

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Využití dvoudimenzionální chromatografické
separace peptidů v diferenční proteomice**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Lenka Nosálková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. René Lenobel, Ph.D.
Rok:	2020

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

V Olomouci dne 5.8.2020

Poděkování

Děkuji Mrg. René Lenobelovi, Ph.D., za cenné rady, připomínky a odborný dohled při zpracování teoretické i praktické části bakalářské práce. Taktéž bych chtěla poděkovat institucím: Katedra biochemie PřF UP a Oddělení biochemie proteinů a proteomiky za poskytnutý prostor k vypracování diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Lenka Nosálková
Název práce	Využití dvoudimenzionální chromatografické separace peptidů v diferenční proteomice
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. René Lenobel, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Diferenční proteomika se zabývá studiem změn v proteomu buňky před a po definovaném působení na buňky. Abychom získali celkový náhled na proteom, je nutné využít vícerozměrnou analýzu, kdy je v posledních letech nejvíce používaná dvoudimenzionální chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Tato práce se zabývá optimalizací podmínek pro identifikaci a kvantifikaci co největšího počtu proteinů. Srovnávala se analýza různých počtů frakcí, typy gradientových elucí a typy experimentálních přístupů. Na základě všech získaných a prezentovaných dat bylo zhodnoceno, že nejvhodnější experimentální uspořádání pro analýzu komplexních vzorků zajišťuje mikrogradientová frakcionace na RP-C18 fázi s bazickou mobilní fází o pH 10, která dělila peptidy do 7 frakcí. Toto uspořádání je vhodné jak z hlediska identifikace peptidů a proteinů, tak z hlediska kvantifikace pro cílenou diferenční proteomickou analýzu. Kromě toho se testovalo, zdali se může gradientová HPLC-UV využít pro kvantifikaci peptidů ve vzorcích po proteolytickém štěpení. Došli jsme k závěru, že gradientová HPLC-UV je vhodná pro kvantifikaci peptidů a závislost množství peptidů a odezvy na UV detektoru je lineární a reprodukovatelná. Omezením metody je pouze požadavek, že je nutné připravit vlastní kalibrační závislost pro různé typy vzorků peptidů, tj. jednoduchý peptid, peptidy naštěpené z jednoho proteinu nebo komplexní směs naštěpená z celého lyzátu vybraného materiálu. Optimalizovaná metoda je využitelná.

Klíčová slova	Proteomika, vícerozměrná analýza, dvoudimenzionální chromatografie
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Bc. Lenka Nosálková
surname

Title Use of two-dimensional chromatography separation of
peptides in diferential proteomics

Type of thesis Diploma

Department Department of biochemistry

Supervisor Mgr, René Lenobel, Ph.D.

The year of presentation 2020

Abstract

In differential proteomics, changes in proteome of a cell before and after defined impact on cells are studied. To gain a full design of proteome, it is necessary to use multidimensional analysis, whereas in recent years the two-dimensional chromatography in combination with mass spectrometry is the most employed method. This work investigates the optimalization of conditions for identification and quantification of the highest number of proteins. We compared analysis of different number of fractions, types of gradient elution and types of experimental approaches. On the basis of gained and presented data, we evaluated that the most suitable experimental approach for analysis of complex samples is microgradient fractionation on RP-C18 phase with basic mobile phase with pH 10, which separated peptides in seven fractions. This approach is suitable for identification of peptides and proteins as well as in quantification for targeted differential proteomic analysis. Furthermore, we investigated if we can use gradient HPLC-UV for quantification of peptides in samples after proteolytic digestion. We concluded that gradient HPLC-UV is suitable for quantification of peptides and further that dependence of the amount of peptides and response on UV detector is linear and reproducible. However, there is a limitation in the necessity to prepare own calibrating dependence for different types of peptide samples (simple peptide, peptides digested from one protein or complex digest from full lyzat of the selected substance). The optimized method is utilizable.

Keywords Proteomics, multidimensional analysis,
two-dimensional chromatography

Number of pages 67

Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1	Proteomika.....	11
2.2	Proteomické metody.....	12
2.3	Proteomické separační metody	13
2.3.1	Gelová separace, elektroforéza	13
2.3.1.1	Polyakrylamidová gelová elektroforéza	14
2.3.1.2	Izoelektrická fokusace.....	15
2.3.2	Chromatografická separace	16
2.3.2.1	Iontoměničová chromatografie	17
2.3.2.2	Hydrofilní chromatografie.....	17
2.3.2.3	Chromatografie na reverzní fázi	19
2.3.2.4	Gelová filtrace.....	21
2.3.2.5	Afinitní chromatografie.....	23
2.3.3	Multidimenzionální separace.....	23
2.3.3.1	Dvoudimenzionální gelová elektroforéza.....	23
2.3.3.2	Multidimenzionální chromatografie.....	25
2.3.3.2.1	Dvoudimenzionální chromatografie SCX-RP	27
2.3.3.2.2	Dvoudimenzionální chromatografie HILIC-RP	28
2.3.3.2.3	Dvoudimenzionální chromatografie RP-RP	29
2.4	Proteomické identifikační metody	30
2.5	Proteomické kvantifikační metody	31
2.5.1	Kvantifikace pomocí hmotnostní značky	32
2.5.2	Label-free kvantifikace.....	33
2.5.2.1	Metoda měření plochy pod křivkou (AUC).....	33
2.5.2.2	Metoda sčítání spekter (SpC).....	34
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1	Materiál.....	37
3.1.1	Chemikálie.....	37
3.1.2	Biologický materiál	37
3.1.3	Roztoky.....	38
3.2	Přístrojové vybavení a příslušenství.....	38
3.3	Metody.....	39
3.3.1	Příprava lyzátu HeLa S3 buněk a lyzátu kvasinky <i>Y.lipolytica</i> , precipitace proteinů	39
3.3.2	Proteolytické štěpení trypsinem (EC 3.4.21.4)	39
3.3.3	Gradientová HPLC-UV analýza pro kvantifikaci peptidů v digestu	40
3.3.4	Mikrogradientová frakcionace, label-free kvantifikace	40
3.3.5	LC-MS/MS analýza.....	42
3.3.6	Zpracování dat	43
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
4.1	Kvantifikace gradientovou HPLC.....	44
4.2	Vliv frakcionace peptidů na kvalitu identifikace a kvantifikace	47
4.2.1	Mikrogradientová frakcionace proteolytických peptidů z BSA proteinu za různých podmínek, ověření ortogonalita dělení.....	47
4.2.2	Porovnání kvality proteomické analýzy proteinů (identifikace, kvantifikace) s využitím multidimenzionální separace v systému RP-RP	50
5	ZÁVĚR.....	56

6	LITERATURA	58
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracování literární rešerše z oblasti 2-dimenzionální chromatografie, hmotnostní spektrometrie, spojení separačních technik s hmotnostním spektrometrem a diferenční proteomiky.

Praktická část

Optimalizovat podmínky (počet frakcí, typy gradientových elucí a typy experimentálních přístupů) pro identifikaci a kvantifikaci co největšího počtu proteinů. Porovnat možnosti použitých frakcionačních postupů.

1 ÚVOD

Diferenční proteomika se zabývá studiem změn v proteomu buňky před a po definovaném působení na buňky. Abychom získali reprezentativní náhled na proteom buňky, je důležité získat kvalitativní a následně kvantitativní informace o co největším počtu proteinů nacházejících se v buňce v okamžiku zpracování. Proteom je obecně velmi komplexní vzorek obsahující až jednotky tisíc proteinů a pro jejich identifikaci je nutné využití vysokorozlišovacích separačních metod, případně jejich kombinace do vícerozměrných postupů. Jednorozměrná analýza nedokáže dosáhnout v analýze proteomu takové hloubky jako vícerozměrná analýza.

Pro studium proteomických vzorků jsou důležité jak metody, jež vzorky separují, tak metody sloužící pro identifikaci a kvantifikaci. K separaci se dříve využívaly elektroforetické metody. Dnes je oblíbenější metodou chromatografie, kterou lze provádět různými způsoby a jež dokáže analyty dělit dle různých vlastností. V posledních letech se pro proteomické vzorky využívají vícerozměrné analýzy. Do popředí jde hlavně dvoudimenzionální chromatografie. Kombinují se různé metody a zjišťuje se jejich ortogonalita. Nejlepší ortogonalitu mají metody, jež separují vzorky dle úplně odlišných vlastností. Díky separaci lze poté dojít k vyššímu počtu identifikací. Jsou identifikovány i málo abundantní proteiny, které byly v jednorozměrné analýze překrývány více abundantními proteiny a neztrácejí se. Zlepšení lze pozorovat i u kvantifikace.

K identifikaci a kvantifikaci se využívá především hmotnostní spektrometrie. Proteiny se dříve kvantifikovaly pomocí hmotnostních značek. Jelikož je tento přístup velmi nákladnou záležitostí, začal se více rozvíjet label-free přístup. V něm se nevyužívají značky a v dnešní době je už vyvinuto několik metod různých principů. Je však potvrzeno, že nejlepších výsledků lze dosáhnout spojováním a kombinováním těchto label-free přístupů pro kvantifikaci.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Proteomika

Proteomika je obor zabývající se analýzou proteomu. Tento termín poprvé použil v roce 1990 australský vědecký pracovník Marc Wilkins. K rozvoji proteomiky přispěli zejména vědci zabývající se dvoudimenzionální gelovou elektroforézou, ke kterým se přidali bioinformatičtí a experti z hmotnostní spektrometrie. V kombinaci s genomikou byly vytvořeny první proteomické přístupy, které byly založeny na hmotnostní analýze proteinů izolovaných z gelu po separaci dvoudimenzionální gelovou elektroforézou. Kritickým bodem byl objev nových ionizačních technik (ionizace elektrosprejem, ionizace laserem za přítomnosti matrice), které zlepšily citlivost a přesnost hmotnostních analýz. (Lovrić, 2011)

Proteom můžeme brát jako soubor možných produktů genu – proteinů. Proteom tedy vychází z genomu, avšak nemůžeme říct, že by proteom byl jednodušší než genom. Opak je pravdou. Produktem jednoho genu je protein, který může být syntetizován v mnoha formách lišících se strukturou, lokalizací i funkcí. Navíc není pravidlem, že v každé buňce dochází k expresi všech genů. Existují geny, jejichž produkty jsou nepostradatelné pro organismus díky své funkci, tudíž k jejich expresi dochází ve všech buňkách. Na druhou stranu je zde řada genů kódujících vysoce specializované proteiny, k jejichž expresi dochází pouze ve specializovaných buňkách. Také samotná exprese genů je různá. Některé proteiny jsou syntetizovány ve velkém množství (10^4 - 10^6 molekul proteinu na buňku) a některé v množství malém (10^1 - 10^2 molekul proteinu na buňku). Existuje tudíž jeden genom, ale mnoho proteomů. V proteomice se tedy pracuje s velmi složitými vzorky, k jejichž analýze je potřeba spolehlivá, přesná a rychlá metoda, která je schopna poskytnout jak kvalitativní, tak kvantitativní informace o proteinech v analyzovaném vzorku. (Liebler, 2002)

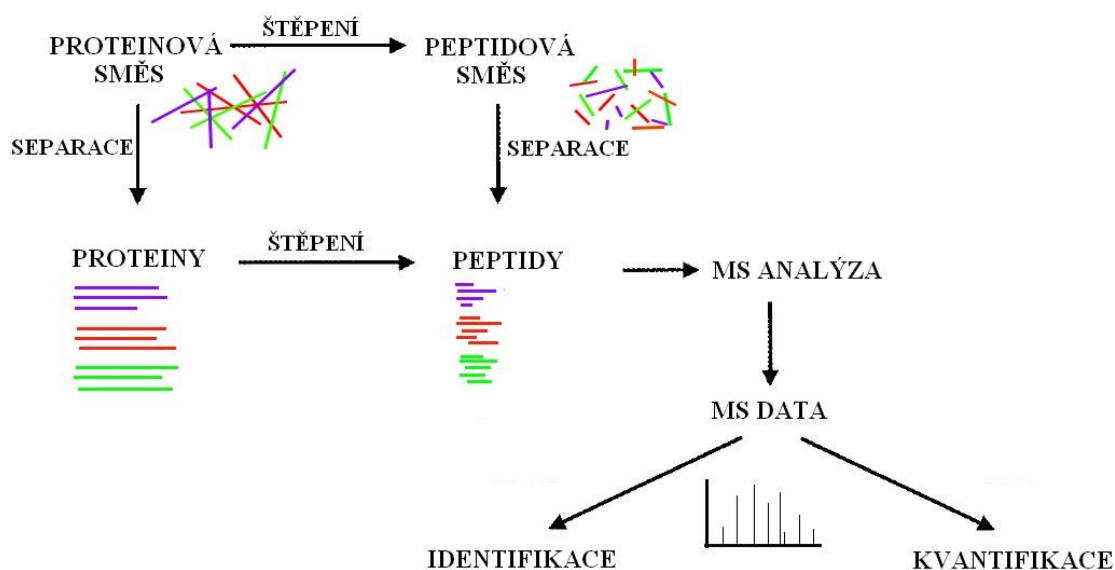
Proteomický výzkum se využívá v mnoha oblastech. Příkladem je farmacie, při které je důležitá rychlá identifikace nových léčiv v transformovaných buněčných liniích a v poškozených tkáních. Proteomika se používá v toxikologii při studiích *in vitro* i *in vivo* a při zjišťování vedlejších účinků různých látek. Význam má především v klinických laboratořích, kde je potřeba srovnávat vzorky od zdravých a nemocných jedinců a vzorky nemocných a léčených pacientů. V tělních tekutinách jsou neustále vyhledávány nové markery pro různé typy nemocí, které jsou důležité pro jejich diagnózu, monitorování průběh a léčbu. Proteomickými metodami lze charakterizovat

i posttranslační modifikace analytů. V neposlední řadě je zde mikrobiologie či rostlinný výzkum, kde je proteomika nepostradatelnou součástí běžných experimentů. (Westermeier et al., 2008)

2.2 Proteomické metody

Proteomické metody můžeme rozlišit na dvě základní skupiny. První z nich je skupina metod sloužících k separaci proteinů či peptidů. V této skupině lze najít polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (PAGE), dvoudimenzionální gelovou elektroforézu (2-DE) či kapalinovou chromatografii (LC), přičemž nejvíce používanými technikami kapalinové chromatografie jsou iontoměničová chromatografie, afinitní chromatografie a chromatografie na reverzní fázi. Další metody sloužící k separaci jsou izoelektrická fokusace (IEF) a nativní elektroforéza. Tyto metody mají však v praxi velmi specifické využití, například pro analýzu proteinových komplexů. Druhou skupinou proteomických metod je skupina zabývající se samotnou identifikací, popřípadě kvantifikací rozseparovaných analytů. Zde naprosto dominuje hmotnostní spektrometrie. (Hunter et al., 2002) Nesmí se zapomínat na metody sloužící k izolaci, čištění, odsolení, zakoncentrování či modifikaci proteinů/peptidů, které jsou nedílnou součástí celého pracovního procesu, avšak pro naše účely není třeba je dále charakterizovat.

