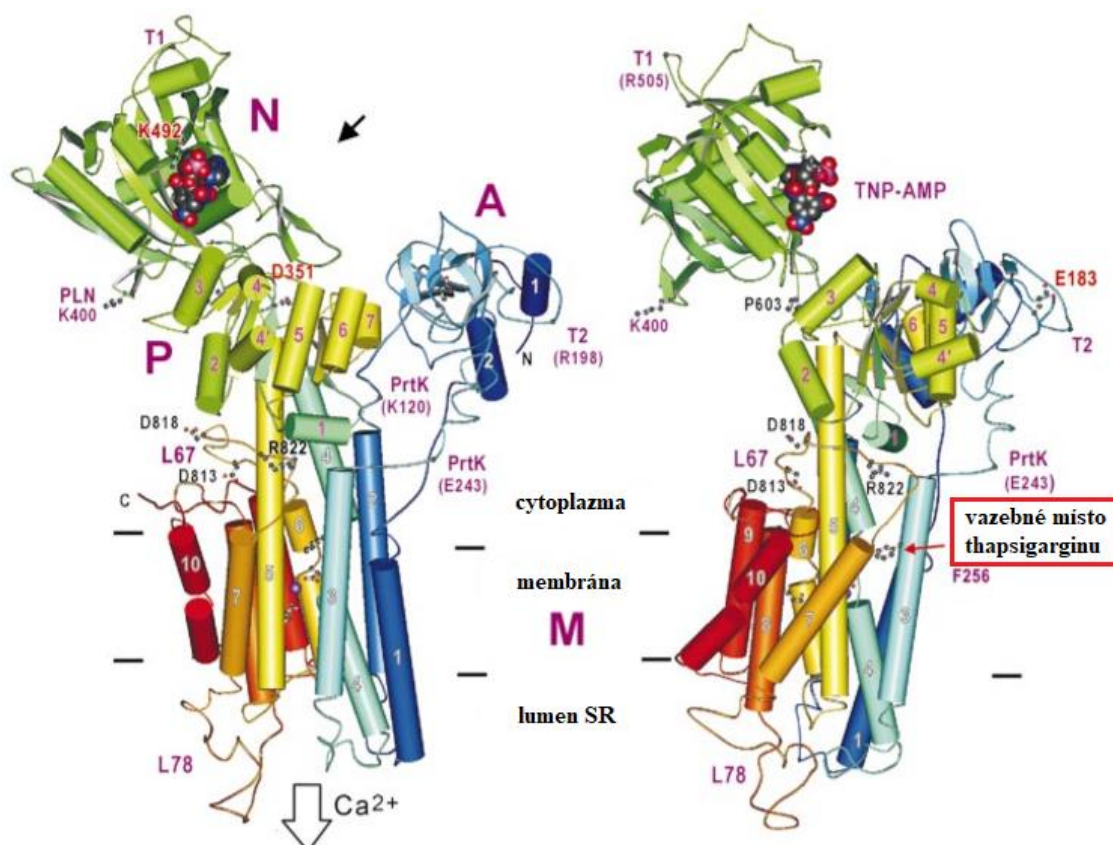
Obr. 25: Timoje trojlaločný (*Laser trilobum*). (A) Kresba timoje trojlaločného *Laser trilobum* (převzato z Polívka, 1900), (B) Květ timoje trojlaločného *Laser trilobum*, (C) Trojdílný list timoje trojlaločného *Laser trilobum* (převzato z Portál české flóry [online], 2019)

Izolace trilobolidu byla provedena nejdříve z kořenů a posléze byla využita méně destruktivní metoda izolace trilobolidu ze semen *Laser trilobum*. Alternativně byla izolace provedena také ze dvou dalších rostlinných zdrojů – z hladýše horského *Laserpitium siler* L. a hladýše andělikového *Laserpitium archangelica* (Harmatha *et al.*, 2013).

Objev pozoruhodných imunologických vlastností Tb a dalších příbuzných seskviterpenových laktonů vzbudil zájem o jejich pozorování. Trilobolid i jeho acetoxy analog jsou silnými aktivátory sekrece cytokinů. Navíc způsobuje trilobolid spolu s thapsigarginem výraznou expresi cytokinu interferonu γ (INF- γ) u makrofágů člověka a potkana. Tyto biologické účinky jsou způsobeny přítomností 7,11-dihydroxyguaianolidového skeletu a fixovaných acylových substituentů v polohách C-3, C-8 a C-10 v obou laktonech (Harmatha *et al.*, 2013). Významná imunostimulační aktivita trilobolidu, konkrétně stimulace sekrece IFN- γ byla dále testována pro možné využití při nádorové terapii (Harmatha *et al.*, 2013).

Dalším velice podstatným rysem těchto látek je inhibice SERCA proteinu (Jurášek *et al.*, 2014). Vazba Tg i Tb na protein SERCA zvyšuje cytosolickou koncentraci vápenatých iontů blokováním schopnosti buňky pumpovat Ca^{2+} do sarko/endoplazmatického retikula. Sekundárně mohou být aktivovány vápenaté kanály plazmatické membrány buňky, které přivádějí další vápenaté ionty do cytosolu. Tímto dojde k mitochondriálnímu poškození a k apoptóze zatím

zcela neobjasněnou kaskádou reakcí (Jurášek *et al.*, 2016; Tomanová *et al.*, 2015). Topografie SERCA vazebného místa pro Tg (Obr. 26) byla popsána v práci Skytte *et al.* z roku 2010 a nachází se mezi M3 a M4 transmembránovým helixem (Toyoshima *et al.*, 2000). Předpokládá se, že Tb interaguje podobným způsobem vzhledem k vysoké strukturální podobnosti s Tg (Jurášek *et al.*, 2014).

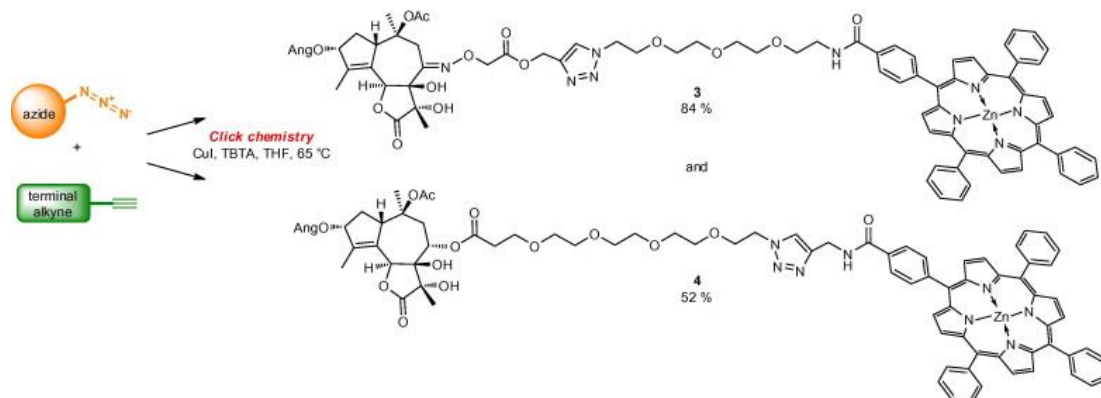


Obr. 26: Pohled na SERCA protein se zvýrazněným místem pro vazbu thapsigarginu (převzato a upraveno dle Toyoshima *et al.*, 2000). Barva se postupně mění z N-konce (modrá) na C-konec (červená). Označeny jsou tři cytoplazmatické domény (A, N a P). Transmembránové šroubovice jsou označeny M1-M10, šroubovice a a P jsou rovněž číslovány. PLN představuje vazebné místo pro fosfolamban, T1 a T2 jsou hlavní místa štěpení pro trypsin a PrtK představuje místa štěpení proteinázy K. Vazebné místo thapsigarginu je zvýrazněno. Šipka specifikuje směr pohledu na obrázek.

Vzhledem k tomu, že protein SERCA je exprimován ve všech tkáních těla, vyvíjejí se cílená proléčiva na bázi Tb a jemu podobných SL (Jurášek *et al.*, 2014). Užitečným se jevil Tb-8-O-azidoalerát, jelikož si zachoval jednak aktivitu Tb, ale navíc obsahoval azidoskupinu užitečnou pro zavedení dalších funkčních skupin pomocí click chemie (CuAAC). Procesem CuAAC lze připravit řadu Tb hybridů, které mohou být testovány a selektovány v rámci

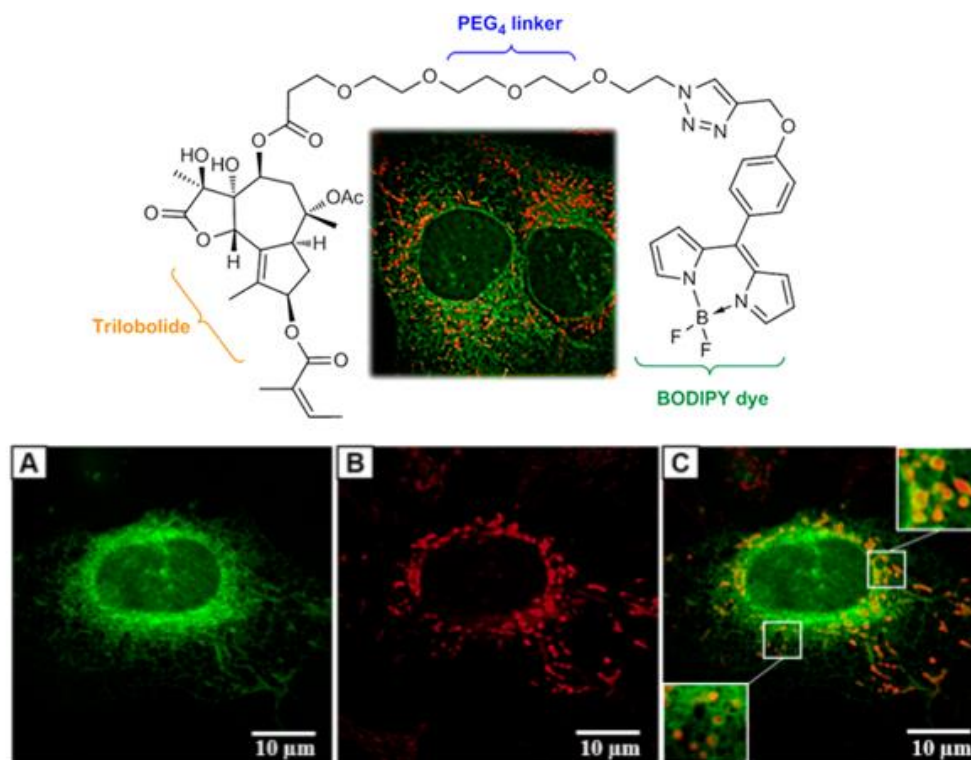
různých rakovinových buněčných linií (Jurášek et al., 2014; Jurášek et al., 2016).

Svůj význam má i syntéza konjugátů Tb-porfyrinu (Obr. 27). Pro syntézu konjugátu Tb-porfyrinu byla využita již výše zmíněná CuAAC. Porfyriny jsou třída přirozeně se vyskytujících sloučenin, které se v posledních desetiletích intenzivně zkoumají kvůli svým jedinečným fotochemickým vlastnostem. (Tomanová *et al.*, 2015). Schopnost porfyrinů pasivně zaměřit nádory *in vivo* umožňuje jejich využití v rakovinové terapii a diagnostice (Swamy *et al.*, 2002). Fotodynamická terapie je neinvazivní terapeutický přístup založený na použití světlocitlivých molekul, fotosenzibilizátorů. Metoda se používá celosvětově k léčbě řady onemocnění včetně rakoviny. Fotofyzikální vlastnosti porfyrinů navíc umožňují vizualizaci lokalizace jejich konjugátů jak *in vitro*, tak *in vivo* (Tomanová *et al.*, 2015). Díky inherentním fluorescenčním vlastnostem porfyrinů mohla být v živých buňkách v reálném čase zkoumána intracelulární lokalizace konjugátů Tb-porfyrinu (Tomanová et al., 2015).



Obr. 27: Syntéza konjugátů Tb-porfyrinu prostřednictvím reakce CuAAC (převzato z Tomanová et al., 2015).

Dále byly navrženy a syntetizovány konjugáty trilobolidu se zeleným fluorescenčním barvivem Bodipy (boron dipyrromethan). Jejich biologický význam byl zkoumán *in vitro* na několika nádorových buněčných liniích. Tb-konjugáty byly lokalizovány v endoplazmatickém retikulu nádorových buněk, což odpovídá skutečnosti, že primární cíl trilobolidu, SERCA, se nachází v endoplazmatickém retikulu eukaryotických buněk. Také bylo prokázáno, že oba navržené konjugáty způsobily fragmentaci mitochondriální sítě obdobným způsobem jako Tb (Obr. 28). Mimo jiné indukovaly také uvolňování oxidu dusnatého jak v buněčných liniích rakoviny, tak v primárních imunitních buňkách. Navíc se potvrdila schopnost Bodipy konjugovaného trilobolidu indukovat sekreci cytokinů v imunitních buňkách. K navázání Bodipy fluorescenčního barviva na konjugát bylo využito linkerů různých délek. Bylo provedeno sledování cytotoxických účinků konjugátu na různých nádorových liniích (Jurášek *et al.*, 2014).



Obr. 28: Konjugát Tb-Bodipy a jeho lokalizace v endoplazmatickém retikulu lidských buněk osteosarkomu U-2 OS (převzato a upraveno dle Jurášek *et al.*, 2014). (A) Fluorescenční obrázky živých buněk endoplazmatického retikula značeného derivátem Tb-Bodipy (v 1 μM koncentraci po 1 h), (B) Mitochondrie barvené červeně vyzařujícím MitoTracker Red FM (v 100 nM koncentraci po 10 min), (C) Sloučení, kde je patrná fragmentace mitochondriální sítě v rozšířených oblastech.

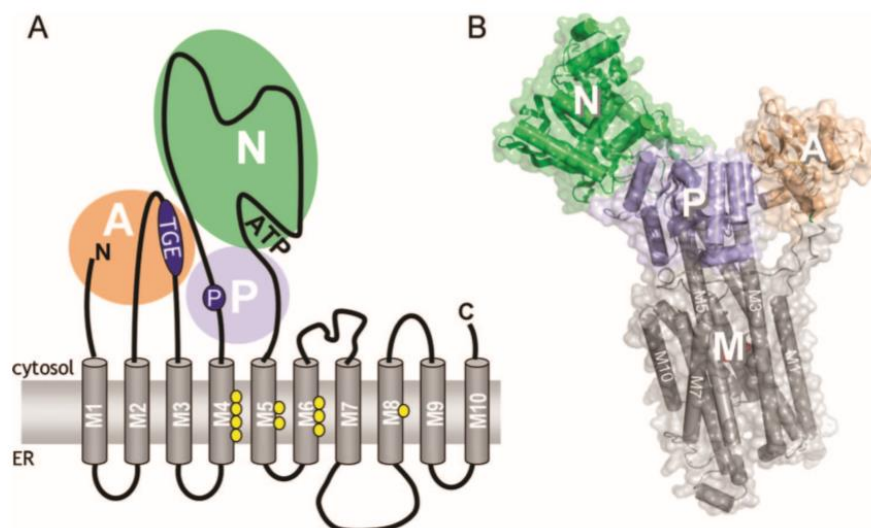
3.4 Protein SERCA

Protein SERCA je ATPázou typu P. ATPázy (adenosin trifosfatázy) typu P jsou třídou membránových čerpadel, které transportují jak monovalentní a divalentní kationty, tak těžké kovy a lipidy napříč membránami s využitím energie z hydrolýzy ATP. (Møller *et al.*, 1996; Primeau, 2018). Řadíme mezi ně Na^+/K^+ -ATPázy, H^+ -ATPázy, K^+ -ATPázy a Ca^{2+} -ATPázy (Periasamy *et Kalyanasundaram*, 2007). První identifikovanou ATPázou P-typu se stala roku 1957 sodíková pumpa (Skou, 1957). U většiny těchto membránových čerpadel zůstávají mechanismus transportu a fyziologická role neznámý (Primeau, 2018).

Třída tvořená vápenatými čerpadly je označena P_2 a je zastoupena u obratlovců rodinami SERCA, SPCA a PMCA (Axelsen *et Palgren*, 1996). Tyto tři subtypy čerpadel jsou fylogeneticky odlišné a označují se dle jejich subcelulárních lokalizací, PCMA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase) se nachází na plazmatické membráně, SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) na sarko/endoplazmatickém retikulu a SPCA (Secretory Pathway Ca^{2+} -ATPase) na vezikulech z Golgiho aparátu (Vangheluwe *et al.*, 2009).

SERCA je protein o velikosti 110 kDa (Periasamy *et* Kalyanasundaram, 2007). Je to proteinová pumpa, která dopravuje ionty vápníku z cytoplazmy do sarko/endoplazmatického retikula (SR) a v cytosolu tak udržuje nízkou hladinu vápníku (Primeau, 2018). V roce 2000 Chikashi Toyoshima spolu s kolegy jako první popsali krystalovou strukturu SERCA proteinu s navázanými ionty vápníku (Toyoshima *et al.*, 2000). Vápník hraje klíčovou roli ve většině buněčných procesů. Tyto procesy jsou regulovány změnou množství cytosolového Ca^{2+} , která je způsobená aktivací cesty influxu, nebo efluxu Ca^{2+} přes buněčnou membránu. Endoplazmatické retikulum (ER) je dynamická intracelulární organela s mnoha funkcemi nezbytnými pro buněčnou homeostázu, vývoj a stresovou odezvu (Bravo *et al.*, 2013). Endoplazmatické retikulum je obecně dominantním intracelulárním úložištěm Ca^{2+} . Je důležité také pro jeho uvolňování, je odpovědné za rychlý přenos Ca^{2+} z periferie do středu buněk a pro lokální signalizaci Ca^{2+} (Kinjo *et* Schnetkamp, 2013). Sarkoplazmatické retikulum (SR) je intracelulární membranózní síť, analogická endoplazmatickému retikulu, nalezená ve svalových buňkách. Slouží k zahájení svalové kontrakce uvolněním vápníku přes ryanodinové receptory do cytosolu a usnadňuje svalovou relaxaci aktivním zpětným vychytáváním SERCA proteinem. SERCA má dvojí funkci, v první řadě způsobuje svalovou relaxaci snížením cytosolického vápníku a v druhé řadě slouží k obnově zásoby vápníku SR pro svalovou kontrakci (Periasamy *et* Kalyanasundaram, 2007).

SERCA se skládá ze čtyř domén (Obr. 29). Membránová (M) doména SERCA proteinu se skládá z deseti transmembránových helixů (M1-10). Vazebná místa pro Ca^{2+} tvoří čtyři z deseti transmembrán šroubovice (M4, M5, M6 a M8). Velká cytoplazmatická oblast se skládá z pohánějící A-domény (actuator domain), fosforylační P-domény a nukleotid vázající N-domény (Vangheluwe *et al.*, 2009; Toyoshima *et al.*, 2000).

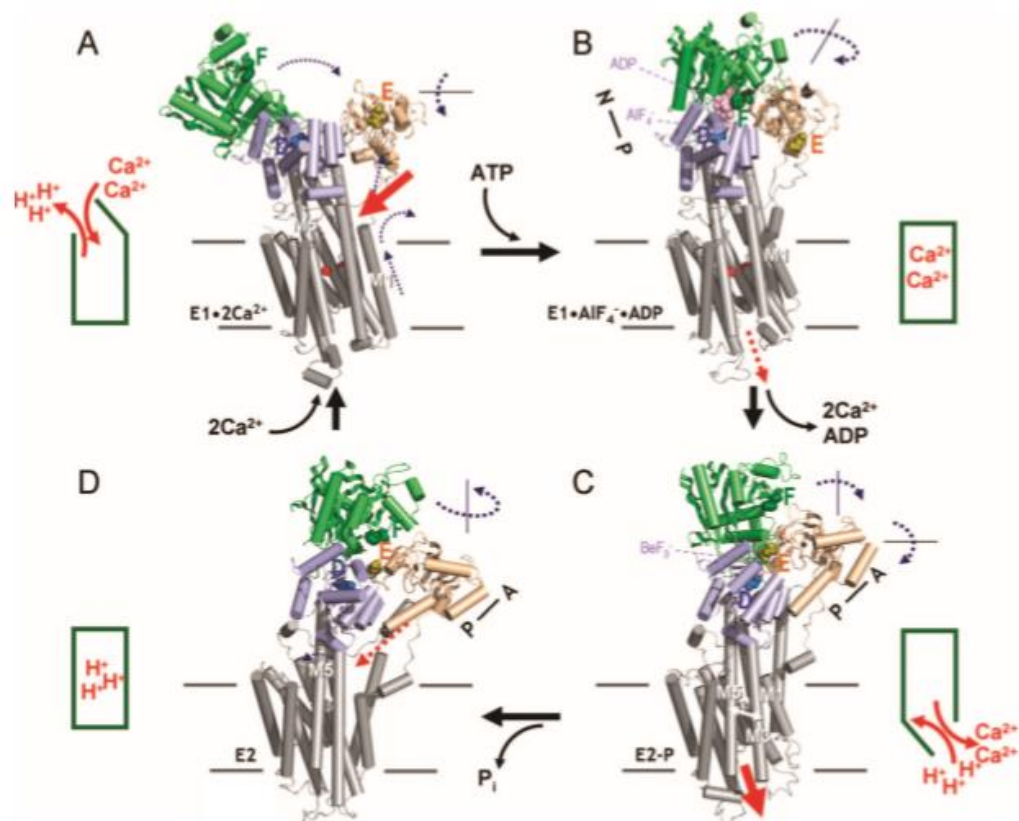


Obr. 29: Architektura SERCA proteinového Ca transportéru (převzato z Vangheluwe *et al.*, 2009). (A) Planární model SERCA1 ukazuje 10 transmembránových helixů (M1-M10) a hlavní cytosolické domény (A, N, P). Aktivační doména (A, světle hnědá), fosforylační doména (P, světle modrá), doména vázající nukleotid (N, zelená) a transmembránová oblast (M, šedá), TGE je defosforylační motiv, žluté kroužky ukazují na přítomnost zbytku vázaného Ca^{2+} . (B) 3D struktura SERCA proteinu, jednotlivé domény jsou vyznačeny stejnou barvou jako v případě (A).

Aktivního transportu Ca^{2+} -ATPázou je dosaženo střídavou afinitou a dostupností transmembránových vazebných míst pro Ca^{2+} za využití energie z hydrolýzy ATP. SERCA se vyskytuje ve dvou hlavních konformacích E1 a E2. Forma E1 je Ca^{2+} -vázaná, forma E2 je Ca^{2+} -volná. Během reakčního cyklu dochází ke konformační změně z formy E1 na volnou formu E2. Ve formě E1 vykazují vazebná místa vysokou afinitu k cytosolickému Ca^{2+} , zatímco ve formě E2 vykazují tato místa afinitu velmi slabou a čelí lumenu. Za každé dva ionty Ca^{2+} transportované z cytosolu do lumenu ER, jsou 2-3 protony přepraveny z lumenu do cytosolu (Vangheluwe *et al.*, 2009).

Konformační změny SERCA proteinu během katalytického cyklu transportu (Obr. 30) popsali Toyoshima a kolektiv. Předpokládaná vstupní cesta pro Ca^{2+} se nachází v blízkosti membránových helixů M1 a M2, odtud vede přímo k místům vázajícím Ca^{2+} . Tato vazebná místa (I a II) pro Ca^{2+} se vyskytují vedle sebe v transmembránové oblasti SERCA (Toyoshima *et al.*, 2000). Místo I je tvořeno postranními kyslíkovými atomy reziduí helixů M5, M6 a M8 a dvěma molekulami vody. Vazba Ca^{2+} v místě I indukuje mírnou rotaci helixu M6. Částečně odvinuté helixy M4 a M6 poskytují prostor pro vazbu Ca^{2+} v místě II (Toyoshima *et al.*, 2008). Konformační změny, které následují po indukci dvou iontů Ca^{2+} do transmembránové oblasti, jsou přenášeny do cytoplazmatických domén, což poskytuje signál umožňující fosforylaci. Tím je zajištěno, že hydrolýza ATP probíhá pouze tehdy, když jsou naloženy ionty, takže je

dosaženo těsného spojení mezi transportem iontů a energetickým výdejem (Jorgensen *et al.*, 2003). Proces fosforylace začíná vazbou adenosinu z ATP na N-doménu. Dochází k ohnutí P-domény a naklonění A-domény. Současně jsou M1 a M2 helixy částečně vytaženy z membrány a amfipatická N-koncová oblast M1 vytváří smyčku. Čerpadlo je tak v okludovaném stavu, což zabraňuje další výměně Ca^{2+} iontů z cytosolu. Jakmile molekula ATP vytvoří křížovou vazbu mezi N- a P-doménami, drží čerpadlo ve vysoce napjatém stavu. Po fosforylaci hydrolyza ATP tuto pevnou asociaci přeruší a N-doména nesoucí ADP se disociuje z P-domény (Toyoshima *et Mizutani*; 2004). To také uvolňuje napjatý stav. Společně s masivní rotací A-domény jsou transmembránové helixy M1-M6 přeskupeny a luminální výstupní cesta pro Ca^{2+} je vytvořena rozšířením M1/M2 a M3/M4 od M5/M6. Rotace M6 a pohyb M4 směrem dolů deformuje místa vazby Ca^{2+} , to redukuje afinitu Ca^{2+} , což umožňuje rychlé uvolnění Ca^{2+} i v pozadí s vysokým obsahem Ca^{2+} v lumenu ER (Olesen *et al.*, 2007). Prázdná Ca^{2+} -vazebná místa jsou okamžitě stabilizována protony a molekulami vody. Defosforylační reakce začíná vstupem jedné molekuly vody do místa fosforylace. Je vyvolána nová rotace domény A, která ovlivňuje luminální bránu přemístěním M1/M2 zpět do membrány (Vangheluwe *et al.*, 2009).



Obr. 30: Konformační změny SERCA proteinu během katalytického cyklu transportu Ca²⁺ (převzato z Vangheluwe *et al.*, 2009). Čtyři základní struktury (A-D) zobrazují hlavní události transportu Ca²⁺. Zelené obdélníky představují sekvenční otevření a uzavření cytoplazmatických a luminálních bran v transmembránové oblasti. (A) Vstup a vazba Ca²⁺. Cytoplazmatická brána je otevřená, což umožňuje výměnu 2-3H za 2 ionty Ca²⁺. Předpokládaná dráha vstupu iontů je označena červenou šipkou. (B) Fosforylace a okluze pumpy. ATP spojuje N- a P-domény. Čerpadlo se stane fosforylovaným, čímž se zablokuje přístup k místům Ca²⁺. Důležitá je zvednutá a zalomená M1 helix, která uzavírá vstupní místo. (C) Uvolnění Ca²⁺, výměna za H⁺. Reorientace A-domény otevírá luminální výstupní cestu pro Ca²⁺ (označeno červenou šipkou). (D) Defosforylace a okluze protonů. Červené šipky označují dráhy pro vstup a výstup Ca²⁺. Čárkované čáry označují události, které je třeba provést, aby dosáhly dalšího kroku cyklu. A-doména je znázorněna oranžově, P-doména je světle modrá, N-doména je zelená a M-doména je šedá. Ca²⁺ ionty jsou zobrazeny jako červené koule.

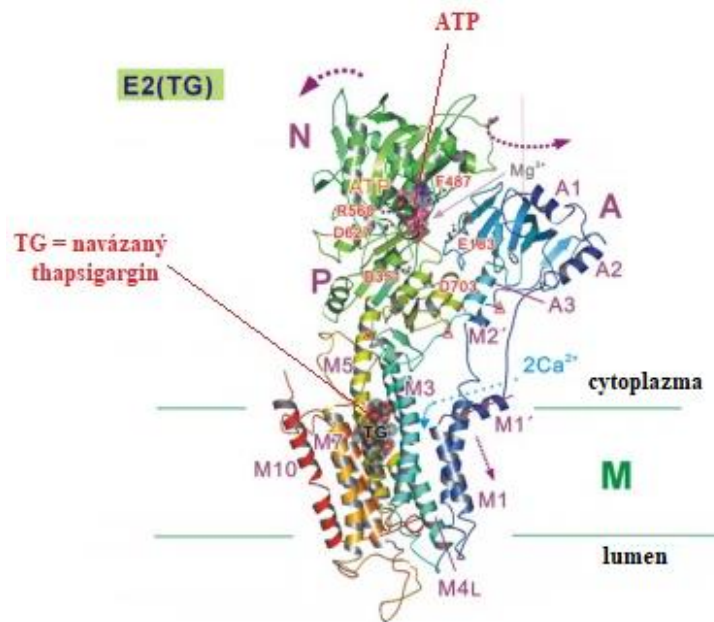
U vyšších obratlovců jsou SERCA proteiny kódovány třemi geny *ATP2A1-3*, které jsou vysoce konzervované, ale jsou lokalizované na různých chromozomech (Axelsen *et* Palgren, 1996; Periasamy *et* Kalyanasundaram, 2007). Tyto geny generují různé izoformy proteinu. Rozmanitost izoform SERCA je dramaticky zvýšena alternativním sestřihem transkriptů, které se vyskytují hlavně na terminálním COOH. Do roku 2014 bylo zjištěno více než 10 různých

izoforem SERCA proteinu – SERCA1a, b, SERCA2a-d, a SERCA3a-f. Izoformy vykazují jak tkáňovou, tak vývojovou specifitu (Axelsen *et al.*, 1996; Hovnanian, 2007; Periasamy *et al.*, 2007; Lipskaia *et al.*, 2014). SERCA1 je exprimován v kosterním svalstvu s rychlým záběrem. Gen pro SERCA2 kóduje dva alternativně sestřižené produkty SERCA2a a SERCA2b. SERCA2a je exprimována v srdečních a pomalých kosterních svalech, SERCA2b v tkáních hladkého svalstva a nesvalových tkáních. SERCA3 je exprimován v širokém spektru svalových a nesvalových tkáních (Tada *et al.*, 1996). Pozoruhodným rysem izoforem SERCA je, že jejich primární struktura je vysoce konzervativní. Protein SERCA2a je přibližně z 84 % identický s proteinem SERCA1a a protein SERCA3 je ze 75 % identický s molekulou SERCA1 nebo SERCA2. Vzhledem k tak vysokému překryvu v primární struktuře se předpokládá, že všechny izoformy SERCA mají v podstatě identické transmembránové topologie a terciární struktury (Periasamy *et al.*, 2007).