Nejčastěji jsou k identifikaci a kvantifikaci proteinů v proteomice využívány peptidy, jež vzniknou chemickým či enzymatickým štěpením původního vzorku. Proteiny mohou být štěpeny před separačním krokem nebo po separaci vzorku vždy



Obr. 1 Průběh analýzy vzorku proteinové směsi během proteomického výzkumu (převzato a upraveno z Liebler, 2002).

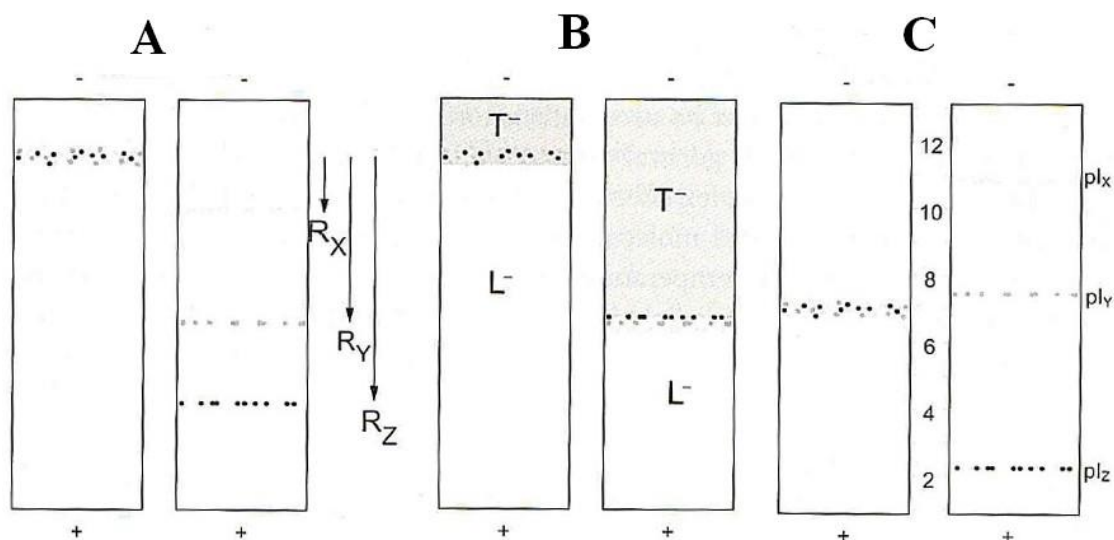
před hmotnostní analýzou (Obr. 1). I přesto, že jsou moderní spektrometrické přístroje schopny analyzovat intaktní proteiny, je pro proteomické experimenty štěpení výhodné hned ze tří důvodů. Prvním důvodem je skutečnost, že čím větší hmotu protein má, tím vyšší je pravděpodobnost chyby v měření. Více chyb znamená pro analýzu větší nejistotu ve stanovení identifikací. Druhým důvodem je velikost a hydrofobicita proteinů, což jsou parametry, které v některých případech, pokud je protein velký a má vysokou hydrofobicitu, znemožňují MS analýzu v intaktní formě proteinu. Posledním důvodem je fakt, že citlivost měření hmoty intaktního proteinu není tak dobrá jako citlivost při měření hmoty peptidů. (Liebler, 2002)

V proteomice se nejčastěji setkáváme s enzymatickým štěpením. Jedním z nejpoužívanějších enzymů pro proteolytické štěpení proteinových vzorků je trypsin (EC 3.4.21.4). Trypsin svým štěpením dokáže vytvořit jednotky až desítky peptidů v závislosti na velikosti štěpeného proteinu a vzorky pro proteomickou analýzu proto mohou obsahovat několik stovek až tisíců peptidů (Cargile et al., 2004). Počet proteinů a po proteolytickém štěpení i počet peptidů je velmi vysoký (tisíce až desetitisíce). Obrovskou komplexnost proteomu zvyšuje i skutečnost, kolik proteinů podléhá posttranslačním modifikacím. Separace a analýza tak komplexní směsi vyžaduje použití multidimenzionálních separačních technik jako je dvoudimenzionální gelová elektroforéza nebo dvoudimenzionální vysokoúčinná kapalinová chromatografie. (Mitulović et al., 2004) V minulosti se v proteomickém výzkumu nejvíce používaly imunochemické metody a western blotting. Tyto metody jsou však limitovány dostupností a cenou specifických protilátek. Také lze v jednom experimentu testovat pouze několik proteinů, proto nejsou tyto metody vhodné pro studium komplexních vzorků a využívají se spíše v analýze specifických proteinů. (Norden et al., 2002)

2.3 Proteomické separační metody

2.3.1 Gelová separace, elektroforéza

Gelová separace je založena na pohybu pozitivně i negativně nabitých iontů v elektrickém poli. Při pohybu molekul závisí na tvaru i velikosti částic, na náboji a typu gelu. Navíc je pohyb molekul ovlivněn i zvoleným napětím, kdy vysoké napětí způsobuje rychlejší pohyb, což znamená časově méně náročnou analýzu. Avšak je třeba brát v potaz, že rychlejší pohyb v gelu může mít špatný vliv na samotnou separaci látek a separace nemusí být tak přesná jako v případě menšího napětí. (Pingoud et al., 2002)



Obr. 2 Princip základních druhů gelové separace: A-zónová elektroforéza při konstantním pH (R_x – retenční faktor analytu x, R_y – retenční faktor analytu y, R_z – retenční faktor analytu z), B-izotachoforéza za rozdílném pH elektrolytu s vedoucími ionty a elektrolytu s koncovými ionty (T^- - koncové ionty, L^- - vedoucí ionty), C-izoelektrická fokusace s pH gradientem (pI_x – izoelektrický bod analytu x, pI_y – izoelektrický bod analytu y, pI_z – izoelektrický bod analytu z). (převzato a upraveno z Pingoud et al., 2002)

Obecně lze rozlišit tři základní typy separace v gelu (Obr. 2). Prvním nejjednodušším typem je zónová elektroforéza. Vzorky jsou do gelu nanášeny v malých objemech a analyty se rozdělují dle svých vlastností do zón. Výsledkem by měly být od sebe dobře rozlišitelné zóny (bandy, spoty) odpovídající jednotlivým analytům. (Westermeier et al., 2008) Dalším typem je izotachoforéza. Tato metoda spočívá v dělení vzorku, který je umístěn mezi vedoucí elektrolyt s vedoucími rychle se pohybujícími ionty a koncový elektrolyt, který obsahuje pomalu se pohybující ionty. Analyty ve vzorku se rozdělují dle svých mobilit, kdy nejrychlejší putují blízko vedoucím iontům a nejpomalejší jsou blízko koncových iontů. U izotachoforézy tedy není použit homogenní pufovací systém, tak jako se využívá u zónové elektroforézy, ale systém diskontinuální. (Pingoud et al., 2002) Posledním typem je izoelektrická fokusace, která se využívá k separaci amfoterních molekul v pH gradientu. Izelektrické fokusaci je věnována kapitola níže.

2.3.1.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Polyakrylamidová gelová elektroforéza je jednoznačně nejpoužívanější gelovou elektroforetickou separační metodou. Gely jsou tvořeny polymerací monomerního akrylamidu. K zesíťování se využívá bis-akrylamid. Koncentrací obou látek se určují

základní vlastnosti gelu, jako jsou velikost částic, pružnost, pevnost či hustota. (Lovrić, 2011)

Pro proteiny se nejvíce využívá diskontinuální zónová polyakrylamidová gelová elektroforéza. Metoda původně pochází od autorů Ornstein a Davis, avšak základní princip byl různě modifikován. Největší průlom měla studie Laemmliho (1970), která představila tzv. SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného) metodu. Mimo to, že se zde klasicky využívá zaostřovací gel k zaostření analytů a dělicí gel k jejich dělení, které se liší jak velikostí částic gelu, tak hodnotou pH, je zde navíc přítomna látka dodecylsírany sodný (SDS) v koncentraci 0,1 % (See a Jackowski, 1989). SDS je detergent, který se váže na proteiny a denaturuje je, díky čemuž jsou proteiny rozdělovány pouze dle velikosti a nezávisí zde na jejich náboji. Díky tomu se zde vytváří lineární vztah mezi molekulovou hmotností proteinu a jeho pohyblivostí v gelu. (Lovrić, 2011) Tato metoda se využívala i pro peptidové mapování (Schägger a Jagow, 1987).

2.3.1.2 Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (IEF) má v proteomice velké využití. Nejenže je první dimenzí pro dvoudimenzionální gelovou elektroforézu, využívá se i pro pre-frakcionaci komplexních proteinových vzorků podle nábojů. Nakonec ji lze využít místo iontoměničové chromatografie pro multidimenzionální separaci. (Westermeier et al., 2008)

Izoelektrická fokusace pracuje s amfoterními molekulami. Jsou to molekuly obsahující jak kyselou, tak bazickou skupinu a tyto skupiny se protonují/deprotonují na základě hodnoty pH. Nejznámější amfoterní molekuly jsou právě aminokyseliny, a tedy i peptidy a proteiny. Základním principem izoelektrické fokusace je pohyb amfoterních molekul v elektrickém poli v pH gradientu, kdy se molekuly nabíjí na základě toho, jaké pH je v zóně, ve které se právě nacházejí. Na základě náboje poté migrují elektrickým polem ke katodě či anodě až do chvíle dosažení tzv. izoelektrického bodu (pI). V tomto bodu dochází ke zneutralizování amfoterní molekuly. Náboje se vyrovnají a amfoterní molekula se zdá být navenek negativní, tudíž neputuje ani ke katodě ani k anodě a zůstává v zóně svého izoelektrického bodu ($\text{pH}=\text{pI}$). Pokud by se molekula z této zóny dostala, okamžitě by se nabíla a vrátila zpět. Tento děj se nazývá fokusační efekt. Díky tomu, že každá amfoterní molekula má izoelektrický bod odlišný, se molekuly rozseparují v gelu a dají se poté i samostatně identifikovat. (Righetti, 1983)

2.3.2 Chromatografická separace

Chromatografická separace je založená na fyzikálních a chemických interakcích jednotlivých složek směsi s mobilní (rozpuštědlo) a se stacionární (náplň kolony) fází. V mnoha případech jsou složky eluované z kolony monitorovány detektorem pro kvalitativní identifikaci či kvantitativní stanovení (Hupe, 1985).

Obecně se nejvíce setkáváme s kapalinovou a plynovou chromatografií. U kapalinové chromatografie je faktorem, který nejvíce ovlivňuje chromatografickou separaci, zvolená mobilní fáze a její složení (Reese et al., 1996). Na separaci metodou plynové chromatografie má naopak největší vliv změna stacionární fáze (Kováts, 1958). I přes řadu výhod, kterými se plynová chromatografie pyšní, je tato separace omezena na látky, které lze převést do plynného stavu, a to bez rozkladu a za přijatelných podmínek. Proto se v proteomice setkáváme výhradně s kapalinovou chromatografií a plynová chromatografie je používána pro analýzu jiných organických látek. Z technik kapalinové chromatografie se pro separaci proteinů a peptidů nejvíce využívají tyto: iontoměničová chromatografie, chromatografie na reverzní fázi, afinitní chromatografie a gelová filtrace. (základní charakteristika Tab. 1)

V mnoha případech je výhodné znát chování peptidů na koloně během chromatografie a odhadnout retenci peptidu, což přispívá k jejich identifikaci z LC-MS-MS dat (Mant a Hodges, 2006). Pokud je tedy dopředu vypočten teoretický retenční čas peptidu, může se porovnávat s experimentálním retenčním časem a přispět k peptidové identifikaci, čímž můžeme eliminovat pozitivní chyby. (Petritis et al., 2003)

Tab. 1 Základní charakteristika nejvíce používaných technik kapalinové chromatografie v proteomice (převzato a upraveno z Westermeier et al., 2008).

Technika	Iontoměničová chromatografie	Chromatografie na reverzní fázi	Afinitní chromatografie	Gelová filtrace
Separační vlastnost	náboj	hydrofobicita	specifita ligandu	velikost
Návrat vzorku z kolony	vysoký	vysoký	velmi vysoký	rozředěný
Množství naneseného vzorku	velké	střední	velké	malé
Schopnost odsolit vzorek	-	ano	-	ano
Snášenlivost surového vzorku	velmi dobrá	limitovaná	excelentní	dobrá
Těkavý pufr	ne	ano	ne	možná

Mezi základní parametry, které se pro charakterizaci chování analytu na koloně počítají, patří relativní retenční čas t_{rel} (1) a retenční faktor k (2). Relativní retenční čas získáme výpočtem z absolutního retenčního času t_R , retenčního času referenční složky t_{ref} a času t_0 , za který složka projde kolonou bez zadržení. Retenční faktor závisí na retenčním čase t_R a čase t_0 , za který složka projde kolonou bez zadržení. (Herzler et al., 2003)

$$t_{rel} = \frac{t_R - t_0}{t_{ref} - t_0} \quad (1)$$

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (2)$$

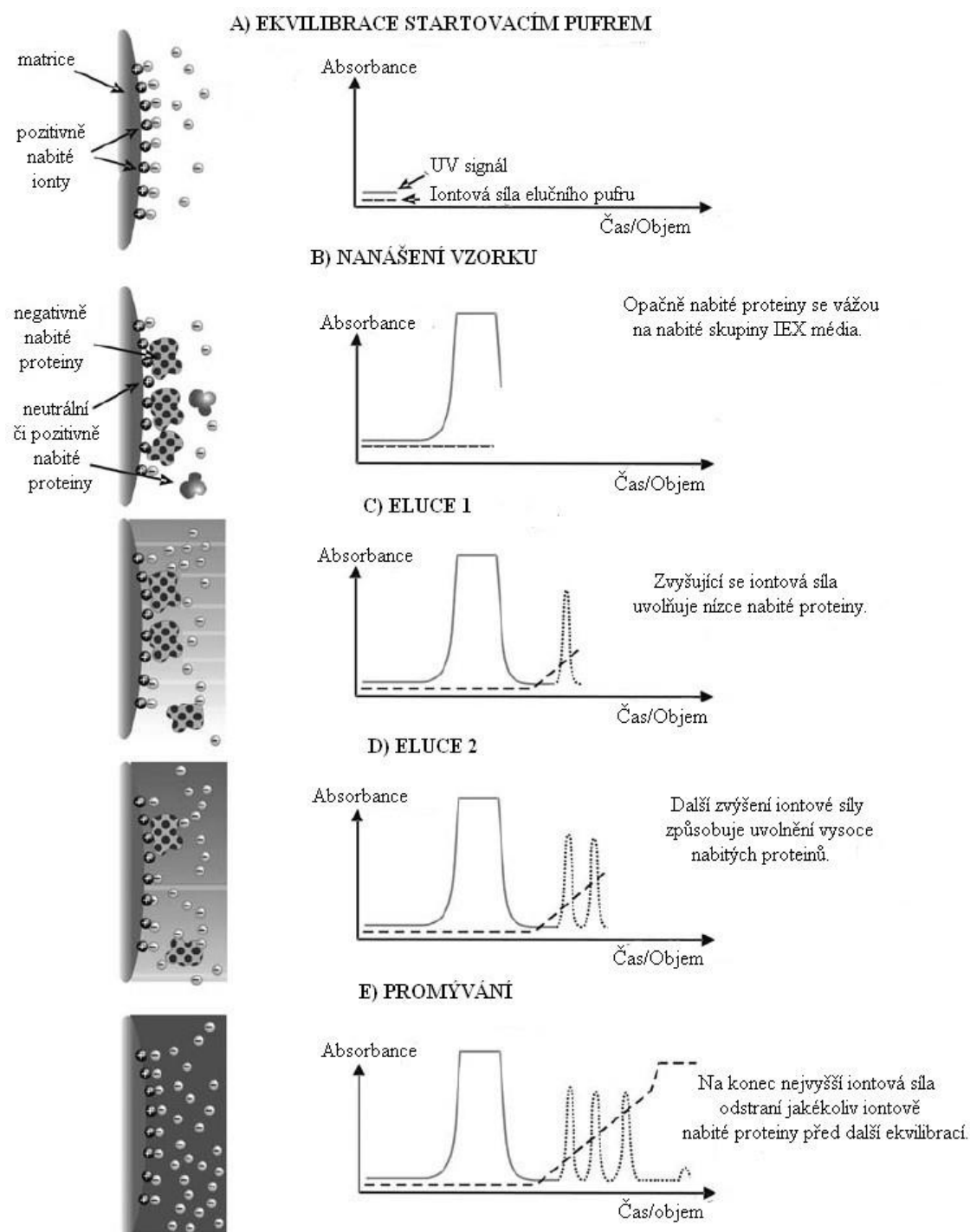
2.3.2.1 Iontoměničová chromatografie

Iontoměničová chromatografie (IEX) je v proteomice jedna z nejpoužívanějších technik kapalinové chromatografie. Pomocí iontoměničové chromatografie lze peptidy separovat podle jejich náboje (Obr. 3). Po zachycení na koloně jsou peptidy eluovány pomocí gradientu solí či gradientu pH v elučním pufru (Zhou et al., 2007). Tato metoda je schopna rozeznat dva naprosto stejné proteiny lišící se pouze v jediné jinak nabitě aminokyselině. Celkový náboj proteinu, dle kterého se při IEX proteiny separují, závisí na postranních řetězcích aminokyselin, na C-konci a N-konci, na navázaných iontech a prostetických skupinách. Náboj proteinu určuje i pH roztoku, ve kterém je protein rozpuštěn (hodnoty pKa). Obecně rozlišujeme dva typy IEX. První typ je schopen zachytávat záporně nabitě proteiny, jelikož jsou na matici v koloně navázány kladně nabitě skupiny (např. kvartérní dusík, diethylaminoethyl). U druhého typu obsahuje povrch matrice v koloně záporně nabitě skupiny (např. sulfopropyl, karboxymethyl), a proto vychytává kladně nabitě proteiny. (Westermeier et al., 2008)

Iontoměničová chromatografie se v proteomice používá v první dimenzi dvoudimenzionální chromatografické separace. Většinou následuje chromatografie na reverzní fázi a nakonec hmotnostní spektrometrie. Ortogonalita tohoto spojení však není ideální. Vytváří se klastry peptidů se stejným nábojem (nejčastěji náboj +2 a +3), které jsou eluovány v relativně úzkém retenčním okénku (Delmotte et al., 2007).

2.3.2.2 Hydrofilní chromatografie

Hydrofilní chromatografie (HILIC) je velmi podobná klasické chromatografii. Mobilní fáze je tvořena vodným roztokem s vysokým obsahem organického rozpouštědla, zatímco



Obr. 3 Průběh iontoměničové chromatografie, při které se zachytávají na kladně nabitě stacionární fázi záporně nabitě proteiny (převzato a upraveno z Westermeier et al., 2008).

stacionární fáze je hydrofilní. Eluované peptidy mají opačné pořadí než u chromatografie na reverzní fázi, při které jsou seřazeny dle zvyšující se hydrofobicity. Je to dáno tím, že hydrofilní peptidy jsou polární stacionární fázi zadržovány delší dobu než peptidy hydrofóbní. Tato metoda efektivně separuje malé polární sloučeniny na polární stacionární fázi. Je velmi podobná chromatografii na normální fázi s jednou odlišností. Chromatografie na normální fázi používá nevodnou mobilní fázi, zatímco mobilní fáze

hydrofilní chromatografie je tvořena směsí vody s organickým rozpouštědlem. (Alpert, 1990) Počet komerčně dostupných kolon pro hydrofilní chromatografii ve smyslu složení sice neustále roste, ale obecně není různorodost kolon na trhu nijak velká. Mezi často používané polární stacionární fáze patří diol, nemodifikovaný Silikagel nebo polyvinylalkohol, jež použili ve svém výzkumu kolegové Quiming et al., 2007a; Quiming et al., 2007b a Quiming et al., 2008. Seznam stacionárních fází používaných pro hydrofilní chromatografii můžeme najít v práci kolegů Hemstrom a Irgum, 2006.

2.3.2.3 Chromatografie na reverzní fázi

Chromatografie na reverzní fázi (RP) v posledních letech dosahuje stejného využití jako chromatografie iontoměničová. Název vyplývá z reverzního fázového systému, kdy je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární, což u jiných chromatografických separací není používáno (srovnání s chromatografií na normální fázi Tab. 2). Oproti jiným chromatografiím je stacionární fáze tvořena alkylovými řetězci s chemicky navázanými funkčními skupinami (Obr. 4). Velkou výhodou je nízký ekvilibrační čas kolony, snadná eluce (většinou gradientová) a dlouhá životnost kolony. (Howard a Martin, 1950)

Pro chromatografii na reverzní fázi se jako náplň do kolon využívá porézní grafitizovaný uhlík (PGC). Metodu přípravy porézního uhlíku popsali kolegové Gilbert et al. (1982). Je stabilní, odolný, inertní a zajišťuje rychlý transfer analytů z a do částic gelu (Kaur, 1990; Bassler a Hartwick, 1989). Někdy se PGC náplně nazývají jako super-reverzní fáze. (Bassler a Hartwick, 1989; Forgács et al., 1993)

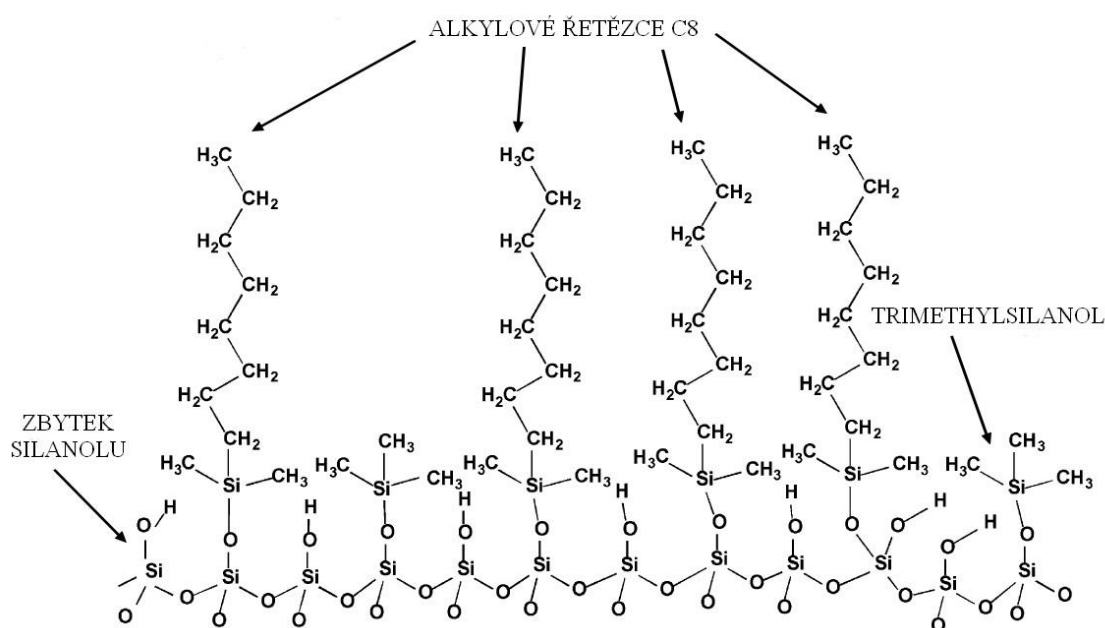
Tab. 2 Srovnání základní charakteristik chromatografie na normální fázi a chromatografie na reverzní fázi (převato a upraveno z Pingoud et al., 2002).

Parametry	Chromatografie na normální fázi	Chromatografie na reverzní fázi
Materiál kolony	SiO ₂ , Al ₂ O ₃	C ₄ , C ₈ , C ₁₈
Rozpouštědlo vzorku	hexan, toluen	voda (pufr)
Rozpouštědlo pro eluci	ethylacetát, aceton, acetonitril	voda/methanol, voda/acetonitril
Pořadí eluce	nepolární a poté polární stoupající	polární a poté nepolární
Polarita gradientu	(ze začátku hexan, přibývá ethylacetát)	klesající (ze začátku voda, přibývá směsí voda/methanol)

Mobilní fáze se skládá z vodné části a organické části. Nejčastěji se jako organická složka používá methanol, acetonitril, vyšší alkoholy, dioxan nebo tetrahydrofuran. V tomto pořadí také stoupá eluční síla. Nesmí se však zapomínat na vodnou část, jejíž obsah má také vliv na retenci analytů. Obecně je pravidlem to, že čím vyšší procento vodné části v mobilní fázi je, tím jsou analyty na koloně zadržovány déle. Takže k postupné eluci analytů jsou snižovány procenta vodné části a zvyšovány procenta organické části. (Karch et al., 1976)

Retence analytů u RP-LC závisí na hydrofóbních interakcích mezi hydrokarbonovou kolonou a peptidy. U RP-LC obecně platí pravidlo, že čím má peptid vyšší hydrofobicitu, tím více je zadržován na koloně. (Meek, 1980) Hydrofóbní interakce se tvoří mezi nepolárními molekulami či nepolárními částmi amfipatických molekul. Do hydrofóbních interakcí zahrnujeme elektrostatické interakce, vodíkové můstky a Van der Waalsovy síly. (Liu et al., 2006)

Chromatografie na reverzní fázi může být využita ke studiu povrchových interakcí peptidů či proteinů. Pomocí této chromatografie je možno sledovat ovlivnění a stabilizaci amfipatických šroubovic proteinů v hydrofóbním prostředí. Hydrofóbní interakce mezi polypeptidy a nepolární stacionární fází (typicky alifatické alkylové řetězce připevněné na křemíkové opoře) se mohou obdobně vytvářet i mezi nepolárními residui stabilizujícími terciální strukturu proteinové molekuly (intraproteinové



Obr. 4 Příklad stacionární fáze používané pro chromatografii na reverzní fázi (převzato a upraveno z Neue, 2000)

interakce). Tudiž zadržení peptidu/proteinu v koloně je závislé i na jejich konformační stabilitě. (Sereda et al., 1995)

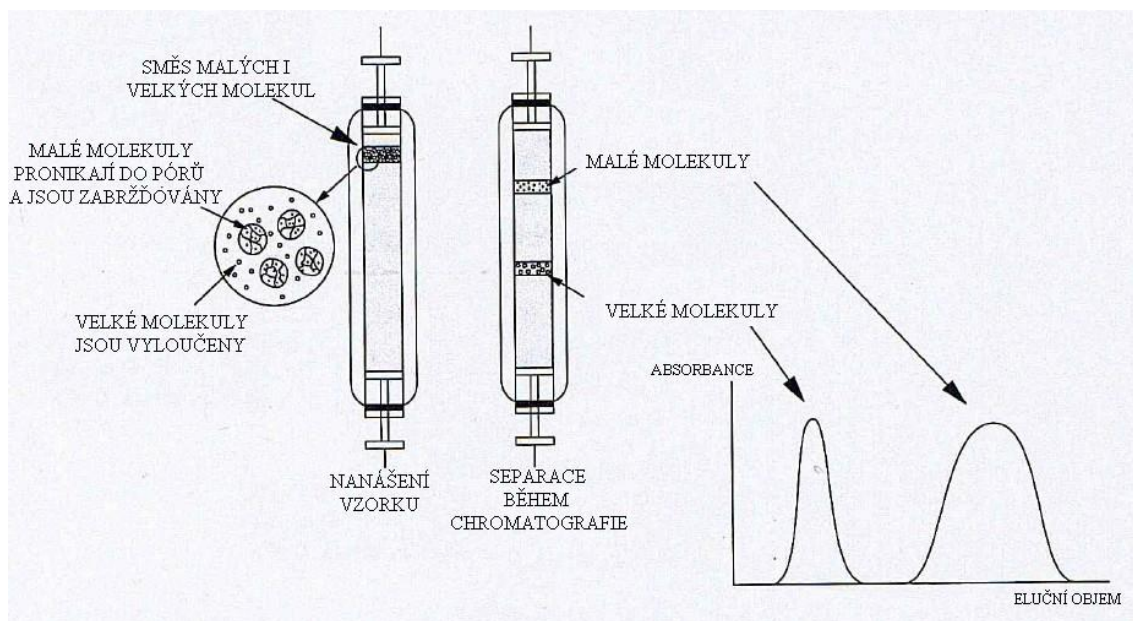
Efekt hydrofobicity peptidu na jeho chromatografické separaci na reverzní fázi je velký. Velmi záleží na aminokyselinovém složení peptidu. Obecně také platí pravidlo, že aromatické a alifatické postranní řetězce aminokyselin mají pozitivní efekt na retenci. Naopak neutrální a polární aminokyseliny efekt nemají žádný nebo pouze malý. (Wang et al., 2005)

Další parametr, který určuje retenci u RP-LC, je délka peptidu. Malé peptidy (do 15 aminokyselinových residuí) jsou většinou zadržovány na koloně dle vypočtených retenčních parametrů. Větší peptidy mají tendence chovat se jinak. (Mant et al., 1988) Předpokládá se, že narůstající velikost peptidu vede k utváření sekundární a terciální proteinové struktury. Díky tomu dochází k přerušování kontaktu některých aminokyselinových postranních řetězců se stacionární fází. (Zhou et al., 1990) Jinak je tomu u velmi malých polárních molekul, jejichž separace je vzhledem k jejich krátké retenci výzvou. Často je pro separaci těchto sloučenin požadována vysoce vodná mobilní fáze, která však přináší řadu problémů. Vysoce vodná mobilní fáze může způsobovat pokles citlivosti MS nebo může způsobit zvlhčení stacionární fáze. (Gustavsson et al., 2001; Naidong et al., 2001)

U RP-LC se dokonce lze setkat s odlišným retenčním časem peptidových diastereomerů. Stačila by změna L-aminokyseliny na D-aminokyselinu na N-terminálním konci syntetického peptidu a retenční čas by se změnil. (Kovacs et al., 2006) Nakonec bylo zjištěno, že odlišné retenční chování a substituce L-aminokyseliny za D-aminokyselinu souvisí i s teplotou. Díky teplotní změně lze rozlišit helikální a nehelikální konformaci. (Chen et al., 2003)

2.3.2.4 Gelová filtrace

Gelová filtrace je technika kapalinové chromatografie, při které se analyty dělí na základě jejich velikosti (Obr. 5). Částice materiálu v koloně mají póry definované velikosti. Velké molekuly nepronikají do pórů, a proto jsou vyloučeny z kolony nejdříve. Malé molekuly do pórů naopak pronikají snadno a jsou zabrzďovány. Kolonou procházejí pomaleji než velké molekuly. Proto se často setkáváme i s jiným názvem odvozeným od principu gelové filtrace, a to s gelovou permeační chromatografií nebo gelovou vylučovací chromatografií. (Stellwagen, 1990)



Obr. 5 Princip dělení analytů při gelové filtraci a obecný chromatogram (převzato a upraveno z Pingoud et al., 2002).