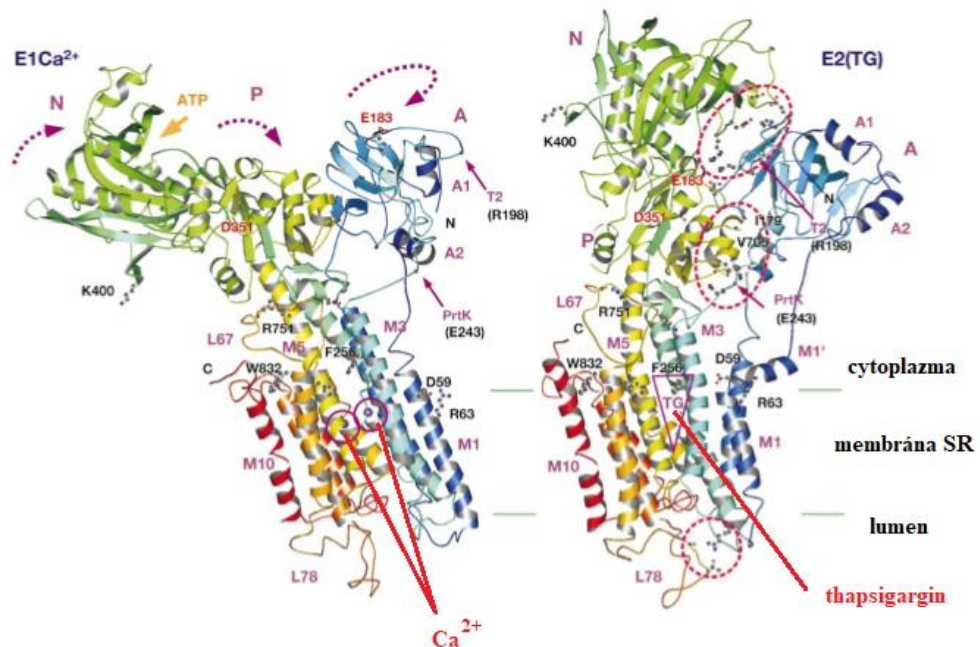
Všechny izoformy SERCA proteinu jsou inhibovány thapsigarginem, seskviterpenovým laktonem odvozeným z rostliny *Thapsia garganica*. Oproti tomu jiné ATPázy typu P na thapsigargin citlivé nejsou. Thapsigargin je z důvodu inhibičního účinku na buněčnou proliferaci považován za potenciální lék pro cílenou léčbu rakoviny (Inesi *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2004). Analogem thapsigarginu je trilobolid, o němž se předpokládá, že interaguje podobným způsobem jako thapsigargin. Předpokládá se, že vazebná místa pro trilobolid a thapsigargin jsou identická z důvodu velmi podobné struktury obou molekul (Jurášek *et al.*, 2014).

Provedené spektroskopické studie, fotolabeling, chimerizace a mutační studie naznačily, že vazebné místo pro Tg leží v blízkosti segmentu M3 na povrchu cytosolické membrány. Vazebné místo pro Tg bylo pak jasně identifikováno Toyoshimou *et al.*, 2002 pomocí difrakčních studií v dutině vymezené transmembránovými helixy M3, M5 a M7 v blízkosti cytosolického povrchu membrány. Velká hydrofobní residua těchto tří helixů vytváří povrch komplementární k thapsigarginu (Xu *et al.*, 2004). Po vazbě thapsigarginu dojde k vytvoření uzavřené konfigurace (Obr. 31 a 32) cytoplazmatických domén a utišení vyvolaných pohybů a tímto procesem je zabráněno úniku vápenatých iontů. Uzavřená konfigurace cytoplazmatických domén zastaví celý reakční cyklus regulovaný samotnými vápenatými ionty (Sagara *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 2004). Na obr. 31 je popsána krystalová struktura Ca²⁺-ATPázy v přítomnosti thapsigarginu, účinného inhibitoru, který enzym fixuje ve formě E2(TG), což je forma analogická E2 (Toyoshima *et al.*, 2002). Na obr. 32 je patrný rozdíl v konformaci SERCA proteinu po vazbě thapsigarginu a po vazbě Ca²⁺. Po vazbě Ca²⁺ dochází k tvorbě otevřené konformace E1Ca²⁺, kdežto po vazbě thapsigarginu se struktura proteinu semkne a vytvoří uzavřenou konformaci E2(TG). Tato konformace je analogická ke konformaci E2, která se vytváří přirozeně po defosforylaci a okluzi protonů během katalytického cyklu transportu Ca²⁺

(Toyoshima *et al.*, 2002; Vangheluwe *et al.*, 2009)



Obr. 31: Analogická forma E2 proteinu SERCA s navázaným thapsigarginem (převzato a upraveno dle Toyoshima *et al.*, 2008). Vazebné místo s navázaným thapsigarginem je zvýrazněno.



Obr. 32: Znázornění rozdílné konformace SERCA proteinu (převzato a upraveno dle Toyoshima *et al.*, 2002) v přítomnosti Ca^{2+} (E1 Ca^{2+} ; struktura uvedena vlevo) a v nepřítomnosti Ca^{2+} avšak s navázaným thapsigarginem (E2(TG); struktura uvedena vpravo).

V průběhu let se ukázalo, že SERCA proteiny hrají významnou roli v homeostáze Ca^{2+} ve všech savčích buňkách a že jejich inhibice může vést k buněčné smrti (Michelangeli *et* East, 2011). Jelikož po vazbě Tg a jeho analog do vazebního místa SERCA proteinu zaujme SERCA konformační stav E2, při němž je blokována ATPázová aktivita i aktivita transportu Ca^{2+} , začal se zkoumat vliv těchto látek na homeostázu Ca^{2+} (Sehgal *et al.*, 2017). Bylo pozorováno, že buňky, které jsou během karcinogeneze transformovány, mají expresi SERCA proteinu sniženou, nebo zvýšenou. Skutečnost, že je exprese SERCA proteinu v některých transformovaných liniích snížena, znamená, že některé rakovinové buňky jsou k apoptóze zprostředkované Ca^{2+} náchylnější. Tento poznatek dal první podnět k vývoji protinádorových léčiv na bázi thapsigarginu a dalších SERCA inhibitorů. Prostřednictvím dráhy zprostředkované Ca^{2+} , která zahrnuje SERCA inhibici, mohou tato protinádorová léčiva vyvolat u rakovinných buněk apoptózu (Michelangeli *et* East, 2011).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro všechny experimenty byla použita adherentní buněčná linie U-2 OS, což je lidská buněčná linie odvozená od osteosarkomu. Buňky byly získány od společnosti ATCC (American Tissue Culture Collection).

4.2 Použité soupravy a chemikálie

Použité chemikálie

- 1,4-dithiotreitol (kat. č.: GE17-1318-01, Sigma-Aldrich, USA)
- 30% roztok akrylamid/bisakrylamid, 29:1 (kat. č.:1610156; Bio-Rad, USA)
- Agarózové kuličky Azid Agarose Beads (kat. č.: CLK-1038-2, Jena Bioscience, Německo)
- Alexa Fluor™ 488 Alkyne, 1 mM (kat. č.: A10267, Life Technologies, USA)
- Aminoguanidin hydrochlorid (kat. č. 396494-25G; Sigma-Aldrich, USA)
- Askorbát sodný (kat. č.: Y0000039, Sigma-Aldrich, USA)
- Azid sodný (kat. č. 822335, Sigma-Aldrich, USA)
- Deoxycholát sodný (kat. č.: 30970-100G; Sigma-Aldrich, USA)
- Difosforečnan tetrasodný (kat. č.: P8010, Sigma-Aldrich, USA)
- Dimethyl sulfoxid (kat. č.: D8418, Sigma-Aldrich, USA)
- Dodecyl síran sodný (kat. č.: 71729-1KG; Sigma-Aldrich, USA)
- Dusičnan stříbrný (kat. č.: 9370.2, Carl Roth, Německo)
- Fenylmethylsulfonylfluorid; PMSF (kat. č. 78830; Sigma-Aldrich, USA)
- Fluorid sodný; NaF (kat. č. S6776; Sigma-Aldrich)
- Formaldehyd, 36% roztok (kat. č.: 47630; Sigma-Aldrich, USA)
- Fosfátový pufr ve formě tablet, pH = 7,4 (PBS, Phosphate Buffered Saline; kat. č.: 79382, Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol for molecular biology (kat. č.: G5516-1L, Sigma Aldrich, USA)
- Glycin (kat. č.: 23390.03; SERVA, Německo)
- Hovězí sérový albumin (BSA – Bovine Serum Albumin, kat. č.: A2153-100G, Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin dialyzovaný ultrafiltrací proti 0,15 M NaCl, sterilní, vhodný pro buněčné linie (kat. č: F0392, Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný p. a. (kat. č.: A171289/01, mikroCHEM, Slovenská republika)
- Inhibitory fosfatáz Phosphatase Inhibitor Cocktail PhosSTOP EASYpack (kat. č.: PHOSS-RO, Roche, Německo)
- Inhibitory proteáz Protease Inhibitor Cocktail (kat. č.: P2714; Sigma-Aldrich)

- Inhibitory proteáz Protease Inhibitor Cocktail cOmplete Tablets EASYpack (kat. č.: 0444190222, Roche, Německo)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, kat. č.: 11278.02, SERVA, Německo)
- Kyselina chlorovodíková, HCl (kat. č.: 10033-A25; Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina octová (kat. č.: 10047-A9B; Lach-Ner, Česká republika)
- L-arginin (kat. č.: A51131-100G; Sigma-Aldrich, USA)
- L-arginin-¹³C₆, hydrochlorid (kat. č.: 642440-100MG, Sigma-Aldrich, USA)
- L-lysin (kat. č.: L5501-25G; Sigma-Aldrich, USA)
- L-lysin-¹³C₆, hydrochlorid (kat. č.: 643459-250MG, Sigma-Aldrich, USA)
- Luminata™ Forte Western HRP Substrát (kat. č.: WBLUF0500, Millipore, USA)
- Magnetické kuličky Azide Magnetic Beads (kat. č.: CLK-1036-1, Jena Bioscience, Německo)
- Marker relativních molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (kat. č.: 26623, ThermoFisher Scientific, Illinois, USA)
- McCoy's Modified Medium
- Methanol (kat. č.: V180044/01, mikroCHEM, Slovenská republika)
- N, N, N', N' – tetramethylethylendiamin (TEMED, kat. č.: 161-0801, Bio-Rad, USA)
- n-butanol (kat. č.: 22120-11000; PENTA s.r.o., Česká republika)
- Nondet™ P 40; (NP-40; kat. č.: 74385-1L; Sigma-Aldrich, USA)
- Persulfát amonný (APS; kat. č.: A3678-100G; Sigma-Aldrich)
- Primární protilátka Anti-SERCA2 ATPase Rabbit Monoclonal Antibody (kat.č.: ab137020, Abcam, Spojené království)
- Pufr pro separační gel (1,5 M Tris, pH=8,8, kat. č.: 161-0798, Bio-Rad, USA)
- Pufr pro zaostřovací gel (0,5 M Tris, pH=6,8, kat. č.: 161-0799, Bio-Rad, USA)
- Sekundární protilátka Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate (kat. č. A-0545; Sigma-Aldrich, USA)
- Síran měďnatý pentahydrát (kat. č.: 25650-31000), Penta s.r.o., Česká republika)
- Thiosíran sodný (kat. č.: 217263, Sigma-Aldrich, USA)
- Trilobolid (poskytnut z VŠCHT)
- Trilobolid-alkyn konjugát (poskytnut VŠCHT)
- Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA, kat. č.: 762342-500MG, Sigma-Aldrich, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris; kat. č.: 37180.05; SERVA, Německo)
- Tris-Glycinový pufr (10×TGS, kat. č.: 1610772, BioRad, USA)
- Trypsin TrypLE™ Express (kat. č.: 12604013, Gibco, Dánsko)
- Tween-20 (kat. č. P2287-500ML; Sigma-Aldrich, USA)

- Uhličitan sodný bezvodý p.a (kat. č.: 30217-AP0Na₂CO₃, Lach-Ner, ČR)
- Vanadičnan trisodný (Na₃VO₄; kat. č.: 450243, Sigma-Aldrich, USA)
- Voda pro MS (Direct-Q 3 Systém, Millipore, Francie)

Příprava roztoků

- 10×PBS pufr (Phosphate Buffered Saline, pH=6,8)
 - 80 g NaCl
 - 2 g KCl
 - 14,4 g Na₂HPO₄ · H₂O
 - 2 g KH₂HPO₄
 - Rozpustit za stálého míchání ve 1000 ml dH₂O, upravit pH, sterilizovat autoklávováním.
- 1×PBS pufr
 - 100 ml 10×PBS pufru doplnit vodou na objem 1000 ml
- 1×PBS s inhibitory
 - 2,23 g sodium pyrofosfát (5 mM)
 - 183,9 mg Na₃VO₄ (1 mM)
 - 210 mg NaF (5 mM)
 - 174,19 mg PMSF (1 mM) – rozpustit v 1 ml methanolu a přidat k PBS)
 - 5 ml inhibitorů proteáz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) – rozpustit v 10 ml sterilní H₂O
 - Vše rozpustit v 1 l 1×PBS
 - pH=7,6 (upravit HCl)
- 10×TBS pufr
 - 24,1 g Tris/1000 l H₂O
 - 80 g NaCl/1000 l H₂O
- 1×TBS/T pufr
 - 100 ml 10×TBS pufru doplnit vodou na 1000 ml
 - 1 ml Tween-20
- 10% APS
- 10% roztok azidu sodného
- Lyzační pufr dle Ong *et al.*, 2012
 - 50 mM Tris pH 7,8
 - 150 mM NaCl
 - 1% NP-40
 - 0,25% deoxycholát sodný
- 10 mM roztok volného Tb v DMSO