V dnešní době existuje mnoho druhů matic pro gelovou filtraci. Ideální matrice by měla být tvořena částicemi hydrofilního polymeru, měla by být inertní, stabilní a nenabíatá. Navíc by měly mít všechny částice uniformní velikost. Vhodnými přírodními materiály jsou agarosa nebo dextransy. Ze syntetických materiálů je pro gelovou filtraci používán polyakrylamid. Obecně se využívají složitější matrice vyrobené jak z přírodních, tak i ze syntetických zdrojů. Často musí být tyto materiály stabilizované. Nejčastější způsob stabilizace je chemické zesíťování. Nejpoužívanější je Sephadex vyrobený z dextransu, který je zesíťovaný epichlorhydrinem. Dále se používají například Sepharosy, Sephacryl, Superdex nebo Superosa. (Patel, 1993)

Ačkoliv je gelová filtrace principem jednoduchá metoda, může být použita pro mnoho účelů. Gelovou filtraci lze použít pro odsolení, změnu pufracních podmínek či frakcionaci dle velikosti (viskozita vzorku nesmí být větší, než je viskozita elučního pufru, jinak se průtok vzorku stává neregulovatelným). Gelová filtrace má i analytické využití. Asi nejznámějším analytickým využitím je stanovení molekulární hmotnosti neznámého nativního proteinu. Pomocí kalibrace standardními proteiny o známé molekulové hmotnosti je možné určit eluční objem. Zde musí být splněna podmínka, že standardní proteiny a protein o neznámé molekulové hmotnosti jsou molekuly se stejným či podobným tvarem. Poté je eluční objem přímo úměrný logaritmu molekulové hmotnosti. Pokud je molekulová hmotnost proteinu známá, může se zase naopak určovat tvar tohoto proteinu. Zde se využívá rychlost průchodu proteinu kolonou a znovu se zde

využívá standardních proteinů o známé molekulové hmotnosti a tvaru. (Pingoud et al., 2002)

2.3.2.5 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je velmi významnou metodou, avšak v proteomice ji nelze využít pro řešení všech problémů. Je založena na specifické interakci mezi dvěma molekulami. Nejznámějším příkladem je antigen a protilátka nebo enzym a substrát/inhibitor. Pro afinitní chromatografii jsou uzpůsobeny kolony, kdy stacionární fáze musí být schopná kovalentně navázat ligandy, na které se zachytávají specifické analyty zájmu (v proteomice proteiny) a poté jsou z nich při eluci uvolňovány. Eluce je založena na změně vlastností pufru (změna hodnoty pH či změna koncentrace solí), která oslabí interakci mezi analyty nebo jsou zachycené molekuly vytlačeny jiným analytem. (Ostrove, 1990)

V proteomice lze afinitní chromatografii využít k analýze protein-proteinových interakcí (Puig et al., 2001; Gingras et al., 2007; Li et al., 2015) nebo pro studium posttranslačních modifikací, kdy se využívá tzv. chelatační afinitní chromatografie (IMAC), která váže proteiny pomocí vazby na kovové ionty. (Muszynska et al., 1986) Jedna z nejvíce rozšířených posttranslačních modifikací je fosforylace, kdy se fosfopeptidy často izolují z komplexních vzorků vazbou na TiO_2 , jež je jednou z neúčinnějších metod, která dokáže vychytat téměř veškeré fosfopeptidy ze směsi. (Pinkse et al., 2004; Cantin et al., 2007)

2.3.3 Multidimenzionální separace

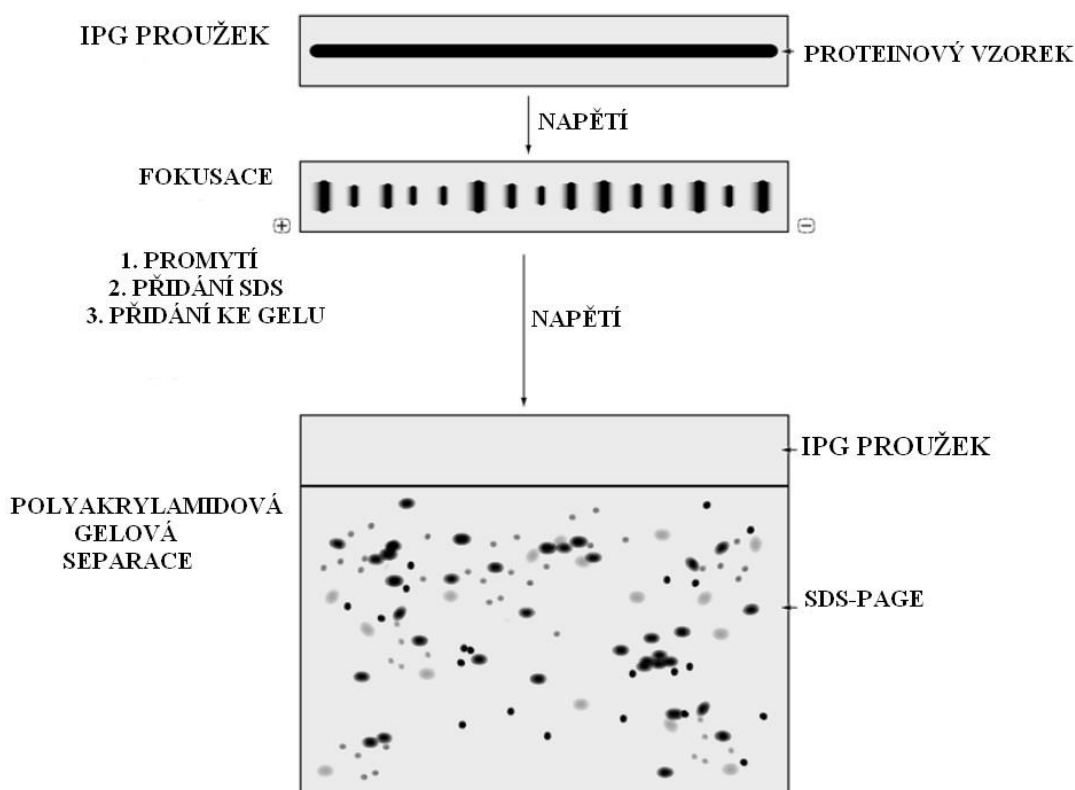
2.3.3.1 Dvoudimenzionální gelová elektroforéza

Dvoudimenzionální gelová elektroforéza (2-DE, two-dimensional electrophoresis) proteinů s následným štěpením v gelu v kombinaci s MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization-Time-of-Flight mass spectrometry) byla dříve jedna z nejpoužívanějších technik v proteomickém výzkumu (Shevchenko et al., 1996). Principem je separace proteinů na základě dvou odlišných fyzikálně-chemických vlastností – izoelektrického bodu a molekulární hmotnosti (Obr. 6). Tento ortogonální přístup se aplikuje i v dalších tradičních metodách jako je kapalinová chromatografie (Vissers, 1999) či kapilární elektroforéza (Dolnik et al., 2000).

Během jedné 2-DE analýzy bylo možné potencionálně rozdělit až tisíc proteinů. Díky tomu, že tato metoda byla schopna simultánní analýzy velkého počtu proteinů, využívala se pro mapování a byla vhodná i pro identifikaci změn v proteinové expresi. (Celis et al., 1999) V porovnání s metodami, které jsou v proteomice využívány dnes, měla 2-DE dobrou rozlišovací schopnost. Využívala se k rozlišení různých isoform a postranlačních modifikací proteinů. Dokázala to lépe než tradiční metoda western blotting. (Thelen, 2009)

Dnes je 2-DE nahrazována rychlejší a citlivější multidimenzionální chromatografickou analýzou. Je to dáno tím, že i přes řadu výše zmíněných výhod zahrnuje identifikace proteinů v gelu jeho vyříznutí, proteolytické štěpení, extrakci, zakoncentrování a v neposlední řadě analýzu každé proteinové spoty pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedná se tedy o velmi dlouhý proces. (Wolters et al., 2001) Dále tato metoda poskytuje nedostatečnou citlivost v analýze málo abundantních proteinů a vysoce hydrofóbních proteinů jako jsou membránové proteiny (Fialka et al., 1999). 2-DE navíc pokulhá v pokrytí proteomu, dynamickém rozsahu, citlivosti i ve výkonu (Perkins et al., 1999).

V posledních letech se můžeme setkat s derivatizací tradiční 2-DE metody, s tzv. DIGE metodou (Difference Gel Electrophoresis). Proteinové vzorky jsou nejdříve



Obr. 6 Průběh 2D-SDS-PAGE (převzato a upraveno v Liebler, 2002).

podrobeny značení pomocí cyaninového barviva obsahujícího N-hydroxysukcinimid, jenž reaguje s lysinovými residui na proteinu. Označené proteiny jsou separované pomocí 2-DE s následnou fluorescenční vizualizací v gelu. Tato technika je schopna zvládnout analýzu velmi komplexních vzorků. Pro tyto účely se využívají spektrální nepřekrývající se zóny různých barviv (Cy2, Cy3, Cy5 apod.). Mezi výhody DIGE řadíme schopnost vizualizovat více jak 1000 proteinových bandů s citlivostí 50 ng. (Mooney et al., 2006; Hajduch et al., 2007)

2.3.3.2 Multidimenzionální chromatografie

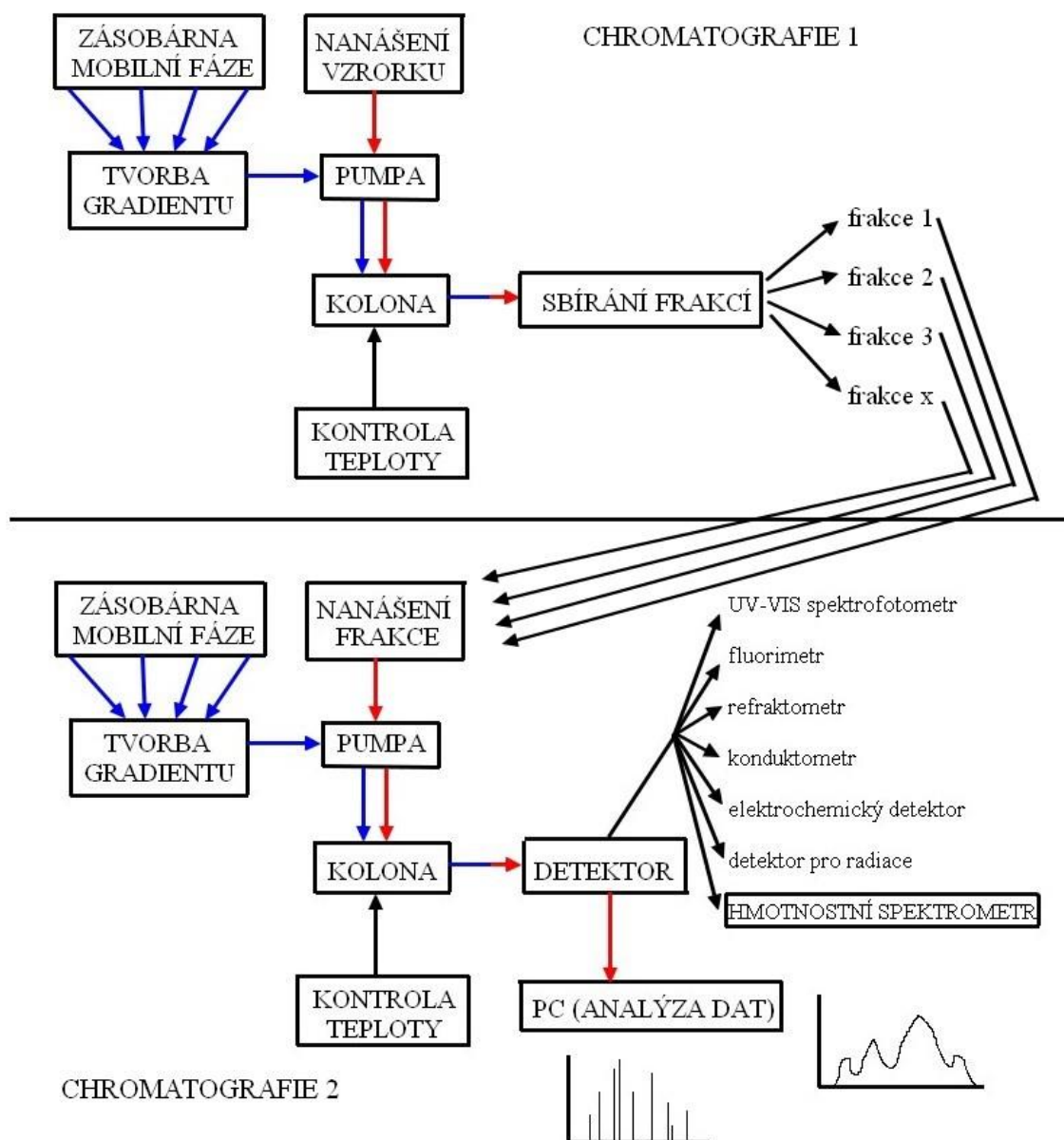
Jak už bylo zmíněno výše, 2-DE se v důsledku několika zásadních omezení začala nahrazovat multidimenzionální chromatografií. Koncept multidimenzionální chromatografie byl poprvé popsán v roce 1984 (Giddings, 1984), avšak technologie multidimenzionální proteinové identifikace, tzv. MudPIT byla navržena později (Washburn et al., 2001; Wolters et al., 2001; Liu et al., 2002). MudPIT je známý pro svou schopnost analyzovat vysoce komplexní systémy jako jsou celé proteomy, organely či proteinové komplexy. (Paoletti et al., 2004) Nejčastěji se setkáváme s dvoudimenzionální chromatografií (Obr. 7), která je pro proteomické účely zatím dostačující, avšak v některých studiích se lze setkat s třídimenzionální chromatografií, která se zdá být velmi slibnou pro separaci a identifikaci komplexních peptidů (Moore a Jorgenson, 1995; Wei et al., 2005; Issaq et al., 2005).

Existují dvě možnosti uspořádání 2D-HPLC (two-dimensional high pressure liquid chromatography), přičemž každá z nich má své výhody i nevýhody. První z nich je on-line 2D-HPLC. Tento přístup minimalizuje manipulaci se vzorkem a díky tomu se zmenšují i potencionální ztráty. Na druhou stranu je potřeba propracovaného instrumentálního nastavení s přídatnými pumpami, přepínatelnými ventily a záchytnými kolonami. Druhé provedení je off-line 2D-HPLC, které nabízí více svobody při načasování analýzy a také není potřeba tak striktního instrumentálního vybavení jako u on-line přístupu. Provedení obou typů 2D-HPLC navíc komplikuje fakt, že je analýza nejčastěji prováděna v kapilárním či nano-LC formátu. (Essader et al., 2005; Wagner et al., 2002; Vollmer et al., 2004; Peng et al., 2003)

Výhodou dvoudimenzionální chromatografie je skutečnost, že zvyšuje šanci pro detekci nízko abundantních proteinů metodou MS. Často totiž docházelo k detekci vysoce abundantních proteinů a nízko abundantní proteiny se ztrácely. Je to dáno tím, že proteomické vzorky jsou velmi komplexní a je zde velký rozdíl mezi koncentracemi

proteinů ve vzorku. Prvním řešením je oddělit analytickou metodou nízko abundanční proteiny od vysoce abundančních proteinů nebo právě použít dvou- či multidimenzionální chromatografii. (Zhang et al., 2010; 28-31) Největší nevýhodou je, že vlivem analýzy několika frakcí, které jsou během této frakcionace sbírány a postupně analyzovány, se prodlužuje čas experimentu. S tím souvisí i skutečnost, že analýza dat je složitá a také velmi časově náročná. (Washburn et al., 2001)

Pro multidimenzionální chromatografii jsou vybírány dvě či více nezávislé separační metody. Je nutné, aby retenční mechanismus peptidů byl ortogonální.



Obr. 7 Průběh dvoudimenzionální chromatografie, při které jsou v první dimenzi sbírány frakce a v druhé dimenzi jsou tyto frakce postupně znovu rozseparovány a poté analyzovány detektorem, kdy nejčastěji používaným detektorem je hmotnostní spektrometr (částečně převzato, upraveno a doplněno z Pingoud et al., 2002)

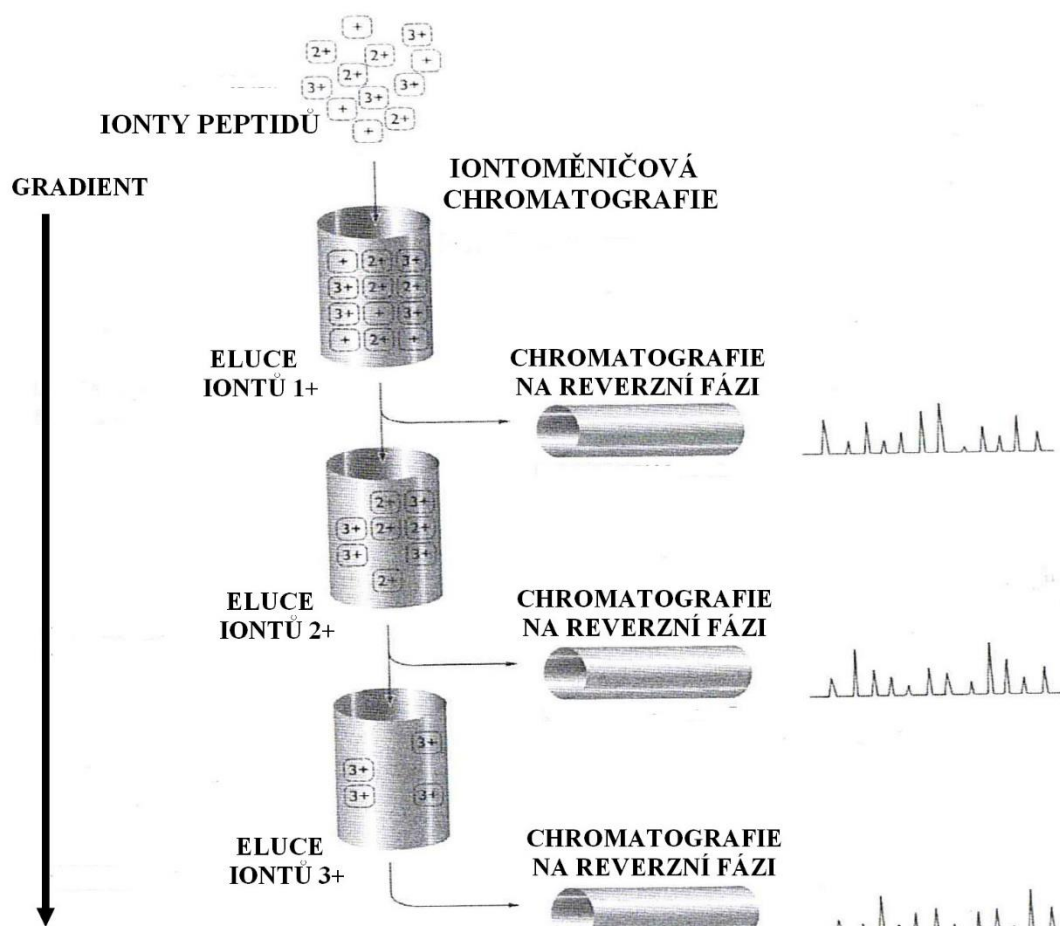
Vlastnosti, jež ovlivňují separaci v jedné dimenzi, by neměly ovlivňovat separaci v další dimenzi. Pro multidimenzionální chromatografii se tedy využívají různé typy chromatografických kolon. (Evans a Jorgenson, 2004)

2.3.3.2.1 Dvoudimenzionální chromatografie SCX-RP

Nejpoužívanější je dvoudimenzionální chromatografie, kdy první dimenzi tvoří katexová výměnná chromatografie (SCX, typ iontoměničové chromatografie) a druhou dimenzí je chromatografie na reverzní fázi (RP-LC) (Obr. 8). Navzdory rozdílům v selektivitě obou chromatografických metod je iontoměničová mobilní fáze dobře kompatibilní s druhou dimenzí. V SCX je však důležité použít těžké soli (uhličitan amonný, mravenčan amonný), aby se soli nedostávaly dále do kolony pro chromatografii na reverzní fázi, a hlavně do hmotnostního spektrometru. (Wagner et al., 2002) Tato dvoudimenzionální chromatografie se používá ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Výhodou této spektrometrické metody je schopnost izolovat a sekvenovat jediný peptidový ion v přítomnosti dalších detekovaných peptidů. Ve výsledku je u těchto typů analýz nejpodstatnější fakt, že lze analyzovat a identifikovat obrovské množství peptidů v jedné LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry) analýze. (Tabb et al., 2002)

Zajímavým přístupem pro SCX-RP-LC metodu je tzv. duální kolona. V této koloně je kombinován sorbent pro iontoměničovou chromatografii se sorbentem pro chromatografii na reverzní fázi. Peptidy nastříkované na kolonu jsou nejdříve zachytávány sorbentem pro iontoměničovou chromatografii, který se nachází na začátku kolony. Z prvního sorbentu jsou peptidy uvolňovány pomocí roztoků solí o vhodné eluční síle. Neprojdou však celou kolonou. V druhé části kolony jsou totiž opět zachytávány, a to sorbentem pro chromatografii na reverzní fázi. Díky tomuto kroku jsou peptidy i zakoncentrovány. Konečná eluce probíhá pomocí gradientu a peptidy jsou eluovány na základě svých hydrofóbních vlastností. Po eluci míří rovnou do hmotnostního spektrometru, kde jsou analyzovány. Tento přístup je vhodný pro nano-uspořádání a potenciálně zjednodušuje chromatografický systém. Nicméně může zde být problém jak s životností kolony, tak s přenášením peptidů do jiných frakcí. (Washburn et al., 2001)

Někdy se jako alternativa k SCX může použít metoda izoelektrické fokusace peptidů v gelu (IEF, isoelectric focusing). Peptidová analýza pomocí IEF má dobré rozlišení, vysokou návratnost vzorku, dobrou reprodukovatelnost a také rozumný separační čas (Lam et al., 2007). V proteomice se často používá speciální vybavení,



Obr. 8 Průběh dvoudimenzionální chromatografie SCX-RP (převzato a upraveno z Liebler, 2002) tzv. OFFGEL frakcionátor. Jedná se o komerčně dostupný přístroj, který lze upravit pro použití pro peptidy. (Horth et al., 2006) Separace je založená na konvenční IEF, kdy po použití IPG proužků jsou peptidy či proteiny frakcionovány na základě jejich hodnot pI. IEF se tímto stává efektivní a reprodukovatelnou separační metodou. (Heller et al., 2005)

2.3.3.2.2 Dvoudimenzionální chromatografie HILIC-RP

Hydrofilní chromatografie byla poprvé představena ve studii autora Alpert v roce 1990. Popularita této metody narostla s potřebou analyzovat i polární složky směsí. V offline provedení je hydrofilní chromatografie výborně kompatibilní s chromatografií na reverzní fázi (HILIC-RP) (Boersema et al., 2007). Navíc lze tuto chromatografii kombinovat i s SCX či gelovou filtrací (Mihailova et al., 2008).

Spojení HILIC-RP je skvělý příklad ortogonálního spojení, kdy každá technika separuje dle jiných vlastností. Hydrofilní chromatografie dělí peptidy v první dimenzi zejména na základě hydrofilních vlastností. Vliv mají i slabé elektrostatické vazby, vodíkové můstky a vazby dipól-dipól. V druhé dimenzi jsou peptidy děleny dle svých

hydrofóbních vlastností na chromatografii na reverzní fázi. (Gilar et al., 2005a; Palma et al., 2012)

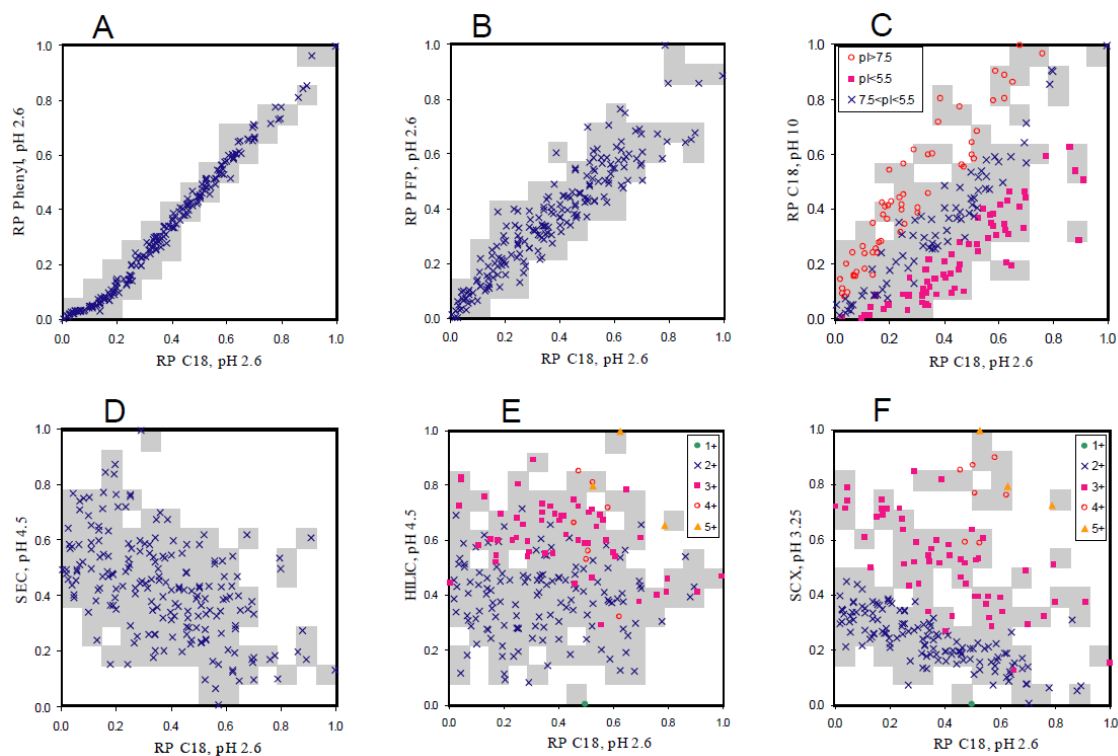
Jak již bylo výše zmíněno, spojení HILIC-RP lze provádět v offline provedení. Výhodou je jednoduché přístrojové vybavení a flexibilita. Hlavní nevýhodou je manipulace se vzorkem a potencionální ztráty vzorku. Online provedení je velmi atraktivní představou, avšak vývoj online HILIC-RP systému je velmi obtížný. Hlavním problémem je nekompatibilní mobilní fáze mezi oběma technikami. Mobilní fáze pro HILIC separaci obsahuje velké zastoupení organické složky, což by způsobilo protečení peptidů v RP koloně. (Malerod et al., 2010)

2.3.3.2.3 Dvoudimenzionální chromatografie RP-RP

Pokud chceme při dvoudimenzionální chromatografii využít chromatografii na reverzní fázi v obou dimenzích (RP-RP), je třeba, aby obě stacionární fáze vykazovaly rozdílnou selektivitu, a navíc aby si uměly vystačit se stejnou mobilní fází (Gray et al., 2003; Liu et al., 2008) nebo se využívá stejná stacionární fáze s rozdílným pH mobilní fáze. Bylo zjištěno, že hodnota pH má největší vliv na selektivitu, kdy nejvyšší ortogonalitu vykazuje systém s hodnotou pH o velikosti 10 v první dimenzi a s hodnotou pH o velikosti 2,6 v dimenzi druhé. (Gilar et al., 2005b)