- 10 mM roztok Tb-alkyn konjugátu v DMSO
- Koncentrační řada SDS v Tris pufru
 - 0,1% SDS v 10 ml 50 mM Tris, pH=7,8
 - 0,5% SDS v 10 ml 50 mM Tris, pH=7,8
 - 2,5% SDS v 10 ml 50 mM Tris, pH=7,8
- SDS nanášecí pufr (SDS loading buffer)
 - 0,30275 g Tris-HCl (250 mM)
 - 1 g 10% SDS
 - 3 ml 30% glycerolu
 - 0,77125 g DTT (0,5 M)
 - 2 mg 0,02% bromfenolové modři
 - Doplnit na objem 10 ml destilovanou vodou, upravit pH na 6,8
- Anodový pufr I
 - 0,3M Tris (18,15 g/500 ml)
 - H₂O/10% methanol
 - pH=10,4
- Anodový pufr II
 - 25 mM Tris (1,5 g/500 ml)
 - H₂O/10% methanol
 - pH=10,4
- Katodový pufr
 - 25 mM Tris (1,5 g/500 ml)
 - 125 mM glycin (7,1 g/ 500 ml)
 - H₂O/10% methanol
 - pH=9,4
- Blokovací pufr
 - 5% BSA v TBS/T (1 g/20 ml)
- Roztok primární protilátky v blokovacím pufru
 - 5% BSA v TBS/T
 - 0,1% azid sodný (50 µl 10% azidu sodného/5 ml roztoku)
 - Ředění 1/1000 (5 µl/5 ml roztoku)
- Roztok sekundární protilátky blokovacím pufru
 - 5% BSA v TBS/T
 - Ředění 1/10000 (1 µl/10 ml roztoku)

Použité soupravy

- Pierce Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set (ThermoFisher Scientific,

Illinois, USA)

- Pierce BCA Protein Assay Reagent a (ThermoFisher Scientific, Illinois, USA)
- Pierce BCA Protein Assay Reagent B (ThermoFisher Scientific, Illinois, USA)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, USA)
- Centrifuga ROTINA 420R (Hettich Zentrifugen; Německo)
- Mikroskop invertovaný IX51 (Olympus, Česká republika)
- Vodní lázeň Memmert WNB 45 Basic (Memmert GmbH+Co.KG, Německo)
- Inkubátor s příslušenstvím HERACELL 150i (Thermo Scientific, USA)
- Detekční systém pro kvantifikaci exprese proteinů Li-Cor Odyssey Fc Imaging System (Li-Cor Biosciences, USA)
- Digestoř odtahovaná Merci G NextGen (MERCY s.r.o., ČR)
- Digitální sonifikátor Branson 450 Cell Disruptor (Branson Ultrasonics Corporation, USA)
- Dokumentační systém GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, USA)
- Lamilární box (Thermo Scientific, USA)
- Chlazená centrifuga 5810 R (Eppendorf, Německo)
- Inkubátor s integrovanou třepačkou typ (Major Science, USA)
- Laboratorní váhy SBC 21 (Scaltec, USA)
- Magnetická míchačka MSH300 (Biosan, Lotyšsko)
- Mini rotátor RS-24 (Biosan, Lotyšsko)
- Miniaturní nechlazená centrifuga s ocelovým víkem a hliníkovým rotorem MiniSpin (Eppendorf, Německo)
- Multimode Plate Reader EnVision 2105 (Perkin Elmer, USA)
- pH metr UB-10 (Denver Instrument, USA)
- Rotátor SB3 (Stuart, UK)
- Suchý blokový vyhřívaný termostat Bio TDB-100 (Biosan, Lotyšsko)
- Systém produkující čistou vodu Milli-Q (Merck, USA)
- Termoblok ThermoMixer Comfort (Eppendorf, Německo)
- Aparatura pro transferový přenos Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA)
- Třepačka Rocking Shaker SHRK04DG (OHAUS, USA)
- Třepačka Unimax 1010 DT (Heidolph, Německo)
- Třepačka Vortex REAX control (Heidolph, Německo)
- Tube Roller R3010 (Benchmark Scientific Inc., USA)
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex (Maneko, ČR)

- Analyzátor buněčné viability Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA)
- Zdroj stejnosměrného napětí PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Click reakce

Click reakce byla provedena dle Presolski *et al.*, 2011. Do mikrozkušavek byly připraveny zásobní roztoky látek 20 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mM THPTA, 100 mM askorbátu sodného a 100 mM aminoguanidinhydrochloridu.

Do jednotlivých mikrozkušavek byla napipetována reakční směs tvořena 390 μl 1 \times PBS, 2,5 μl $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ smíchaného předem s 5 μl THPTA, dále 25 μl aminoguanidinhydrochloridu a 25 μl askorbátu sodného. Do této reakční směsi bylo přidáno 50 μl azidových kuliček a 2,5 μl konjugátu trilobolidu s alkynem (Tb) o finální koncentraci 5 μM (naředěním 10 mM zásobního roztoku Tb v DMSO). Finální objem jedné reakce činil 500 μl . Takto připravené zkumavky byly umístěny na rotátor a točily se 1 hodinu při 30 otáčkách za minutu.

4.4.2 Měření fluorescence

Bylo provedeno měření vazebné kapacity dvou typů azidových kuliček, agarózových a magnetických, pro potenciální léčivo s alkynovou skupinou. Do dvou neprůhledných zkumavek byla připravena reakční směs pro click reakci dle kapitoly 4.4.1, do jedné zkumavky byly napipetovány agarózové, do druhé magnetické kuličky. Namísto trilobolidu byl do reakční směsi napipetován fluorofor Alexa FluorTM 488 Alkyne o finální koncentraci 5 μM . Tento fluorofor má rovněž, tak jako testované léčivo, alkynovou skupinu, kterou se může vázat na azidové kuličky. Mikrozkušavky s reakční směsí byly umístěny na rotátor. Inkubace na rotátoru probíhala 1 hodinu při 30 otáčkách za minutu. Po inkubaci byly supernatanty odebrány a kuličky byly promyty. Kuličky s navázaným fluoroforem byly rozsuspendovány v 1 \times PBS a byly přeneseny do jamek tmavé mikrotitrační destičky (CellCarrierTM-96). Byla změřena fluorescence na mikrodestičkovém readeru Envision při excitační vlnové délce 480 nm a emisní vlnové délce 520 nm.

4.4.3 Kultivace buněk, SILAC značení

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO_2 . Základním médiem pro tuto buněčnou linii je McCoy's Modified Medium. Pro vytvoření kompletního růstového média se do základního média přidává fetální bovinní sérum (FCS; Fetal Calf Serum) do konečné koncentrace 10 %.

Pokud mají být vzorky analyzovány hmotnostním spektrometrem, je výhodné využít SILAC značení (nebo jiná značení) popsané v kapitole 3.1.2.5. Při SILAC značení buněk se dva

typy buněk kultivují paralelně v samostatných kultivačních lahvích. Do jedné kultivační lahve bylo k buňkám přidáno značené médium, do druhé kultivační lahve bylo buněk se přidáno neznačené médium. Buňky byly před experimentem kultivovány v SILAC médiu po dobu pěti pasáží. Je to doba, za kterou se u izotopicky značené linie kompletně vymění aminokyseliny značené lehkými izotopy za aminokyseliny značené těžkými izotopy.

Pro vytvoření kompletního SILAC růstového média bylo do základního média přidáno fetální bovinní sérum dialyzované ultrafiltrací (konečná koncentrace 10 %) a aminokyseliny lysin a arginin. Neznačené médium bylo připraveno přidáním $^{12}\text{C}_6$ -argininu (44 mg/1000 ml média) a $^{12}\text{C}_6$ -lysinu (38 mg/1000 ml média) do základního média. Značené médium bylo připraveno přidáním $^{13}\text{C}_6$ -argininu (44 mg/1000 ml média) a $^{13}\text{C}_6$ -lysinu do základního média (38 mg/1000 ml média).

Buňky byly poskytnuty laboratoří tkáňových kultur a byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO_2 v McCoy's médiu. Po 3-4 dnech byly buňky pasážovány. Pasážování probíhalo za sterilních podmínek v laminárním boxu. Médium bylo slito do odpadní nádoby, buňky byly dvakrát propláchnuty 1×PBS a poté byl do kultivační lahve přidán trypsin. Buňky s trypsinem byly uloženy na 5 minut do inkubátoru, aby došlo k jejich uvolnění ze dna kultivační lahve. Po uplynutí potřebné doby bylo buňkám přidáno nové médium a po řádném propipetování byla nechána v lahvi pouze násada buněk tak, aby bylo množství buněk zredukováno na desetinu. K násadě bylo doplněno médium a buňky byly vloženy do inkubátoru. Buněčná linie byla testována laboratoří buněčné biologie na přítomnost mykoplazmy pomocí PCR. Výsledek byl negativní.

4.4.4 Příprava buněčných lyzátů, měření koncentrace proteinů

Po úplné inkorporaci těžkých aminokyselin, tzn. alespoň pět pasáží, byly buňky z lahve uvolněny trypsinem, bylo přidáno nové médium a buňky byly spočítány. Pro experiment byly použity buňky ze 3 kultivačních lahví s povrchem 150 cm^2 s ^{12}C kulturou a ze 3 stejných kultivačních lahví s ^{12}C kulturou. Buňky byly centrifugovány 5 minut při 250 g v centrifuze. Médium bylo slito a k peletě buněk bylo přidáno 20 ml 1×PBS, v tomto množství byla peleta rozklepnuta a opět centrifugována 5 minut při 250 g v centrifuze. Stejný proces byl opakován ještě dvakrát. Po poslední centrifugaci byla peleta vysušena invertováním zkumavky a byl k ní přidán vychlazený lyzační pufr dle Ong *et al.*, 2012 (1 ml na 100×10^6). Buňky byly lyzovány po dobu 30 minut na ledu a poté byl lyzát sonikován 1 minutu násuvným sonikátorem. Po sonikaci byl lyzát přenesen do plastové mikrozkušavky a byl centrifugován při 16 000 g a 4 °C po dobu 5 minut. Posléze byl supernatant přenesen do zkumavek a byla změřena koncentrace proteinů.

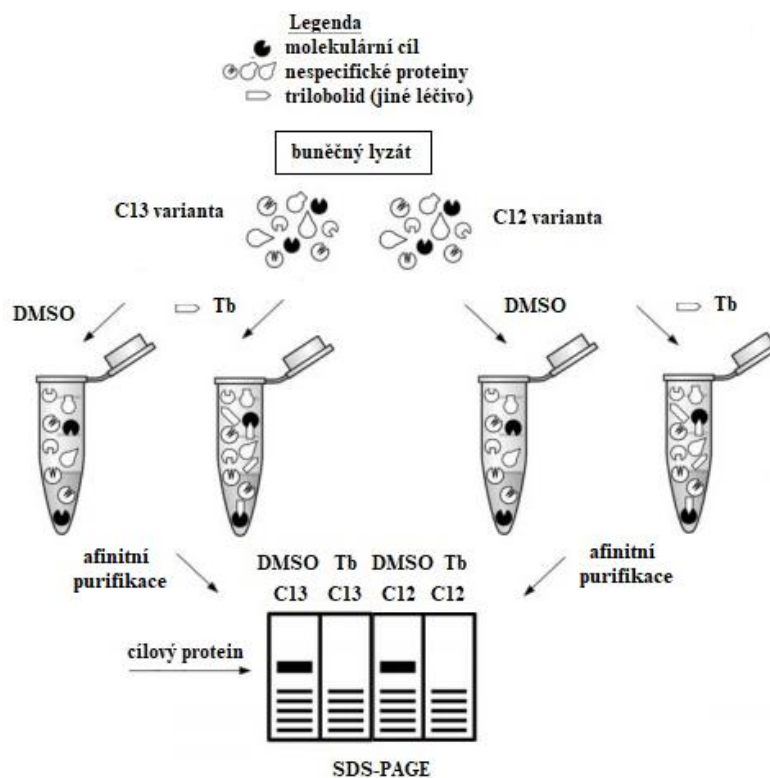
Koncentrace proteinů byla změřena metodou BCA využívající bicinchoniovou kyselinu (Pierce BCA Protein Assay, Reagent a a B). Jako standardy pro koncentrační řadu byly použity komerční standardy hovězího sérového albuminu (Pierce Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set). Standardy byly napipetovány do mikrotitrační destičky v duplikátech, jako slepý vzorek byla použita voda. Buněčné lyzáty byly naředěny 2×, 4× a 8× a také byly napipetovány do destičky, jako blank byl použit lyzační pufr. Reakční směs tvořená Reagentem a a B byla smíchána v poměru 50:1 a do mikrotitrační destičky bylo přidáváno do každé jamky 200 μl této směsi. Destička byla vložena do inkubátoru s integrovanou třepačkou nastaveného na 37 °C, a v něm byla pomalu třepána po dobu 30 minut.

Po 30 minutách byla změřena BCA absorbance při 562 nm na mikrodestičkovém readeru Envision. Z hodnot absorbancí a koncentrací byl sestaven graf a vypočítána koncentrace vzorků. Vzorky byly následně naředěny na požadovanou koncentraci 2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, přičemž výsledný objem lyzátu ředěného LP pufrem činil 100 μl .

Ke 100 μl buněčného lyzátu bylo přidáno 5 μl volného léčiva (Tb) o finální koncentraci 500 μM (naředěním 10 mM zásobního roztoku Tb v DMSO) nebo DMSO (rozpuštědlo) dle Tabulky 1 a Obr. 33. Tyto zkumavky s lyzáty a Tb/DMSO byly hodinu inkubovány na ledu za občasného jemného vortexování.

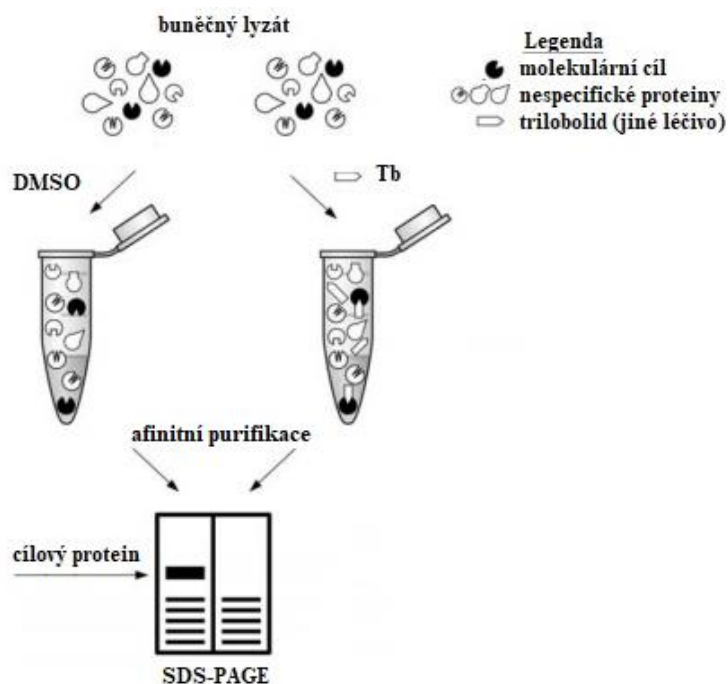
Tabulka 1: Příprava Tb-kompetovaného a nekompetovaného vzorku pro následnou afinitní purifikaci.

Mikrozkumavka č.:	Typ lyzátu	Kompetice
1	^{13}C	není (DMSO)
2	^{13}C	Tb
3	^{12}C	není (DMSO)
4	^{12}C	Tb



Obr. 33: Schéma pracovního postupu při využití SILAC značení (převzato a upraveno dle Rylova et al., 2015). Ke zkumavkám s dvěma variantami buněčných lyzátů (^{12}C a ^{13}C varianta) bylo přidáno buď DMSO, nebo Tb. Vzorky byly dále zpracovány metodou afinitní purifikace (4.4.5) a naneseny na gel.