Princip této dvoudimenzionální chromatografie je velmi jednoduchý. Postranní řetězce aminokyselin v peptidech jsou různě nabíjeny v závislosti na tom, jakou hodnotu pH má mobilní fáze. Jakmile jsou peptidy uvolněny z kolony do mobilní fáze s jinou hodnotou pH, mění se i náboj na postranních řetězcích, díky čemuž se změní hydrofobicita daného peptidu. (Gilar et al., 2005a; Gilar et al., 2005b) Vzhledem k tomu, že jsou peptidy separovány v obou dimenzích na základě stejné vlastnosti (i když se hydrofobicita peptidů v různém pH liší), je spojení RP-RP považováno za semiortogonální techniku (srovnání ortogonalit různých dvoudimenzionálních chromatografií Obr. 9) (Song et al., 2010; Wang et al., 2011). Pro zlepšení ortogonalit RP-RP spojení využívají někteří autoři parabolický gradient v první dimenzi. Tato technika však není účinná pro vysoce hydrofóbní (Bagag et al., 2013) a hydrofilní peptidy (Peterson et al., 2009). Také je nutné pro každý vzorek gradient optimalizovat, tudíž je tato technika časově náročná a nevhodná pro velké a robustní analýzy. (Dwivedi et al., 2008)

S RP-RP analýzou byla vynalezena i tzv. spojovací strategie. Jedná se o univerzální techniku, kterou není potřeba optimalizovat pro každý vzorek. Používá se



Obr. 9 Srovnání ortogonalit různých dvoudimenzionálních separačních metod: A-RP(pH 2,6)-RP(pH 2,6), B-RP (pH 2,6)-RP (pH 2,6) s využitím PFP sorbentu, C-RP (pH 10)-RP (pH 2,6), D-SEC-RP (pH 2,6), E-HILIC-RP (pH 2,6), F- SCX-RP (pH 2,6). (převzato a upraveno z Gilar et al, 2005a)

v první dimenzi. Principem je spojování frakcí, které jsou eluovány na začátku, a frakcí, jež jsou eluovány na konci. Tato technika slouží ke snížení času analýzy, přičemž počet identifikací není negativně ovlivněn. (Dwivedi et al., 2008) Ve studii, která tuto techniku představovala, bylo v první dimenzi sbíráno 60 až 90 frakcí. Následně byly spojeny a do druhé dimenze putovalo 8 až 24 frakcí. (Song et al., 2010; Wang et al., 2011) Je jasné, že RP-RP techniku se spojovací strategií lze použít pouze za předpokladu offline zapojení obou dimenzí. Několik studií využívá online RP-RP techniku, avšak jejich přístrojové vybavení nedokáže frakce promíchat (Kong et al., 2011; Washburn et al., 2001; Zhou et al., 2011). Existuje však již studie, která se zabývá možností online RP-RP techniky se spojovací strategií, pro kterou autoři mají zautomatizovaný systém (Law et al., 2020).

2.4 Proteomické identifikační metody

Výše uvedené elektroforetické a chromatografické metody se používají pro separaci komplexních proteomických vzorků. Po separaci je důležité rozseparované peptidy identifikovat a kvantifikovat. Pro tyto účely se využívá výhod hmotnostní spektrometrie (MS). Bez hmotnostní spektrometrie by nedošlo ke kompletní proteomické

analýze. Použití tandemové MS po ortogonální separaci vnáší do analýzy separaci na základě hmoty proteinů či peptidů (Patterson et al., 2000). V proteomice se nejvíce používá MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) nebo ESI (electrospray ionization) ionizace. Citlivost a přesnost ESI-MS se zdokonalila natolik, že je možné charakterizovat proteiny bez jejich purifikace do naprosté homogenity (Dongre et al., 1997). V proteomice rozlišujeme několik přístupů, které v analýze proteinových vzorků můžeme použít. Jsou to top-down přístup, bottom-up přístup a shotgun přístup.

Analýza proteinů přístupem top-down je založena na přímé separaci intaktních proteinů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s následnou identifikací hmotnostní spektrometrií. Bottom-up přístup spočívá ve frakcionaci proteinů vybranou separační metodou na úrovni proteinů s následným naštěpením proteinů na peptidy s jejich konečnou analýzou na hmotnostním spektrometru. V porovnání s top-down přístupem je bottom-up přístup populárnější. (Wu et al., 2012) Shotgun přístup nakonec pracuje s kompletními proteinovými vzorky z tkání a buněk. Tyto proteinové vzorky jsou podrobeny proteolytickým štěpením a následně jsou vzniklé peptidy často frakcionovány do několika vzorků dle určitých vlastností (viz. výše). Tyto peptidové frakce jsou separovány za využití kapalinové chromatografie, kdy finální eluce peptidů probíhá přímo do hmotnostního spektrometru. (Manadas et al., 2010)

2.5 Proteomické kvantifikační metody

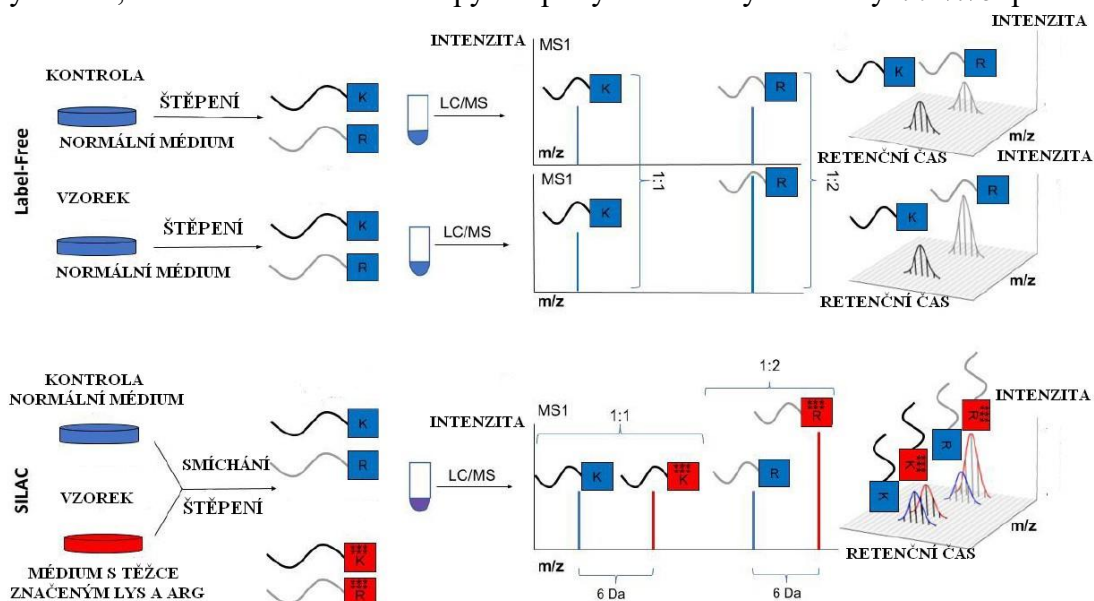
Tak jako pro identifikaci, i pro kvantifikaci se v proteomickém výzkumu nejvíce využívá hmotnostní spektrometrie. Lze využít kvantifikaci pomocí hmotnostní značky nebo tzv. label-free kvantifikaci (Obr. 10). Kvantifikační metody zahrnující značky jsou v porovnání s label-free kvantifikací nákladné a zahrnují i složitou přípravu vzorku před samotnou hmotnostní analýzou. Label-free kvantifikaci lze na rozdíl od kvantifikace se značkou použít na stovky i tisíce vzorků. Na druhou stranu je zde několik limitací label-free přístupu. Na prvním z nich je požadavek na opakované analýzy jednoho vzorku, díky čemuž je redukován počet zanalyzovaných vzorků za časovou jednotku. Další limitací je nízká preciznost v měření, kdy je mezi opakovanými analýzami stejného vzorku koeficient variability okolo 20 %. (Cox et al., 2014) Navíc méně zastoupené proteiny ve vzorku mohou mít tento koeficient ještě vyšší. Nakonec je třeba řešit problém s chybějící hodnotou, kdy se stává, že při opakovaných analýzách nemusí být důležitá frakce peptidů detekována v každém vzorku (Webb-Robertson et al., 2015). Je možnost soustředit se pouze na peptidy identifikované v každém vzorku, což by však velmi snížilo počet

kvantifikovaných proteinů pouze na ty nejvíce zastoupené proteiny ve všech vzorcích. Existuje několik prací, které se řešením problému chybějící hodnoty zabývají. (Webb-Robertson et al., 2015; Lazar et al., 2016; Wei et al., 2018)

Mimo rozdělení dle použití značky rozlišujeme navíc kvantifikaci relativní a kvantifikaci absolutní. Kvantifikace relativní spočívá v porovnání relativního zastoupení daného proteinu v odlišných vzorcích. Určuje se mezi nimi poměr. Zde je nejdříve potřeba relativně zkvantifikovat peptidy daných proteinů v každém vzorku. Data jsou poté integrována k získání poměrů celkových proteinů. (Bantscheff et al., 2007) Velikost píku daného peptidu je úměrná počtu peptidových iontů detekovaných analyzátozem. Vzhledem k tomu, že ionizace působí na různé peptidy odlišně, není možné porovnávat MS signál různých peptidů. Pro zastoupení abundance daného peptidu ve vzorku je nutné srovnávat píky stejných peptidů v různých vzorcích, jelikož na ně má ionizace pořád stejný dopad. (Bondarenko et al., 2002) Absolutní kvantifikaci zjišťujeme absolutní koncentraci proteinu ve vzorku. Absolutní kvantifikace je obvykle rozšířená relativní kvantifikace, kdy je potřeba použít standard o známé absolutní koncentraci. Pro velkou cenu těchto standardů jsou tyto experimenty omezeny pro studium méně komplexních vzorků (není kvantifikován kompletní proteom). (Gerber et al., 2003)

2.5.1 Kvantifikace pomocí hmotnostní značky

Existuje mnoho metod, které je možno pro značenou kvantifikaci použít. Značky mohou být těžké, ne-radioaktivní či izotopy. Peptidy mohou být značeny *in vivo* přidáním



Obr. 10 Srovnání průběhu label-free kvantifikace (nahore) a SILAC značené kvantifikace (dole). (převzato a upraveno z Pappireddi et al., 2019)

aminokyselin značených těžkou značkou do média, tzv. SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) (Ong et al., 2002). Dále jsou peptidy značeny chemicky *in vitro* po proteolytickém štěpení (Gygi et al., 1999; Tolonen a Haas, 2014). I přesto, že jsou těžké izotopy (kromě deuteria) chemicky shodné a jejich eluce je shodná s jejich lehkými ekvivalenty, dokáže hmotnostní spektrometr rozlišit jejich rozdílné hodnoty m/z. Hlavní výhodou tohoto přístupu je skutečnost, že vzorky mohou být značeny odděleně odlišnými izotopy a kombinovány před vložením do spektrometru. Vzorky jsou poté analyzovány dohromady. V důsledku souběžné analýzy se zlepší reprodukovatelnost a nedochází k problému s chybějící hodnotou jako u label-free kvantifikace. (Li et al., 2012)

Další běžně využívané značky jsou isobarické značky. Nejvíce používané jsou TMT (tandem mass tag) a iTRAQ (isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification). (Dayon et al., 2008; Ross et al., 2004) Isobarické značky se používají pro kovalentní modifikaci peptidů po jejich štěpení. Isobarické značky obsahují těžké izotopy, které jsou ve značce různě rozmístěny. To znamená, že každá isobarická značka má identickou molekulovou hmotnost a liší se v distribuci těžkých izotopů napříč značkou. Každá isobarická značka obsahuje místo, kde dochází k fragmentaci pro MS2 spektrum. Výsledkem jsou reportérové ionty s různou molekulovou hmotností, což závisí na tom, z jakého vzorku peptid pochází. (Wuhr et al., 2012)

Kromě výše zmíněných metod se můžeme také setkat s kvantifikací, kdy nesou proteiny izotopově-kódovanou afinitní značku. Jedná se o tzv. ICAT (isotope coded affinity tag) metodu. (Gygi et al., 1999)

2.5.2 Label-free kvantifikace

2.5.2.1 Metoda měření plochy pod křivkou (AUC)

Tak jako existuje mnoho metod značené kvantifikace, bylo vytvořeno i mnoho metod label-free kvantifikace. Jedna z nejznámějších je metoda, kdy se integruje plocha pod křivkou, tzv. AUC (area under curve) metoda. Měření AUC je lineární pro měřené peptidy o koncentraci 10 fmol-100 pmol. Dřívější studie ukázaly, že AUC metoda je vhodná pro vybrané proteiny detekované z komplexní směsi v koncentračním rozsahu 10 fmol-1000 pmol. (Bondarenko et al., 2002; Chelius a Bondarenko, 2002) Obecně je AUC kvantifikace založena na měření zastoupení iontu ve specifickém retenčním času

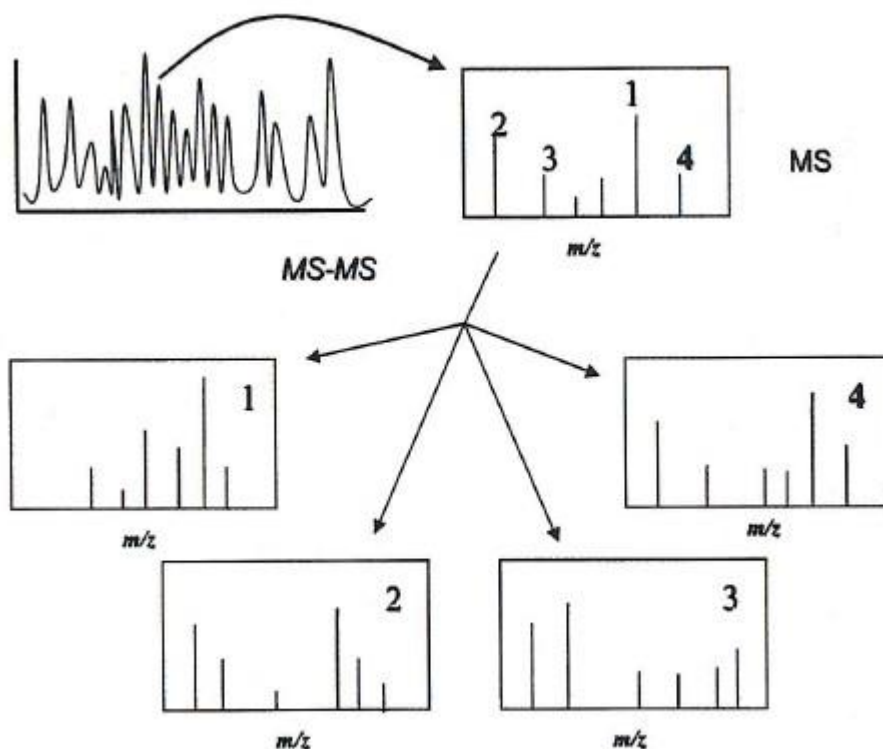
pro daný zionizovaný peptid bez použití stabilního izotopicky značeného standardu (Podwojski et al., 2010).

V případě použití této metody pro kvantifikaci je pro dosažení dobré reprodukovatelnosti, přesné detekce a kvantifikace třeba vzít v potaz několik faktorů. Obecně je třeba kontrolovat, aby signál peptidu byl ostrý. Pro jeden peptid by měl být detekován pouze jeden signál. Signál peptidu může být rozptýlen po delší retenční čas, tudíž lze předpokládat, že bude docházet k překryvu signálu se signály jiných peptidů. Dále je třeba brát v potaz různé biologické variace, které mohou zapříčinit několik signálů pro stejný peptid. Kromě biologických příčin zde mohou být technické variace pro retenční čas a signál z hmotnostního analyzátoru pro daný peptid. Odchytky může také způsobit šum v pozadí zapříčiněný chemikáliemi, které mohou interferovat se sledovanými peptidy. Je doporučeno používat tandemovou MS/MS analýzu a využít tzv. HRMS (hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením). (Listgarten a Emili, 2005)

Velmi zásadní pro AUC metodu je problém s naleznutím rovnováhy mezi precizní kvantifikací a maximální identifikací, kdy přepínání mezi MS a MS/MS módy může narušit jednu či druhou analýzu (Radulovic et al., 2004). První cesta, jak tomuto problému předcházet, je uskutečnit několik oddělených analýz vzorku v MS a MS/MS módu a následně správně zkombinovat přesnou molekulovou hmotnost s retenčním časem (AMRT, accurate-mass retention-time) a přiřadit je k identifikovanému peptidu (Silva et al., 2005). Druhá cesta spočívá v použití LCMS^E metody, kdy E označuje zvyšující/měňící se energii. Tato metoda je založena na fragmentační analýze nezávislé na hmotnostních datech prekurzorů (DIA, data-independent analyses), při které dochází ke změně kolizní energie v hmotnostním spektrometru z nízké na vysokou. Pro tuto metodu je ale nutné využít Q-TOF (quadrupole-Time of Flight) hmotnostní spektrometr (Geromanos et al., 2009; Silva et al., 2006a). Díky LCMS^E lze analyzovat i méně zastoupené proteiny (Blackburn et al., 2010). Metoda LCMS^E je v některých studiích považována za nejpřesnější label-free kvantifikační metodu pro absolutní kvantifikaci proteinu, kdy se využívá průměr z tří nejvíce zastoupených peptidů, jež vznikly proteolytickým naštěpením proteinu trypsinem (Silva et al., 2006b).

2.5.2.2 Metoda sčítání spekter (SpC)

Druhá velmi používaná metoda je založena na sčítání spekter (spectral counting, SpC). Předpokládá se, že čím abundantnější peptid bude vybrán pro fragmentaci, tím vytvoří abundantnější MS/MS spektra, a proto je vhodný pro tuto metodu, při které se využívá



Obr. 11 Fragmentační analýza závislá na datech používaná pro label-free kvantifikační metodu sčítání spekter. (převzato a upraveno z Liebler, 2002)

fragmentační analýza závislá na hmotnostních datech prekurzoru (DDA, data-dependent analyses) (Obr. 11). (Liu et al., 2004) Kromě sčítání spekter při této metodě dochází k modifikaci sumy normalizačním faktorem. Metoda SpC bývá za účelem zvýšení přesnosti často kombinována s dalšími. (Lundgren et al., 2010) Zajímavostí je, že SpC metodu lze využít i pro značenou kvantifikaci (Parker et al., 2010).

Pro stanovení proteinové abundance ve vzorku se počítá tzv. PAI index. Ten je definován jako podíl počtu pozorovaných peptidů v experimentu a počtu peptidů, jež lze teoreticky získat proteolytickým štěpením, které bylo provedeno stejným enzymem, jenž byl použit v experimentu. (Rappsilber et al., 2002) Časem se PAI index začal používat v exponenciální modifikaci, tzv. emPAI index, který je přímo úměrný proteinové složce ve vzorku. Proteinovou složku ve vzorku je možno vypočítat v procentech podělením hodnoty emPAI sumou všech emPAI ve vzorku a vynásobením hodnotou 100. Tato metoda využívající index emPAI má však velkou nevýhodu. V případě použití analyzátorů s nízkým rozlišením se výrazně snižuje úměrnost mezi hodnotou emPAI a proteinovou abundancí ve vzorku. Proto je nutné využívat HRMS analýzu zmíněnou výše. (Ishihama et al., 2005)

Kromě metody využívající hodnotu emPAI existují i jiné modifikace SpC. Jednou z nich je metoda APEX (absolute protein expression), která do výpočtů zahrnuje i počet

získaných peptidů pro daný protein a pravděpodobnost, že budou peptidy detekovány hmotnostním spektrometrem (Lu et al., 2007). Metoda pracuje s korekčním faktorem O_i , který je počítán algoritmem na základě délky peptidu a aminokyselinového složení peptidu (Mallick et al., 2007). Metoda APEX se ukázala být velmi vhodnou metodou pro kvantifikaci, a to i v případě použití analyzátorů s nízkým rozlišením typu iontové pasti (Lu et al., 2007). Je to metoda rychlá, jednoduchá a dostupná pro využití v analýze velkého množství proteomických dat (Braisted et al., 2008).

Kromě metody APEX lze využít tzv. NSAF faktor. Celým názvem normalizovaný spektrální faktor zastoupení proteinu ve vzorku, který podobně jako APEX bere v potaz délku, ale proteinu. Zde se zjišťuje, zdali délka proteinu ovlivňuje počet spekter (SpC). Předpokládá se, že delší protein bude vytvářet více peptidů a fragmentů v MS/MS spektru. Faktor NSAF lze vypočítat z celkového počtu SpC pro protein poděleného délkou proteinu (L). Tato suma je normalizována podělením součtu všech SpC/L všech proteinů v experimentu. (Florens et al., 2006; Zybailov et al., 2006; Zybailov et al., 2007)

Často dochází ke kombinaci label-free metod, což se ukázalo být nejlepší volbou pro získání co nejpřesnějších výsledků. Výsledek kombinace label-free metod můžeme vidět ve studii kolegů Griffin et al. (2010), kteří zkombinovali 3 různé label-free metody.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- aceton (Sigma-Aldrich, USA, $\geq 99,8$ %)
- acetonitril (ACN, Sigma-Aldrich, USA)
- deoxycholát sodný (Fluka, Itálie, ≥ 98 %)
- dithiothreitol (DTT, Serva, Německo)
- dodecylsulfát sodný (SDS, Serva, Německo)
- fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma-Aldrich, USA, ≥ 98 %)
- fluorid sodný (NaF, Sigma-Aldrich, USA, ≥ 99 %)
- hydrogenuhličitan amonný (NH_4HCO_3 , Sigma-Aldrich, USA, ≥ 99 %)
- hydroxid sodný (NaOH, Fluka, Německo, ≥ 98 %)
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES, Sigma-Aldrich, USA, $\geq 99,5$ %)
- chlorid hořečnatý (MgCl_2 , Fluka, USA, ≥ 98 %)
- chlorid sodný (NaCl, Sigma-Aldrich, USA, ≥ 99 %)
- IGEPAL CA 630 (Sigma-Aldrich, USA)
- isopropanol (iPr, Sigma-Aldrich, USA)
- jodoacetamid (IAA, Sigma-Aldrich, USA, ≥ 99 %)
- kyselina mravenčí (FA, Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina trifluoroctová (TFA, Sigma-Aldrich, USA)
- močovina (Sigma-Aldrich, Německo, $\geq 99,5$ %)
- roche EDTA free (Sigma-Aldrich, USA)
- thiomčovina (Fluka, Německo, ≥ 99 %)
- tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP, Fluka, USA, ≥ 98 %)
- uhličitan triethylamonný (TEAB, Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- vanadičnan sodný (NaVO_3 , Sigma-Aldrich, USA, ≥ 98 %)

3.1.2 Biologický materiál

- HeLa S3 buňky (Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, UPOL, ČR)

- kvasinka *Y.lipolytica*
- vzorky ječmene
- rafinosovaný trypsin (EC 3.4.21.4, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, UPOL, příprava: Šebela M. et al., 2006)

3.1.3 Roztoky

- lyzační pufr: 50 mM HEPES v NaOH, 300 mM NaCl, 2% IGEPAL CA 630, 0,2% deoxycholát sodný, 0,2% SDS, 2 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 100 mM PMSF, Roche EDTA free (50x), 100 mM NaVO₃, 100 mM NaF
- močovinný pufr: 100 mM TEAB, 6 M močovina, 2 M thiomočovina
- roztok A pro mobilní fázi gradientové HPLC pro kvantifikaci peptidů: 5% ACN v 0,1% TFA
- roztok B pro mobilní fázi gradientové HPLC pro kvantifikaci peptidů: 50% ACN v 0,1% TFA

3.2 Přístrojové vybavení a příslušenství

- analytické váhy (Radwag, USA)
- automatické pipety a špičky (Eppendorf, Německo)
- centrifuga minifuga (Eppendorf, Německo)
- centrifuga Thermo CL31R Multispeed (ThermoFisher, USA)
- tandemový hmotnostní spektrometr ESI-QTOF maXis (Bruker Daltonics, Německo)
- kapalinový chromatograf DL200 (Watrex, Česká republika)
- hamiltonova pipeta (25 µl, SGE, Analytical Science, Australia)
- kolona pro gradientovou HPLC (Gemini-NX C18, 5µm, 150×2,1 mm, Phenomenex, U.S.A)
- kolonka pro mikrogradientovou frakcionace (AQUA C18, 5 µm, 30x0,2 mm, PTFE, Taiwan)
- nanokapilární chromatografie (RSLCnano 3000, Dionex, Thermo, U.S.A.)
- minitřepačka V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)
- spektrofotometr UV-VIS 8453 (Agilent, USA)
- ultrazvuková lázeň (VWR, Malajsie)
- vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Německo)

3.3 Metody

3.3.1 Příprava lyzátu HeLa S3 buněk a lyzátu kvasinky *Y.lipolytica*, precipitace proteinů

Nejdříve byl k peletu buněk linie HeLa S3 přidán lyzační pufr. S využitím Hamiltonovy pipety byly nasáváním a vypouštěním mechanicky rozbíjeny buňky. Poté bylo dvakrát po sobě přidáno 200 U benzoasy. Přidavky oddělovala inkubace po dobu 15 minut. Následovala centrifugace (15 minut, 15000 G, 4 °C). Supernatan byl přenesen do čisté mikrokumavky a následovala další centrifugace (30 minut, 30000 G, 4 °C).

Pro precipitaci proteinů byl využit vychlazený aceton, a to ve čtyřnásobném objemovém nadbytku. Směs byla centrifugována (15 minut, 20000 G, 4 °C). Supernatant byl odpipetován a k peletu byl přidán 1 ml vychlazeného acetonu. Směs byla centrifugována (10 minut, 10000 G, 4 °C) a opět byl odstraněn supernatant a byl přidán 1 ml vychlazeného acetonu a směs byla centrifugována (10 minut, 10000 G, 4 °C). Ze supernatantu bylo vyčleněno asi 80 % z objemu a zbytek byl odpařen ve vakuové odparce. Po vysušení peletu byl přidán močovinový pufr v objemu 50 µl na každých 500 µg proteinu. Směs byla vložena na 30 minut do thermomixéru (22 °C, 1400 rpm). Následovala sonikace. Po dokonalém rozpuštění proteinů byl takto připravený lyzát HeLa S3 buněk zamrazen.

Získané proteiny z buněk linie HeLa S3 byly pro další experimenty kvantifikovány metodou 2D Quant Kit (2D Quant Kit GE Healthcare). Jako standard byl použit hovězí sérový albumin.

3.3.2 Proteolytické štěpení trypsinem (EC 3.4.21.4)

Proteolytické štěpení probíhalo stejným způsobem u lyzátu HeLa S3 buněk i kvasinkového lyzátu. Nejdříve proběhla redukce disulfidových vazeb pomocí 25 mM tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP), která trvala 45 minut při 25 °C. Následovala alkylace 330 mM jodoacetamidem (IAA) po dobu 30 minut ve tmě při 25 °C. Až poté mohlo probíhat proteolytické štěpení trypsinem. Štěpilo se ve dvou krocích. Nejdříve 3 hodiny v poměru 1:500 a poté se směs nechala štěpit přes noc v poměru 1:50.

Tab. 3 Změna gradientu vlivem různého zastoupení roztoků A a B mobilní fáze při gradientové HPLC.

Čas (min)	Procentuální zastoupení v mobilní fázi	
	Roztok A	Roztok B
3,0	96 %	4 %
5,5	4 %	96 %
8,0	4 %	96 %
10,0	96 %	4 %
16,0	96 %	4 %

3.3.3 Gradientová HPLC-UV analýza pro kvantifikaci peptidů v digestu

Před samotnou analýzou vzorku bylo provedeno odvzdušnění HPLC systému a promytí chromatografické kolony s reverzní fází (Gemini-NX C18, 5 μ m, 150 \times 2,1 mm, Phenomenex, U.S.A) vodou, roztok A (5% ACN v 0,1% TFA) a roztok B (50% ACN v 0,1% TFA). K dělení a eluci peptidů byl využíván gradient acetonitrilu, jehož procentuální zastoupení ve finální mobilní fázi bylo určováno poměrem roztoků A a B při celkovém průtoku 250 μ l.min⁻¹. Finální verze gradientu acetonitrilu pro HPLC-UV analýzu a kvantifikaci peptidů byla získána optimalizací délky analýzy a průběhu gradientu pro kompletní eluci všech peptidových analytů z nastříkovaných vzorků. V této práci je uveden pouze konečný gradient, který byl zvolen jako nejvhodnější pro tuto požadovanou analýzu.

V počáteční fázi obsahovala mobilní fáze 96 % roztoku A a 4 % roztoku B. Tedy minimální zastoupení acetonitrilu. Od 3.minuty docházelo k rychlému nárůstu obsahu acetonitrilu ve složení mobilní fáze (Tab. 3), což zapříčinilo zónovou eluci peptidů z kolony. Eluce byla sledována spektrofotometricky při vlnové délce o hodnotě 214 nm. Tímto způsobem byla sledována separace vzorků peptidů z hovězího sérového albuminu (BSA) a byla měřena závislost plochy píku na množství peptidů v nastříkovaném objemu. Současně byly proměřeny i vzorky vybraných samostatných peptidů a peptidů z proteolytických digestů z komplexních proteinových lyzátů živočišných buněk (Hela S3) a rostlinných buněk (ječmen).