Protože po vyhodnocení gelů metodou stříbření nebyl předpokládaný rozdíl v intenzitě zbarvení produktu v oblasti výskytu SERCA proteinu u kompetovaného a nekompetovaného vzorku viditelný, bylo kvůli finanční náročnosti upuštěno od SILAC značení (Obr. 34). Pro další optimalizaci experimentů bylo využito základního McCoy's média s 10% bovinním sérovým albuminem. Pro experiment byly použity buňky ze 6 kultivačních lahví s povrchem 150 cm^2 . Tímto došlo k redukování počtu vzorků na polovinu, jelikož z pasážovaných buněk byl vytvořen jediný lyzát, který byl po BCA měření naředěn na koncentraci $2\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a rozdělen do dvou zkumavek, do nichž byl přidán DMSO, nebo Tb.



Obr. 34: Schéma pracovního postupu bez využití SILAC značení (převzato a upraveno dle Rylova et al., 2015). Ke zkumavkám s dvěma variantami buněčných lyzátů (^{12}C a ^{13}C varianta) bylo přidáno buďto DMSO nebo Tb. Vzorky byly dále zpracovány metodou afinitní purifikace (4.4.5) a naneseny na gel.

V rámci optimalizace metody byl prováděn také experiment s větším objemem buněčného lyzátu. Objem lyzátu byl oproti původním 100 μl navýšen na 1000 μl . K lyzátu byl přidán Tb o finální koncentraci 500 μM (naředěním 10 mM zásobního roztoku Tb v DMSO) a v návaznosti na to bylo k lyzátům přidáno také větší množství DMSO, tedy 50 μl oproti původním 5 μl , aby byla zachována stejná koncentrace DMSO v kompetovaném i nekompetovaném vzorku.

4.4.5 Metoda afinitní purifikace

Po proběhnutí click reakce byly mikrozkuhavky s kuličkami centrifugovány na stolní minicentrifuze při maximálních otáčkách po dobu 2 min. Supernatant byl opatrně odebrán a ke kuličkám bylo přidáno 100 μl 1 \times PBS s 0,1% BSA. Mikrozkuhavky byly zvertexovány a centrifugovány při maximálních otáčkách po dobu 2 min. Supernatant byl opět odebrán a proplach byl opakován ještě dvakrát. Ke kuličkám byl přenesen celý objem lyzátu předpřipraveného dle kapitoly 4.4.4. Kuličky byly spolu s lyzátem inkubovány 2 hodiny při 4 $^{\circ}\text{C}$ na minirotátoru RS-24.

Po uplynutí 2 hodin inkubace byly mikrozkuhavky s kuličkami a lyzátem stočeny na stolní minicentrifuze při maximálních otáčkách po dobu 2 minut. Supernatanty byly přeneseny do přichystaných řádně popsaných mikrozkuhavek. K peletám (kuličkám) byl přidáván 50 mM

Tris pufr, pH 7,8 s různými postupně se zvyšujícími koncentracemi SDS. Po prvním odebrání supernatantů bylo ke kuličkám přidáno 40 μ l 50 mM Tris pufru s 0,1% SDS, kuličky byly zvortexovány a stočeny na stolní centrifuze při stejných podmínkách. Supernatanty byly všechny odebrány do dalších mikrozkušavek a ke kuličkám bylo přidáno 40 μ l 50 mM Tris pufru s 0,5% SDS, byly zvortexovány a centrifugovány. Supernatanty byly odebrány a ke kuličkám byly opět propláchnuty, tentokrát 40 μ l 50 mM Tris pufru s 2,5% SDS. Po vortexování a centrifugaci při stejných podmínkách byly opět odebrány supernatanty do přichystaných mikrozkušavek. V posledním kroku bylo k peletám přidáno 40 μ l 5 \times SDS loadovacího pufru a kuličky byly s pufrům povařeny 5 minut při 95 °C. Poté byly zvortexovány a stočeny na stolní centrifuze při maximálních otáčkách po dobu dvou minut. Supernatanty byly odebrány. Ke všem skupinám odebraných supernatantů kromě poslední (obsahuje SDS loading buffer) bylo přidáno 10 μ l SDS loadovacího pufru. Všechny mikrozkušavky se supernatanty byly řádně popsány a uzavřeny. Takto připravené vzorky byly uchovávány při -20 °C a následně použity pro SDS-PAGE.

Z důvodu velkého množství nespecifických proteinů detekovaných v gelu v případě vzorků odebraných ihned po inkubaci s kuličkami byl při optimalizaci metody zařazen ještě jeden proplach 50 mM Tris pufrům s 0,1% SDS. V dalším experimentu byl zařazen také ještě jeden proplach 50 mM Tris pufrům s 0,5% SDS.

4.4.6 SDS-PAGE

Byla sestavena aparatura pro nalití gelu pro SDS-PAGE elektroforézu. Separace byla provedena v 12% polyakrylamidovém separačním gelu a 4% polyakrylamidovém zaostřovacím gelu. Separací gel byl připraven smícháním 6 ml 30% akrylamidu/0,8% bis-akrylamidu; 3,75 ml 1,5M Tris pufru o pH = 8,8; 4,95 ml vody pro MS, 150 μ l 10% SDS; 150 μ l 10% APS a 6 μ l TEMEDu. Separací gel byl nalit mezi 1,5 mm skla do výšky $\frac{3}{4}$ skla a byl přelit tenkou vrstvou butanolu vytřepaného s vodou. Gel byl ponechán 1 h polymerizovat. Po ztuhnutí gelu byl butanol vypláchnut vodou a zbytek vody byl odstraněn bezchlupými ubrousky. Zaostřovací gel byl připraven smísením 1,65 ml 30% akrylamidu/0,8% bis-akrylamidu; 1,25 ml 1,5M Tris pufru o pH = 6,8; 7 ml vody pro MS, 100 μ l 10% SDS; 100 μ l 10% APS a 20 μ l TEMEDu. Zaostřovacím gelem byl převrstven gel separací a mezi skla byl do zaostřovacího gelu umístěn hřebínek. Gel byl ponechán polymerizovat po dobu 30 minut. Po ukončení polymerizace zaostřovacího gelu byla sestavena aparatura pro vertikální SDS-PAGE. Vana byla naplněna 1 \times TGS pufrům připraveného naředěním 10 \times TGS pufru deionizovanou vodou, hřebínek byl vytažen. Vzorky byly před samotným napipetováním 5 minut povařeny při 95 °C. Vzorky byly do jamek gelu nanášeny v množství 25 μ l, marker relativních molekulových hmotností Spectra BR byl na gel nanášen v množství 5 μ l. Po uzavření aparatury byla spuštěna vlastní elektroforetická separace, která probíhala při 100 v přibližně 2 hodiny. Po separaci byla

aparatura rozebrána a gel použit pro western blotting, nebo pro vizualizaci stříbřením.

4.4.7 Stříbření gelu

Použitý postup pro stříbření gelu byl převzat z Shevchenko *et al.*, 1996. Po elektroforetické separaci byl gel fixován ve fixačním roztoku. Ten je tvořen z 50 % methanolem, z 5 % kyselinou octovou a ze 45 % MS vodou. Fixace probíhala 1 hodinu, ale je možno fixovat i přes noc. Po fixaci byl gel 10 minut promýván v 50% methanolu. Následně byl gel promyt třikrát MS vodou po dobu 5 minut. Následně byla provedena senzibilizace v 0,02% roztoku thiosíranu sodného. Gel byl dvakrát opláchnut v MS vodě po dobu 1 minuty, pak ponořen do chlazeného roztoku 0,1% dusičnanu stříbrného a inkubován ve tmě po dobu 15 minut. Po inkubaci byl gel dvakrát promyt MS vodou po dobu 1 minuty a poté se inkubuje 30 minut v 2% roztoku uhličitanu sodného, do kterého byl přidán formaldehyd (0,014% roztok formaldehydu). Po vývoji nažloutlého zbarvení roztoku je možno roztok obměnit. Po vyvinutí intenzivního zbarvení byla vyvíjecí reakce ukončena vyřazením činidla a promytím gelu v 5% roztoku EDTA. Na závěr se gel promývá ještě třikrát 5 minut MS vodou. Gel byl skenován dokumentačním systémem GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Gel lze skladovat v MS vodě při 4 °C.

4.4.8 Western blotting

Na jeden gel bylo připraveno 8 kusů filtračního papíru a 1 PVDF membrána typu Immobilon-PSQ (Merck Millipore) s 0,2 µm póry, vše o velikosti 7×9 cm. Do anodového pufru I byly vloženy 3 kusy filtračního papíru, do anodového pufru II byly vloženy 2 kusy filtračního papíru a do katodového pufru byly vloženy 3 kusy filtračního papíru. Membrána byla aktivována ponořením do 100% methanolu na 15 sekund. Poté byl proveden proplach membrány v deionizované vodě a následně byla provedena 5 minutová ekvilibrace v anodovém pufru II. Gel z SDS-PAGE byl ponořen do katodového pufru. Na blotovací kazetu byly postupně skládány komponenty pro přenos. Na plochu kazety byly nejdříve položeny 3 filtrační papíry z anodového pufru I, na ně 2 filtrační papíry z anodového pufru II, membrána, gel a na gel byly umístěny 3 filtrační papíry z katodového pufru. Po navrstvení všech komponent byl sendvič uhlazen válečkem, aby byly vytlačeny případné bubliny a zamezilo se nekvalitnímu přenosu. Blotovací kazeta byla uzavřena a vložena do transferového systému. Přenos proteinů na membránu probíhal 30 minut při konstantním elektrickém napětí 25 V a limit elektrického proudu byl nastaven na 1 A.

Po 30 minutách transferu byla kazeta vyjmuta z přístroje a otevřena. Membrána byla promyta dvakrát roztokem TBS/T po pěti minutách. Po promytí byla membrána vložena na jednu hodinu do blokovacího roztoku, jednalo se o roztok 5% BSA v TBS/T. Po blokování nespecifických proteinů byla membrána vložena do roztoku s primární protilátkou proti SERCA2 (rabbit monoclonal anti-SERCA2 ATPase antibody; ředění 1:1000). v tomto roztoku

byla membrána ponechána při 4 °C přes noc na roleru.

Následující den byla membrána pětkrát promyta roztokem TBS/T, všechny proplachy probíhaly 5 minut. Promytá membrána se vložila do roztoku s peroxidázou značenou sekundární protilátkou proti králičí primární protilátce (ředění 1:10000) na 1 hodinu a byla takto inkubována při pokojové teplotě za neustálého třepání. Po inkubaci byla třemi pětiminutovými proplachy promyta roztokem TBS/T. Poté se z roztoku vytáhla na detekční podložku a celá plocha membrány byla zakapána detekčním činidlem Luminata Forte Western HRP Substrate a byla ponechána inkubaci ve tmě po dobu 5 minut. Membrána po inkubaci byla vložena do detekčního přístroje Odyssey (Li-Cor), vyfocena a analyzována. Chemiluminiscence produktů křenové peroxidázy byla snímána 10 minut a marker relativních molekulových hmotností byl snímán 30 s při 700 nm.

5 VÝSLEDKY

Cílem práce byla identifikace molekulárních cílů molekul s protinádorovým účinkem. V práci byla zkoumána vazba trilobolidu na protein SERCA2 prostřednictvím afinitní purifikace, následovala separace proteinů vychytených afinitní purifikací metodou SDS-PAGE a pak vizualizace všech proteinů stříbřením gelu, příp. vizualizace SERCA2 proteinu Western blottingem. Experiment byl prováděn na buněčné linii U-2 OS. Linie U-2 OS byla pro experiment vybrána na základě testování exprese SERCA proteinu v různých buněčných liniích prostřednictvím Western blottingu se specifickou protilátkou proti SERCA2. Linie U-2 OS jednak vykazovala expresi a jednak je v laboratoři tkáňových kultur Ústavu molekulární a translační medicíny hojně využívána.

Jednotlivé experimenty afinitní purifikace byly prováděny v několika opakováních. V práci uvádím reprezentativní výsledky.

5.1 Fluorescence agarosových a magnetických kuliček

V prvním kroku bylo provedeno měření vazebné kapacity dvou typů azidových kuliček (agarózových a magnetických) pro potenciální léčivo s alkynovou skupinou pomocí fluoroforu Alexa Fluor™ 488 Alkyne. Tento fluorofor má rovněž jako testované léčivo alkynovou skupinu, kterou se může vázat na azidové kuličky. Byla změřena fluorescence na mikrodestičkovém readeru Envision při excitační vlnové délce 480 nm a emisní vlnové délce 520 nm.

Tabulka 2: Výsledky měření vazebné kapacity dvou typů azidových kuliček pro potenciální léčivo s alkynovou skupinou prostřednictvím měření fluorescence za pomoci fluoroforu Alexa Fluor™ 488 Alkyne.

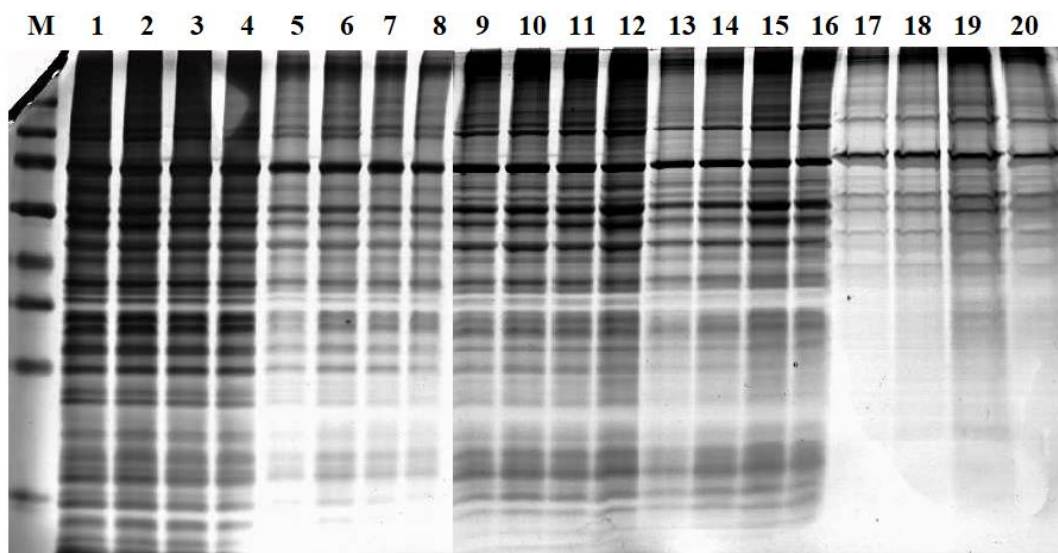
	Fluorescence		Průměr fluorescence	Směrodatná odchylka
Slepý vzorek	73	101	87	14
Magnetické kuličky	130	117	124	7
Magnetické kuličky + Alexa Fluor™ 488 Alkyne	344	408	376	32
Agarózové kuličky	112	117	115	3
Agarózové kuličky + Alexa Fluor™ 488 Alkyne	2666	2358	2512	154

Samotné magnetické a agarózové kuličky vykazovaly téměř stejné hodnoty fluorescence (124±7; 115±3). Ve srovnání se slepým vzorkem je autofluorescence obou typů kuliček minimální. Po navázání fluoroforu se však jejich fluorescence zvýšila. V případě magnetických

kuliček se po navázání fluoroforu zvýšila fluorescence jen minimálně, kdežto v případě agarózových kuliček se zvýšila rapidně. Vzestup hodnot fluorescence u agarózových kuliček byl přibližně dvacetinásobný (ze 115 ± 3 na 2512 ± 154), kdežto u kuliček magnetických jen trojnásobný (ze 124 ± 7 na 376 ± 32). Agarózové kuličky s navázaným fluoroforem tak vykazovaly oproti magnetickým kuličkám s navázaným fluoroforem téměř 7x vyšší fluorescence. To dokazuje, že je jejich vazebná kapacita pro potenciální léčivo oproti magnetickým kuličkám 7x vyšší, a proto byly agarózové kuličky využity pro pokusy v experimentální části mé bakalářské práce.

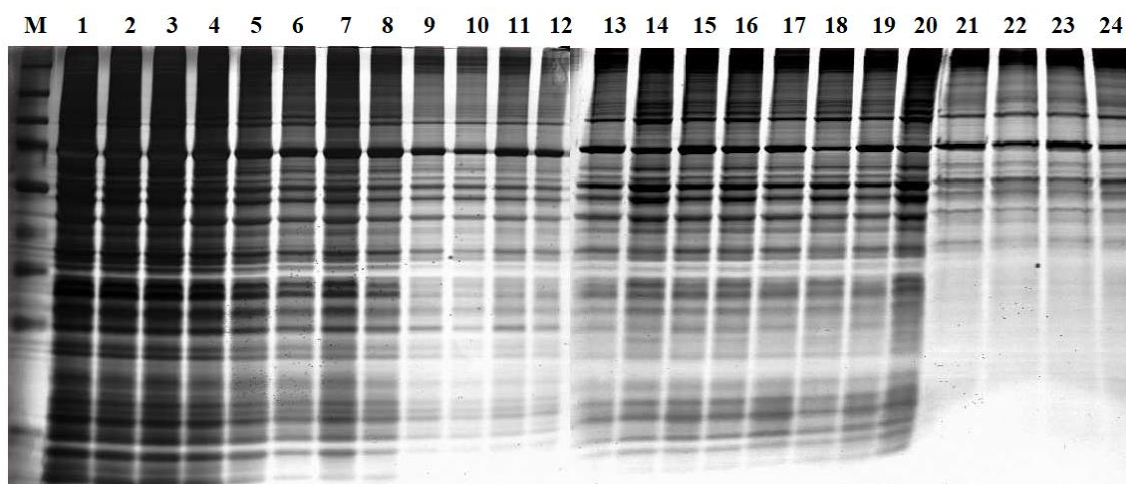
5.2 Detekce proteinů stříbřením

Po prvním experimentu uvedeném v kapitole 4.4.5 nebyly na gelu patrné žádné rozdíly v intenzitě zbarvení produktů mezi kompetovanými a nekompetovanými vzorky. U kompetovaných vzorků byly molekulární cíle obsazeny trilobolidem před vlastní afinitní purifikací, nemělo by docházet k vazbě proteinů na trilobolid imobilizovaný na kuličkách, v těchto vzorcích jsou pozorovány pouze nespecifické proteiny. U nekompetovaných vzorků by mělo dojít k vazbě molekulárních cílů na imobilizovaný trilobolid. Snahou je detekovat proteiny, které se vyskytují pouze v nekompetovaných vzorcích. V prvních jamkách, obsahujících vzorky odebrané ihned po inkubaci s kuličkami, jsou vizualizovány proteiny, které se nenavázaly na kuličky. V dalších jamkách lze pozorovat velké množství nespecifických proteinů (Obr. 35). V rámci optimalizace metody byl proto zaveden další promývací krok 50 mM Tris puforem s 0,1% SDS (Obr. 36).



Obr. 35: Elektroforetogram SILACových kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS po vizualizaci stříbřením. V první pozici umístěn marker relativních molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range.

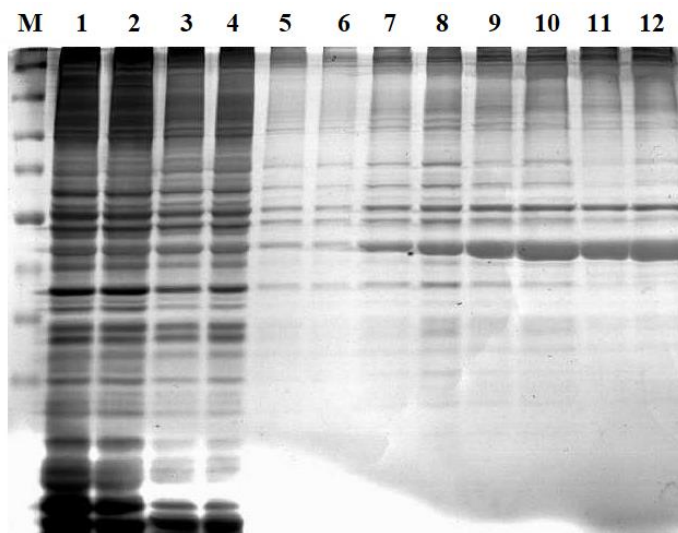
Legenda: (1) ^{13}C lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (2) ^{12}C lyzát + Tb ihned po inkubaci; (3) ^{13}C lyzát + Tb ihned po inkubaci; (4) ^{12}C lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (5) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (6) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (7) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (8) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (9) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (10) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (11) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (12) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (13) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (14) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (15) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (16) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (17) ^{13}C lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem; (18) ^{12}C lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (19) ^{13}C lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (20) ^{12}C lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem



Obr. 36: Elektroforetogram SILACových kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS po vizualizaci stříbřením s druhým proplachem 50 mM Tris s 0,1% SDS. V první pozici umístěn marker relativních molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range.

Legenda: (1) ^{13}C lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (2) ^{12}C lyzát + Tb ihned po inkubaci; (3) ^{13}C lyzát + Tb ihned po inkubaci; (4) ^{12}C lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (5) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (6) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (7) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (8) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (9) ^{13}C lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (10) ^{12}C lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (11) ^{13}C lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (12) ^{12}C lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (13) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (14) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (15) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (16) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (17) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (18) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (19) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (20) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (21) ^{13}C lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem; (22) ^{12}C lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (23) ^{13}C lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (24) ^{12}C lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem

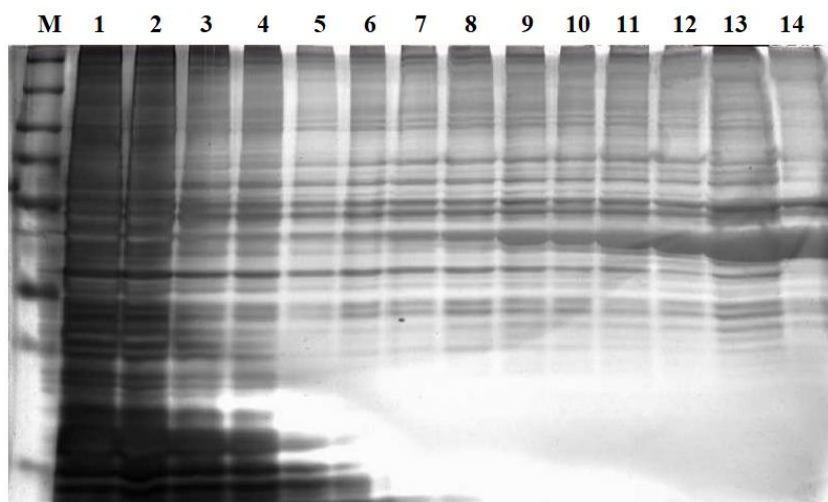
Jelikož nebyly ani po zopakování experimentu patrné rozdíly v oblasti výskytu SERCA proteinu mezi vzorky obsahujícími Tb a obsahujícími DMSO, bylo upuštěno od SILAC značení kvůli finanční náročnosti (Obr. 37). Pro další optimalizaci experimentů bylo využito buněk U-2 OS kultivovaných v základním McCoy's médiu s 10% bovinním sérovým albuminem. Druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS byl zachován.



Obr. 37: Elektroforetogram kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS po vizualizaci stříbřením bez SILAC značení se zachovaným druhým proplachem 50 mM Tris s 0,1% SDS. V první pozici umístěn marker relativních molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range.

Legenda: (1) Lyzát + Tb ihned po inkubaci; (2) Lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (3) Lyzát + Tb první proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (4) Lyzát + DMSO první proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (5) Lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (6) Lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (7) Lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (8) Lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (9) Lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (10) Lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (11) Lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (12) Lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem.

Jelikož bylo při vizualizaci stále detekováno velké množství nespecifických proteinů, byl zaveden další promývací krok 50 mM Tris pufrem s 0,5% SDS (Obr. 38). V rámci optimalizace metody byl prováděn také experiment s větším množstvím buněk. Objem lyzátu byl oproti původním 100 μ l navýšen na 1000 μ l.



Obr. 38: Elektroforetogram kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS po vizualizaci stříbřením s jedním proplachem 50 mM Tris s 0,1% SDS a jedním 50 mM Tris s 0,5% SDS navíc. V první pozici umístěn marker relativních molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range.

Legenda: (1) Lyzát + Tb ihned po inkubaci; (2) Lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (3) Lyzát + Tb první proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (4) Lyzát + DMSO první proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (5) Lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (6) Lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (7) Lyzát + Tb první proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (8) Lyzát + DMSO první proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (9) Lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (10) Lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (11) Lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (12) Lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (13) Lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (14) Lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem.

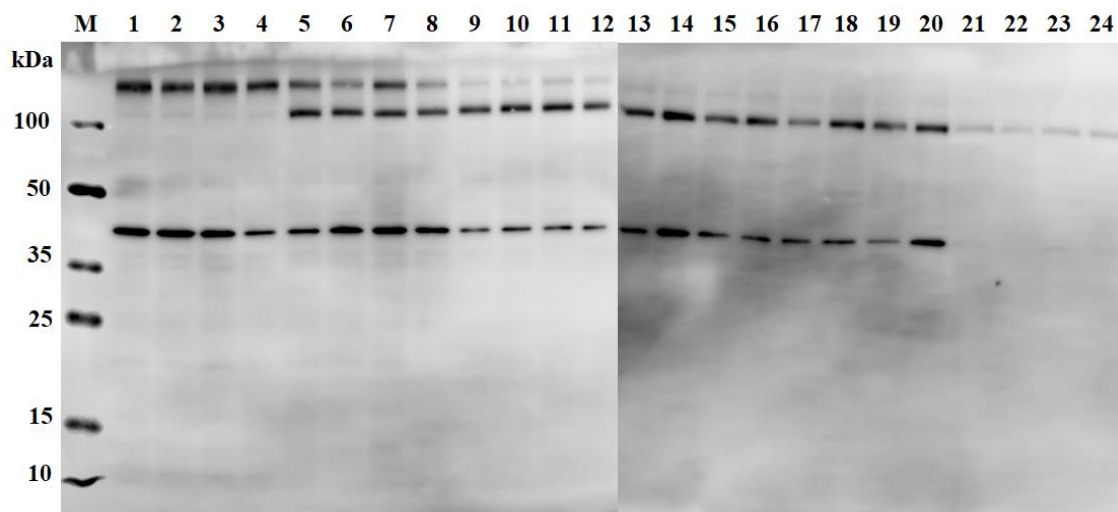
Cílem optimalizace metody bylo zbavit se nespecifických proteinů, a to se mi v rámci mé práce z časových důvodů nepodařilo.

5.3 Detekce proteinů po western blottingu

Pro ověření přítomnosti proteinu SERCA2 ve vzorcích byla provedena analýza Western blottingem se specifickými protilátkami. Analýza Western blottingem byla provedena na všech variantách optimalizace metody, ale v práci jsou uvedeny pouze reprezentativní výsledky (Obr. 39 a Obr. 40). Pro Western blotting byla použita primární králičí protilátka anti-SERCA2 ATPase Rabbit Monoclonal Antibody. Komplex proteinu s primární protilátkou byl detekován peroxidásovým konjugátem Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate.

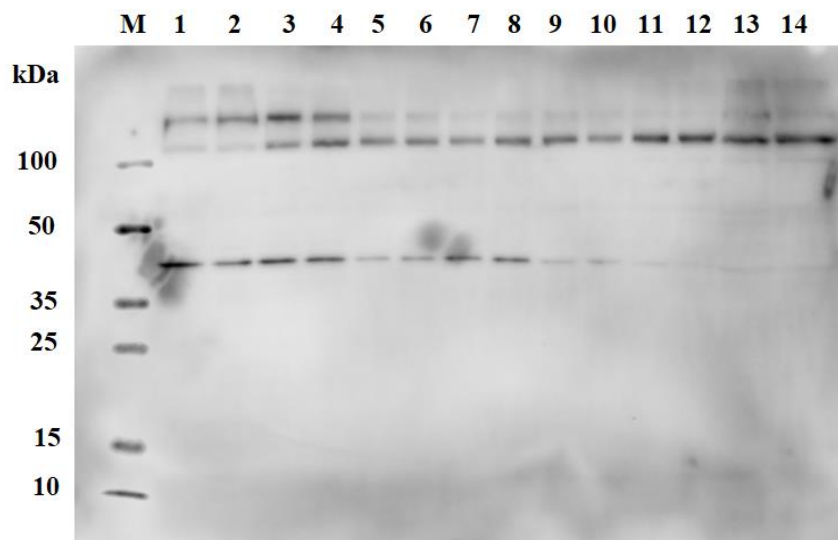
Metoda potvrdila výskyt SERCA (produkt v oblasti 110 kDa) proteinu se stejnou intenzitou mezi kompetovanými a nekompetovanými vzorky. Kromě specifického produktu

SERCA2 byl na membráně patrný také produkt o velikosti 40 kDa. V rámci optimalizace experimentu bylo proto využito kromě inhibitorů fosfatáz a proteáz přítomných v lyzačním pufru dle Ong *et al.* (2012) také 1×PBS s inhibitory proteáz a fosfatáz pro proplach pelety. Po provedení experimentu bylo zjištěno, že inhibitory proteáz a fosfatáz nezabránilly vzniku těchto nespecifických fragmentů. Dle literatury dohledané na základě datasheetu dané protilátky bylo zjištěno, že se jedná o nespecifický produkt protilátky (Abcam [online], 2019).



Obr. 39: Detekce SERCA proteinu na PVDF membráně u SILACových kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS. V první pozici umístěn marker relativních molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range.

Legenda: (1) ^{13}C lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (2) ^{12}C lyzát + Tb ihned po inkubaci; (3) ^{13}C lyzát + Tb ihned po inkubaci; (4) ^{12}C lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (5) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (6) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (7) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (8) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (9) ^{13}C lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (10) ^{12}C lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (11) ^{13}C lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (12) ^{12}C lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (13) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (14) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (15) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (16) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (17) ^{13}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (18) ^{12}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (19) ^{13}C lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (20) ^{12}C lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (21) ^{13}C lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem; (22) ^{12}C lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (23) ^{13}C lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (24) ^{12}C lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem



Obr. 40: Detekce SERCA proteinu na PVDF membráně u kompetovaných (Tb) a nekompetovaných (DMSO) vzorků buněčných lyzátů z buněčné linie U-2 OS bez SILAC značení. V první pozici umístěn marker relativních molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad Range, Tb je trilobolid.

Legenda: (1) Lyzát + Tb ihned po inkubaci; (2) Lyzát + DMSO ihned po inkubaci; (3) Lyzát + Tb první proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (4) Lyzát + DMSO první proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (5) Lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (6) Lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,1% SDS; (7) Lyzát + Tb první proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (8) Lyzát + DMSO první proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (9) Lyzát + Tb druhý proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (10) Lyzát + DMSO druhý proplach 50 mM Tris s 0,5% SDS; (11) Lyzát + Tb proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (12) Lyzát + DMSO proplach 50 mM Tris s 2,5% SDS; (13) Lyzát + Tb s 5x SDS nanášecím pufrem; (14) Lyzát + DMSO s 5x SDS nanášecím pufrem.

6 DISKUZE

Mezi mnoha strategiemi identifikace molekulárních cílů molekul protinádorovým účinkem vyvinutými v průběhu posledních několika desetiletí je metoda afinitní purifikace. Jedná se o techniku založenou na interakci mezi ligandem (sondou, kandidátem na léčivo, inhibitorem) a proteinem zájmu (cílová molekula). Cílová molekula je ukotvena na pevnou nerozpustnou matici, která slouží jako nosič (Rylova *et al.*, 2015).

Prostřednictvím click chemie, konkrétně mědi katalyzované alkyn-azidové cykloadiční reakce, byla provedena vazba konjugátu trilobolidu s alkynovou skupinou na azidové agaróзовé kuličky. Tímto byla připravena matrice pro následnou afinitní purifikaci. Matrice byla inkubována s roztokem obsahujícím možné vazebné partnery. Byl použit buněčný lyzát linie U-2 OS a cílovým proteinem byla sarko/endoplazmatická Ca^{2+} -ATPáza (SERCA). Po inkubaci imobilizovaného substrátového proteinu s jeho potenciálním vazebným partnerem dochází k několika cyklům promytí, aby se před elucí proteinů vázaných na matici odstranily nenavázané biomolekuly. Zachycené cílové proteiny jsou eluovány puftrem, který narušuje interakci ligandového proteinu (Anusha *et al.*, 2018; Rylová *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015). Biomolekuly vzorku, které interagovaly s ligandem, byly během inkubace zachyceny na azidové kuličky a následná eluce byla prováděna 50 mM Tris puftrem s postupně se zvyšujícím obsahem SDS. Analýza molekulárního cíle SERCA proteinu probíhala prostřednictvím SDS-PAGE a poté bylo provedeno stříbření produktů a metoda Western blottingu.

Přes veškeré provedené optimalizace metody afinitní purifikace se však nepodařilo detekovat rozdíly v intenzitě produktů SERCA proteinu mezi kompetovanými a nekompetovanými vzorky, a tím metodou afinitní purifikace prokázat vazbu trilobolidu na SERCA protein. Zřejmě to bylo způsobeno velkým množstvím nespecifických proteinů, které bránily detekci. Jurášek a kolektiv (2014) syntetizoval konjugáty trilobolidu se zeleným fluorescenčním barvivem Bodipy (boron dipyrromethan) a jejich biologický význam zkoumal *in vitro* na několika nádorových buněčných liniích. Tb-konjugáty byly lokalizovány v endoplazmatickém retikulu nádorových buněk, což odpovídá skutečnosti, že primární cíl trilobolidu, SERCA, se nachází v endoplazmatickém retikulu eukaryotických buněk. V rámci experimentu prováděného v mé bakalářské práci byly využity buněčné lyzáty, které obsahují velké množství proteinů. Bohužel, tyto proteiny se ve velké míře vážou nespecificky na agaróзовé kuličky. Pravděpodobně tedy došlo k blokaci vazebného místa azidových agarósových kuliček nespecifickými proteiny, což znemožnilo vazbu molekulárního cíle, nebo splynuly s nespecifickými proteiny, což znemožnilo detekci. Při afinitní purifikaci prováděné v rámci jiných projektů na Ústavu molekulární a translační medicíny bylo prokázáno, že velké množství nespecifických proteinů vážou i magnetické kuličky.

7 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše zaměřená na vědní obor proteomiku, odvětví, přístupy a metody proteomického studia. Dále se rešerše zabývá způsoby identifikace molekulárních cílů molekul s protinádorovým účinkem. Rešerše je také zaměřena na problematiku proteinu SERCA a inhibitoru SERCA proteinu, trilobolidu.

Praktická část práce byla zaměřena na identifikaci molekulárního cíle metodou afinitní purifikace. Vzorky připravené touto metodou byly separovány prostřednictvím SDS-PAGE a výsledné gely byly vizualizovány stříbřením. Stříbření gelů nepotvrdilo rozdíly v intenzitě produktů kompetovaného a nekompetovaného vzorku z důvodu velkého množství navázaných nespecifických proteinů, proto nemohla být provedena analýza molekulárního cíle metodou UHPLC/MS-ESI/LTQ Orbitrap. Pro ověření přítomnosti proteinu SERCA2 ve vzorcích byla použita metoda Western blotting. Byla použita primární králičí protilátka Anti-SERCA2 ATPase Rabbit Monoclonal Antibody. Komplex proteinu s primární protilátkou byl detekován peroxidásovým konjugátem Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate. Metoda nepotvrdila výskyt SERCA proteinu s různou intenzitou produktu mezi kompetovaným a nekompetovaným vzorkem.

8 LITERATURA

Abcam [online katalogový list] [navštíveno 10.4.2019] Dostupné z <https://www.abcam.com/serca2-atpase-antibody-epr9393-ab137020.html?productWallTab=ShowAll>

Abdelmoez, A., Coraca-Huber, D. C., Thurner, G. C., Debbage, P., Lukas, P., Skvortsov, S., Skvortsova, I. (2017). Screening and identification of molecular targets for cancer therapy. *Cancer Letters*, 387, 3-9.

Anusha, Shyamala, Sirisha. (2018). A Overview on Affinity Chromatography: A Review. *Indo American Journal Of Pharmaceutical Reseache*, 8(7), 1462-1472.

Arora, S., Saxena, V., Ayyar, B. V. (2017). Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods*, 116, 84-94.

Asenjo, J. A., Andrews, B. A. (2009). Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operatin conditions. *Journal Of Molecular Recognition*, 22(2), 65-76.

Awad, H., Khamis, M. M., El-Aneed, A. (2015). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 158-175.

Axelsen, K. B., Palmgren, M. G. (1998). Evolution of Substrate Specificities in the P-Type ATPase Superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 46(1), 84-101.

Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), 1017-1031.

Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4-25.

Bird, I. M. (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ*, 299(6702), 783-787.

Bondarenko P. V., Chelius D., Shaler T. A. (2002) Identification and Relative Quantitation of Protein Mixtures by Enzymatic Digestion Followed by Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74, 4741-4749.

Bousquet, P. A., Sandvik, J. A., Arntzen, M., Jeppesen, E. N. F., Christoffersen, S., Kregel, U., et al. (2015). Hypoxia Strongly Affects Mitochondrial Ribosomal Proteins and Translocases, as

Shown by Quantitative Proteomics of HeLa Cells. *International Journal Of Proteomics*, 678527, 1-9.

Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A. E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z. V., Zorzano, A., Hill, J. A., Jaimovich, E., Quest, A. F. G., Lavandero, S. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. *International Review Of Cell And Molecular Biology*, 301, 215-290.

Brown, R. S., Lennon, J. J. (1995). Mass Resolution improvement by incorporation of Pulsed ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry*, 67(13), 1998-2003.

Burkhart, J. M. et Sickmann, A. (2011). Mass-spectrometry-based Proteomics: General Overview and Postranslational Modification Analysis in the Context of Platelet Research. In Á. García et Y. A. Senis, *PLATELET PROTEOMICS: Principles, Analysis and Applications* (pp. 27-57). New Jersey: John Wiley.

Burnette, W. N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195-203.

Burnette, W. N. (2009). Western Blotting: Remembrance of Things Past. *Methods of Molecular Biology*, 1312, 9-12.

Colangelo, C. M., Williams, K. R. (2006). Isotope-Coded Affinity Tags for Protein Quantification. *Methods of Molecular Biology*, 328, 151-158.

Comisarow, M. B., Marshall, A. G. (1974) Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 25, 282-283.

Cuatrecasas, P., Wilchek, M., & Anfinsen, C. B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America.*, 61(2), 636-643.

Cummins, P. M., Rochfort, K. D., O'Connor, B. F. (2017). Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Methods In Molecular Biology*, 1485, 209-233.

Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A., Kraj A. (2009) Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications, pp. 27-102, Wiley J. & sons, Hobokem, New Jersey, USA.

El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy*

Reviews, 44(3), 210-230.

Eliuk, S., Makarov, A. (2015). Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 8(1), 61–80.

Ess, D. H., Jones, G. O. (2008). Transition states of strain-promoted metal-free click chemistry: 1,3-dipolar cycloadditions of phenyl azide and cyclooctynes. *Organic Letters*, 10(8), 1633-1636.

Ewans, R. A. (2007). The Rise of Azide-Alkyne 1,3-Dipolar “Click” Cycloaddition and Its Application to Polymer Science and Surface Modification. *Australian Journal Of Chemistry*, 60(6), 384-395.

Gebauer, P., Boček, P. (1995). Theory of zone separation in isotachopheresis: a diffusional approach. *Electrophoresis*, 16(11), 1999-2007.

Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P. (2003) Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 100, 6940-6945.

Giansanti, P., Tsiatsiani, L., Low, T. Y., Heck, A. J. (2016). Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nature Protocols*, 11(5), 993-1006.

Goldman, A., Harper, S., Speicher, D. W. (2016). Detection of Proteins on Blot Membranes. *Current Protocols In Protein Science*, 86, 10.8.1-10.8.11.

Graves, P. R., Haystead, T. A. J. (2002). Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 39-63.

Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*, 17(10), 994-999.

Haag, A. M. (2016). Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 919, 157-169.

Harmatha, J., Buděšínský, M., Vokáč, K., Kostecká, P., Kmoníčková, E., Zídek, Z. (2013). Trilobolide and related sesquiterpene lactones from *Laser trilobum* possessing immunobiological properties. *Fitoterapia*, 89, 157-166.

Harmatha, J., Vokáč, K., Buděšínský, M., Zídek, Z., Kmoníčková, E. (2015). Immunobiological properties of sesquiterpene lactones obtained by chemically transformed structural modifications of trilobolide. *Fitoterapia*, 107(2015), 90-99.

Hoffmann E. de, Stroobant V. (2007) Mass spectrometry. Principles and Applications, pp. 15-

211, Wiley J. & sons, Chichester, West Sussex, England.

Hoffmann, E. de, Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: Principles and applications* (3rd ed). Hoboken, NJ: J. Wiley.

Holub, M., Buděšínský, M. (1986). Sesquiterpene lactones of the umbelliferae. *Phytochemistry*, 25(9), 2015-2026.

Hong, P., Koza, S., Bouvier, E. S. P. (2012). Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(20), 2923-2950.

Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C., Finn, M. G. (2009). Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angewandte Chemie*, 48(52), 9879-9883.

Hovnanian, A. (2007). SERCA pumps and human diseases. *Subcellular Biochemistry*, 45, 337-363.

Huisgen, R. (1961). Centenary Lecture – 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Proceedings of Chemical Society*, London, 357-396.

Chandramouli, K., Qian, P. Y. (2009). Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity. *Human Genomics And Proteomics*, 2009(1), 1-22.

Chase, H. A. (1994). Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends In Biotechnology*, 12(8), 296-303.

Chen, X., Wei, S., Ji, Y., Guo, X., Yang, F. (2015). Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics*, 15(18), 3175-3192.

Chevalier, F. (2011). What Future for "Gel-based Proteomic" Approaches?. In *Proteomics: Methods, Applications and Limitations: Protein Biochemistry, Synthesis, Structure and Cellular Functions* (pp. 31-45). New York: Nova Science Publishers.

Chevallet, M., Luche, S., Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1(4), 1852-1858.

Chmelík, J. (2005). Proteomický průvodce. *Chemické Listy*, 99, 883-885.

Inesi, G., Sagara, Y. (1994). Specific Inhibitors of Intracellular Ca²⁺ Transport ATPases. *J. Membrane Biology.*, 141(1), 1-6

Ito, T., H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, et al. 2010. Identification of a

primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*, 327(5971) 1345–1350.

Ito, Y., T. Ito, S. Karasawa, T. Enomoto, A. Nashimoto, Y. Hase, et al. 2012. Identification of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs), *PLoS One*, 7(12), e50481

Jena Bioscience [online katalogový list] [navštíveno 27.3.2019] Dostupné z <https://www.jenabioscience.com/click-chemistry/click-reagents-by-chemistry/azide-reagents/azide-agarose/clk-1038-azide-agarose>

Jena Bioscience [online katalogový list] [navštíveno 27.3.2019] Dostupné z <https://www.jenabioscience.com/click-chemistry/click-reagents-by-chemistry/azide-reagents/azide-magnetic-beads/clk-1036-azide-magnetic-beads>

Jena Bioscience [online] [navštíveno 27.3.2019] Dostupné z https://www.jenabioscience.com/images/741d0cd7d0/20140306_Click_Chemistry_Background_information_pdf_creator.pdf

Jewett, J. C., Bertozzi, C. R. (2010). Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chemical Society Reviews*, 39(4), 1272-1279.

Johnson, H., White, F. M. (2012). Toward quantitative phosphotyrosine profiling in vivo. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 23(8), 854-862.

Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O., Karlsh, S. J. (2003). Structure and mechanism of Na/K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annual Review Of Physiology*, 65, 817-849.

Joshi, K., Patil, D. (2017). Proteomics. In B. Patwardhan & R. Chaguturu, *Innovative Approaches in Drug Discovery: Ethnopharmacology, Systems Biology, and Holistic Targeting* (pp. 273-294). Boston: Academic Press.

Jungbauer, A., Hahn, R. (2009). Ion-Exchange Chromatography. *Methods In Enzymology*, 463, 349-371.

Jurášek, M., Džubák, P., Rimpelová, S., Sedlák, D., Gurská, S., Hajdúch, M., et al. (2017). Trilobolide-steroid hybrids: Synthesis, cytotoxic and antimycobacterial activity. *Steroids*, 117, 97-104.

Jurášek, M., Rimpelová, S., Kmoníčková, E., Drašar, P., Ruml, T. (2014). Tailor-Made Fluorescent Trilobolide To Study Its Biological Relevance. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(19), 7947-7954.

Kettenbach, A. N., Rush, J., Gerber, S. (2011). Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides. *Nature*

Protocols, 6(2), 175-186.

Kinjo TG, Schnetkamp PPM. Ca²⁺ Chemistry, Storage and Transport in Biologic Systems: An Overview. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5959/>

Kirkpatrick, D. S., Gerber, S. A., Gygi, S. P. (2005). The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods*, 35(3), 265-273.

Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11), 2005-2021

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lerman L., *Nature*, Lond. 172, 635 (1953).

Lomenick, B., Hao, R., Jonal, N., Chin, R. M., Aghajan, M., Warburton, S., Wang, J., Wu, R.P., Gomez, F., Loo, J.A., Wohlschlegel, J.A., Vondriska, T.M., Pelletier, J., Herschman, H.R., Clardy, J., Clarke, C.F., Huang, J. (2009). Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *PNAS*, 106(51), 21984-21989.

Lomenick, B., Jung, G., Wohlschlegel, J. A., Huang, J. (2011b). Target Identification Using Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS). *Current Protocols In Chemical Biology*, 3(4), 163-180.

Lomenick, B., Olsen, R. W., Huang, J. (2011a). Identification of Direct Protein Targets of Small Molecules. *ACS Chemical Biology*, 6(1), 34-46.

Ma, W., Jia, J., Huang, X., Xie, W., Zhang, X., Tang, J., et al. (2018). Stable isotope labelling by amino acids in cell culture (SILAC) applied to quantitative proteomics of *Edwardsiella tarda* ATCC 15947 under prolonged cold stress. *Microbial Pathogenesis*, 125, 12-19.

MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods*, 61(2), 171-177.

Maire, M. le, Ghazi, A., Møller, J. V., Aggerbeck, L. P. (1987). The use of gel chromatography for the determination of sizes and relative molecular masses of proteins. Interpretation of calibration curves in terms of gel-pore-size distribution. *Biochemical Journal.*, 243(2), 399-404.

Makarov, A. (2000). Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*, 72(6), 1156-1162.

- Mansfield, M. A. (1995). Rapid immunodetection on polyvinylidene fluoride membrane blots without blocking. *Analytical Biochemistry*, 229(1), 140-143.
- Mbua, N. E., Guo, J., Wolfert, M. A., Steet, R. (2011). Strain-Promoted Alkyne–Azide Cycloadditions (SPAAC) Reveal New Features of Glycoconjugate Biosynthesis. *ChemBiochem: A European Journal Of Chemical Biology*, 12(12), 1912-1921.
- Medhe, S. (2018a). Ionization Techniques in Mass Spectrometry: A Review. *Mass Spectrometry & Purification Techniques*, 4(1), 1-6.
- Medhe, S. (2018b). Mass Spectrometry: Detectors Review. *Annual Review Of Chemical And Biomolecular Engineering*, 3(4), 51-58.
- Meyers, C. L. (2001). Column Chromatography. *Current Protocols In Nucleid Acid Chemistry*, 3(1), A.3E.1-7.
- Michelangeli, F., East, J. M. (2011). A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochemical Society Transactions*, 39(3), 789-97.
- Møller, J. V., Juul, B., Le Maire, M. (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimimica et Biophysisa Acta*, 1286(1), 1-51.
- Monteoliva, L., Albar, J. P. (2004). Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 3(3), 220-239.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (2003). CHROMATOGRAPHY | High-performance Liquid Chromatography. *Encyclopedia Of Food Sciences And Nutrition*, 1274-1280.
- Mozdzanowski, J., Hembach, P., Speicher, D. W. (1992). High yield electroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes from polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 13(1-2), 59-64.
- Nagy, K., Vékey, K. (2008). Separation methods. *Medical Applications Of Mass Spectrometry*, 61-92.
- Nikolaev, E. N., Kostyukevich, Y. I., Vladimirov, G. N. (2016). Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FI-ICR) Mass Spectrometry: Theory and Simulations. *Mass Spectrometry Reviews*, 35(2), 219-258.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007-4021.
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D., Chait, B. T. (1999). Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of*

Science of the United State of America, 96(12), 6591-6596.

Oda, Y., Owa, T., Sato, T., Boucher, B., Daniels, S., Yamanaka, H., Shinohara, Y. (2003). Quantitative chemical proteomics for identifying candidate drug targets. *Analytical Chemistry*, 75(9), 2159-2165.

Olesen, C., Picard, M., Winther, A. M., Gyruup, C., Morth, J. P., Oxvig, C., et al. (2007). The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature*, 450(7172), 1036-1042.

Olsen, J. V., Ong, S. E., Mann, M. (2004). Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(6), 608-614.

Ong SE, Li X, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA (2012) Identifying cellular targets of small-molecule probes and drugs with biochemical enrichment and SILAC. *Methods of Molecular Biology*, 803, 129-40.

Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002). Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(5), 376-386.

Ong, S. E., Kratchmarova, I., Mann, M. (2003). Properties of ¹³C-Substituted Arginine in Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). *Journal Of Proteome Research*, 2(2), 173-181.

Ong, S. E., Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nature Protocols*, 1(6), 2650-2660.

Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis: Background and theory. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 121, 321-349.

Pai, M. Y., Lomenick, B., Hwang, H., Schiestl, R., McBride, W., Loo, J. A., Huang, J. (2015). Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) for Small-Molecule Target Identification. *Methods of Molecular Biology*, 1263, 287-298.

Parker, C. E., Warren, M. R., Mocanu, V. (2010). Mass Spectrometry for Proteomics. In O. Alzate, *Neuroproteomics*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group.

Paul, W., Steinwedel, H. S. (1960) Apparatus for separating charged particles of different specific charged. US Patent, 2939952.

Periasamy, M., Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & Nerve*, 35(4), 430-442.

Pitt-Rivers, R., Impiombato, F. S. (1968). The binding of sodium dodecyl sulphate to various

proteins. *Biochemical Journal*, 109(5), 825-830.

Pól, J., Strohalm, M., Havlíček, V., Volný, M., 2010. Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research. *Histochemistry and Cell Biology* 134, 423– 443.

Polívka, F. (1900). In F. Polívka, *Názorná květena zemí koruny české obsahující též čelnější rostliny cizozemské, pěstované u nás pro užitek a okrasu: Svazek 2: Rostliny prostoplátečné (Choripetalae)* (p. 673). Olomouc: Nákladem R. Prombergera.

Presolski, S. I., Hong, V. P., Finn, M. G. (2011). Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Current Protocols In Chemical Biology*, 3(4), 153-162.

Primeau J.O., Armanious G.P., Fisher M.E., Young H.S. (2018) The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. In: Harris J., Boekema E. (eds) *Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Subcellular Biochemistry*, 87. Springer, Singapore

Punna, S., Kaltgrad, E., Finn, M. G. (2005). “Clickable” Agarose for Affinity Chromatography. *Bioconjugate Chemistry*, 16(6), 1536-1541.

Rekhi, H., Rani, S., Sharma, N., Malik, A. K. (2017). A review on recent applications of high performance liquid chromatography in metal determination and speciation analysis. *Critical Review In Analytical Chemistry*, 47(6), 524-537.

Resing, K. A., Ahn, N. G. (2005). Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Letters*, 579(4), 885-889.

Rieder, U., Luedtke, N. W. (2014). Alkene–Tetrazine Ligation for Imaging Cellular DNA. *Angewandte Chemie*, 53(35), 9168-9172.

Righetti, P. G., Candiano, G. (2011). Recent advances in electrophoretic techniques for the characterization of protein biomolecules: A poker of aces. *Journals Of Chromatography*, 1218(49), 8727-8737.

Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., et al. (2004). Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine Reactive Isobaric Tagging Reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(12), 1154-1169.

Růčková, E., Müller, P., Vojtěšek, B. (2014). Protein expression and purification. *Klinická Onkologie*, 27(1), 92-97.

Rylova, G., Ozdian, T., Varanasi, L., Soral, M., Hlavac, J., Holub, D., et al. (2015). Affinity-Based Methods in Drug-Target Discovery. *Current Drug Targets*, 16(1), 60-76.

Sagara, Y., Fernandez-Belza, F., de Meis, L., Inesi, G. (1992). Characterization of the inhibition

of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *The Journal Of Biological Chemistry*, 267, 12606-12613.

Sehgal, P., Szalai, P., Olesen, C., Praetorius, H. A., Nissen, P., Christensen, S. B., et al. (2017). Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺-ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca²⁺ depletion and the unfolded protein response. *Journal Of Biological Chemistry*, 292(48), 19656-19673.

Shah, T. R., Misra, A. (2011). Proteomics. In A. Misra, *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* (1st ed., pp. 387-427). Elsevier.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), 850-858.

Schägger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379.

Schägger, H., von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199(2), 223-231.

Schimadzu [online] [navštíveno 7.5.2019] Dostupné z https://www.shimadzu.com/an/lcms/support/fundamental/basic_instrumentation.html

Silva J. C., Gorenstein M. V., Li G.-Z., Vissers J. P. C., Geromanos S. J. (2006) Absolute Quantification of Proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 144-156.

Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, 23, 394-401.

Skytte, D. M., Møller, J. V., Liu, H., Nielsen, H. Ø., Svenningsen, L. E., Jensen, C. M., Olsen, C. E., Christensen, S. B. (2010). Elucidation of the topography of the thapsigargin binding site in the sarco-endoplasmic calcium ATPase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(15), 5634-5646.

Smith, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods In Molecular Biology*, 1, 41-55.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Of Molecular Biology*, 98(3), 503-508.

Stephens W. (1946) A Method for Measuring Effective Contact e.m.f. between a Metal and a

Semi-Conductor. *Physical Review*, 69, 42-43.

Su, Y., Ge, J., Zhu, B., Zheng, Y. G., Zhu, Q., Yao, S. Q. (2013). Target identification of biologically active small molecules via in situ methods. *Current Opinion In Chemical Biology*, 17(5), 768-775.

Swamy, N., James, D. A., Mohr, S. C., Hanson, R. N., Ray, R. (2002). An estradiol-Porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-Positive breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(10), 3237-3243.

Swiatly, A., Plewa, S., Matysiak, J., Kokot, Z. J. (2018). Mass spectrometry-based proteomics techniques and their application in ovarian cancer research. *Journal Of Ovarian Research*, 11(1), 88.

Switzer, R. C., Merrill, C. R., Shifrin, S. (1979). a Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 98(1), 231-237.

Tada, M., Toyofuku, T. (1996). SR Ca²⁺-ATPase/Phospholamban in Cardiomyocyte Function. *Journal Of Cardiac Failure*, 2(4), 77-85.

Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., et al. (2003). Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(8), 1895-1904.

Tomanová, P., Rimpelová, S., Jurásek, M., Buděšínský, M., Vejvodová, L., Ruml, T., Kmoníčková E., Drašar P.B. (2015). Trilobolide-porphyrin conjugates: On synthesis and biological effects evaluation. *Steroids*, 97, 8 -12.

Tonkinson, J. L., Stillman, B. A. (2002). Nitrocellulose: a tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate. *Frontier in Bioscience*, 1(7), 1-12.

Towbin, H. (2009). Origins of protein blotting. *Methods of Molecular Biology*, 536, 1-3.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, 76(9), 4350-4354.

Toyoshima, C. (2008). Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 476(1), 3-11.

Toyoshima, C., Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430(6999), 529-535.

Toyoshima, C., Nakasako, M., Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of

- sarcoplasmic reticulum at 2.6 a resolution. *Nature*, 405(6787), 647-655.
- Toyoshima, C., Nomura, H. (2002). Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418(6898), 605-611.
- Vangheluwe, P., Sepúlveda, M. R., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Vanoevenen, J. (2009). Intracellular Ca²⁺- and Mn²⁺-Transport ATPases. *Chemical Reviews*, 109(10), 4733-4759.
- Vaudel, M., Sickmann, A., Martens, L. (2010). Peptide and protein quantification: A map of the minefield. *Proteomics*, 10(4), 650-670.
- Veenstra, T. D., Martinovic, S., Anderson, G. A., Pasa-Tolic, L., and Smith, R. D. (1999) Proteome analysis using selective incorporation of isotopically labeled amino acids. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 11, 78– 82
- Vesterberg, O. (1972). Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 257(1), 11-19.
- Vesterberg, O. (1993). A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 14(12), 1243-1249.
- Viglio, S., Cagnone, M., Chiarelli, L., Salvini, R., Iadarola, P. (2018). *Electrophoresis - Life Sciences Practical Applications*. Londýn: IntechOpen.
- Wiese, S., Riedegeld, K. A., Meyer, H. E., Warscheid, B. (2007). Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*, 7(3), 340-350.
- Wilchek, M. (1972). Affinity chromatography; a tool in protein chemistry. *Biochemical Journal*, 172(2), 7-9.
- Wilkins M. R., Sanchez J.-C., Gooley A. A., Appel R. D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D. F., Williams K. L. (1995) Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13, 19-50.
- Williams, A., Frasca, V. (1999). Ion-Exchange Chromatography. *Current Protocols In Protein Science*, 15(1), 8.2.1-30.
- Wiltfang, J., Arold, N., Neuhoff, V. (1991). A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis*, 12(5), 352-366.

- Wirth, P. J., Romano, A. (1995). Staining methods in gel electrophoresis, including the use of multiple detection methods. *Journal Of Chromatography*, 698(1-2), 123-43.
- Wong, J. W., Cagney, G. (2010). An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry. *Methods In Molecular Biology*, 604, 273-283.
- Xu, C., Ma, H., Inesi, G., Al-Shawi, M. K., Toyoshima, C. (2004). Specific Structural Requirements for the Inhibitory Effect of Thapsigargin on the Ca²⁺ ATPase SERCA. *Journal Of Biological Chemistry*, 297(17), 17973-17979.
- Yi, E. L. C., Li, X. J., Cooke, K., Lee, H., Raught, B., Page, A., et al. (2005). Increased quantitative proteome coverage with ¹³C/¹²C-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme. *Proteomics*, 5(2), 380-387.
- Zeng, D., Zeglis, B. M., Lewis, J. S., Anderson, C. J. (2013). The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. *Journal Of Nuclear Medicine*, 54(6), 829-832.
- Zhang, L., Elias, J. E. (2017). Relative Protein Quantification Using Tandem Mass Tag Mass Spectrometry. *Methods In Molecular Biology*, 1550, 185-198.
- Zhang, Z., Wu, S., Stenoien, D. L., Paša-Tolic, L. (2014). High-Throughput Proteomics. *Annual Review Of Analytical Chemistry*, 7, 427-454.
- Zheng, W., Li, G., Li, X. (2015). Affinity purification in target identification: the specificity challenge. *Archives Of Pharmacal Research*, 38(9), 1661-1685.
- Zhu, W., Smith, J. W., Huang, C. M. (2010). Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *Journal Of Biomedicine & Biotechnology*, 2010(840518), 1-6.
- Zong, C., Young, G. W., Wang, Y., Lu, H., Deng, N., Drews, O., Ping, P. (2008). Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes. *Proteomics*, 8(23-24), 5025-5037