3.3.4 Mikrogradientová frakcionace, label-free kvantifikace

Před frakcionací peptidů byly připraveny 4 série pracovních roztoků. Tyto série se odlišovaly typem pufru, který vytvářel prostředí pro frakcionaci vzorků v kombinaci s gradientem acetonitrilu. Jako pufr se použily následující roztoky: 0,1% kyselina

trifluoroctová, 0,1% kyselina mravenčí, 25 mM hydrogenuhličitan amonný pH 8 a 25 mM hydrogenuhličitan amonný pH 10. Každá série byla složena ze 7 pracovních roztoků, které se lišily obsahem acetonitrilu (8-48 %) v daném roztoku (Tab. 4). Díky těmto 7 pracovním roztokům byl vytvořen gradient, který byl používán k rozdělení směsi peptidů ve vzorcích do 7 frakcí, které byly následně samostatně analyzovány systémem kapilární kapalinové chromatografie propojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Vzorky obou lyzátů určené k této mikrogradientové frakcionaci byly před samotnou frakcionací odpařeny na vakuové odparce a následně rozpuštěny ve 300 μ l 5% kyseliny mravenčí. K základní optimalizaci podmínek byl využit vzorek hovězího sérového albuminu.

Po sestavení aparatury pro mikrogradientovou frakcionaci byla mikrokolona nejdříve zvlhčena a aktivována, kdy byly postupně pomocí Hamiltonovy pipety nanесeny tyto roztoky: 1x 25 μ l 100% isopropanolu, 2x 25 μ l 100% acetonitrilu a 2x 25 μ l 80% acetonitrilu. Před samotným nanесením vzorku byla kolona ekvilibrována na počáteční podmínky nanесením 2x 25 μ l 5% kyseliny mravenčí. Následovalo nanесení vzorku v objemu 25 μ l. Před elucí byla kolona ještě promyta 25 μ l 5% kyseliny mravenčí. Následovala eluce gradientem acetonitrilu, kdy byly do Hamiltonovy pipety postupně nataženy 4 μ l od každého pracovního roztoku jedné série (jednoho pufru) tak, aby se nejdříve na mikrokolonu nastříkoval roztok s nejnižším obsahem acetonitrilu. Nanášení gradientu na mikrokolonu probíhalo velmi pomalu, aby eluce byla přesná a frakce se nepřekrývaly a aby se pracovní roztoky v Hamiltonově pipetě výrazně nepromíchaly. Eluované peptidy byly ručně sbírány do vialek po 4 μ l, aby každá vialka odpovídala jednomu pracovnímu roztoku. V konečném důsledku bylo sesbíráno 7 frakcí odpovídajících 7 pracovním roztokům. Nakonec byla mikrokolona promyta 80% acetonitrilem a připravena na další frakcionaci. Ke 4 μ l každé frakce bylo přidáno 21 μ l roztoku 5% kyseliny mravenčí a frakce byly analyzovány metodou kapilární kapalinové

Tab. 4 Pracovní roztoky pro tvorbu gradientu v mikrogradientové frakcionaci.

Obsah acetonitrilu	Objem 100% acetonitrilu (μ l)	Objem pufru (μ l)	Odpovídá výsledné frakci
8 %	80	920	1
12 %	120	880	2
16 %	160	840	3
20 %	200	800	4
24 %	240	760	5
32 %	320	680	6
48 %	480	520	7

chromatografie na reverzní fázi spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (ESI-QTOF analyzátor). Peptidy ve frakcích byly podrobeny jak identifikaci, tak label-free kvantifikaci.

Pro srovnání vlastností frakcionace byl celý lyzát HeLa S3 buněk podroben i jediné analýze bez frakcionace nejdříve se 70minutovým gradientem a poté se 105minutovým gradientem.

3.3.5 LC-MS/MS analýza

Analýza vzorků byla provedena pomocí systému nanokapilární chromatografie (nLC) (RSLCnano 3000, Dionex, Thermo, U.S.A.) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF s ionizací elektrosprejem (ESI) (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo). Finální připravené vzorky po různých typech frakcionace byly vloženy do autosampleru a do nLC systému byl nastříkovan vzorek o objemu 4 μ l. Analýza jednotlivých vzorků byla opakována 3x. V prvním kroku byly peptidy ze vzorku zachyceny na kapilární předkoloně (75 μ m \times 3 cm, IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo). Zachycené peptidy na předkoloně byly izokraticky promyty 20 μ l 2% FA po dobu 10 min. Přečištěné peptidy byly následně z předkolony postupně uvolňovány pomocí 80minutové gradientové eluce (Tab. 5) na analytickou kapilární kolonu (50 μ m \times 20 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněnou také reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 3 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) při konstantním průtoku 180 nl/min.

Peptidy eluované z analytické kapilární kolony byly ionizovány pomocí elektrospreje a analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií metodou data-dependent analysis s kolizí indukovanou fragmentací iontů v kolizní cele.

Tab. 5 Gradient zvolený pro eluci přečištěných peptidů z předkolony při LC-MS/MS analýze.

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	95	5
13	95	5
53	75	25
60	65	35
62	45	55
64	15	85
66	15	85
69	95	5
80	95	5

Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: Zdroj (Source; Captive Spray 1080 V; Dry gas: 8 l/min; Dry temperature: 150 °C); Tune Page nastavení (Ion funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 3.5 eV; collision energy 6 eV; Collision RF 1250 Vpp; transfer time 90 µs; pre-puls storage 12 µs); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; 2 s cycle time; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 500 cts; active exclusion po 1 spektech po dobu následujících 20 s). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 100-1800 m/z s dobou sběru (acquisition time) 300 ms pro MS a rozsahu 60-250 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekurzoru, kdy 60 ms odpovídá intenzitě iontů 50000 cts a více a 250 ms pro ionty s intenzitou 500 cts a méně.

A: 0,1% FA

B: 90 % ACN + H₂O okyselená na 0,1% FA

3.3.6 Zpracování dat

Surová data byla zpracována programem MaxQuant software v.1.6.10.43 (Tyanova et al., 2016) zahrnující prohledávací algoritmus Andromeda (Cox et al., 2011). (s nastavením parametrů „Bruker TOF“, Beck et al., 2015). Identifikace proteinů byla provedena proti databázím odpovídajícím analyzovanému materiálu. Celkem byly využity tři rozdílné databáze obsahující kompletní lidský proteom a proteomy kvasinky *Y.lipolytica* a ječmene. Databáze byly staženy z deponitáře UniProt a databáze nejčastějších kontaminantů (247 proteinových sekvencí). Základní parametry pro Andromeda algoritmus a identifikaci proteinů byly následující: enzym – trypsin, 2x možná vynechaná místa štěpení (miss cleavage), zadané modifikace peptidů – karbamidometylace cysteinu jako fixní, N-koncová acetylace proteinů a oxidace metioninu jako variabilní a minimální délka peptidu 7 aminokyselin. Výsledky prohledávání ze všech vzorků byly spojeny a statisticky filtrovány na hladině 1% FDR (false discovery rate, Gupta et al. 2011) na úrovni spekter, peptidů a proteinů.

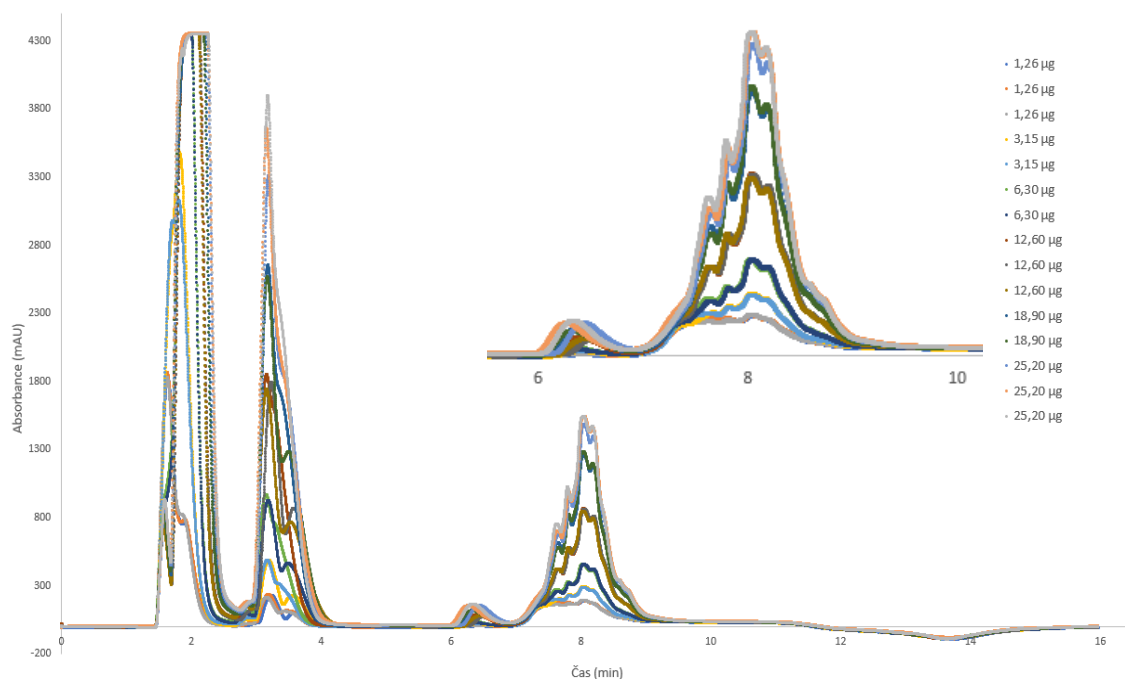
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kvantifikace gradientovou HPLC

Celková proteomická analýza z hlediska identifikace a kvantifikace peptidů a proteinů je velmi závislá na možnostech reprodukovatelné analýzy vycházející z dobře definovaného množství proteinů nebo peptidů vstupujících do analýzy. Kvantifikace proteinů vstupujících do proteomické analýzy je pro diferenční analýzu proteinů ve vzorcích nezbytná. Další výhodou je následná možnost kvantifikace obsahu peptidů ve finálních proteolyticky připravených digestech proteinů, které byly získány během zpracování vzorků. V současnosti většina metod vhodných pro kvantifikaci polypeptidů je založená na analýze proteinů a pro přímou kvantifikaci peptidů ve vzorcích se nehodí.

Techniku HPLC-UV lze využít pro detekci a následnou kvantifikaci peptidů ve vzorcích po proteolytickém štěpení. Naším cílem bylo zjistit, jestli technikou HPLC-UV můžeme detekovat a kvantifikovat obsah peptidů ve vzorku proteinového digestu v závislosti na nastříknutém množství peptidů. K tomuto experimentu byl využit vzorek hovězího sérového albuminu (BSA), jenž byl proteolyticky naštěpen. Zásobní roztok peptidů z BSA byl v koncentraci $1,26 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

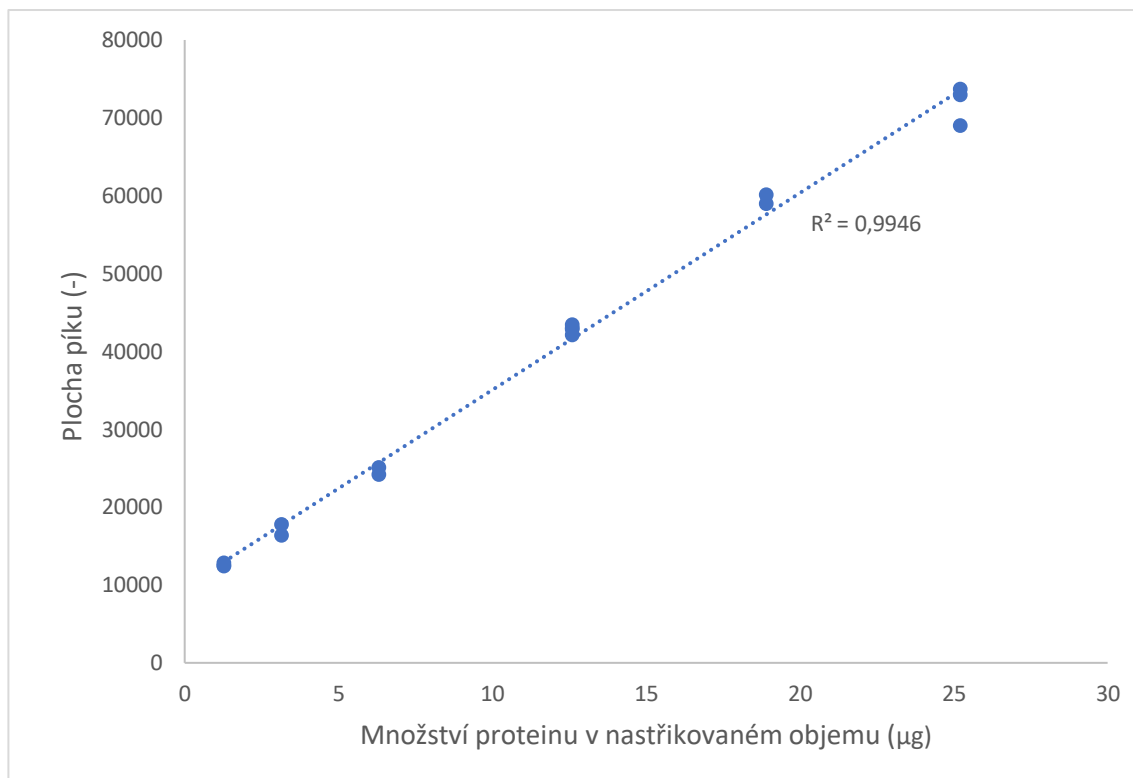
Postupně byly do HPLC-UV systému nanášeny různé objemy zásobního roztoku BSA digestu v rozsahu od $1 \mu\text{l}$ do $20 \mu\text{l}$ odpovídající hmotnostnímu obsahu peptidů v rozsahu od $1,26 \mu\text{g}$ až po $25,2 \mu\text{g}$. K analýze vzorků byl zvolen gradient popsáný v kapitole 3.3.3. Ve chromatogramu lze vidět, že se zvyšujícím se obsahem peptidů ve vzorku nastříknutém na kolonu se zvětšuje také celková plocha píků (Obr. 12). Navíc tento nárůst plochy pod píkem vykazuje se zvyšujícím se množstvím nastříkovaného množství peptidu linearitu (Obr. 13). Pro prověření reprodukovatelnosti stanovení plochy píku byl každý vzorek analyzován opakovaně (minimálně dvakrát). Výsledné plochy píků odpovídající stejnému obsahu peptidů nastříknutému na kolonu jsou přibližně shodné a reprodukovatelnost této metody je vyhovující. Limit kvantifikace je okolo $1 \mu\text{g}$ peptidů, jak je vidět z kalibrační závislosti. Když srovnáme výsledky tohoto experimentu s výsledky v práci autorů Wang a kolektiv (2014), je limit kvantifikace pro náš experiment až 28x vyšší než ve zmiňované studii, kde limit kvantifikace dosahuje hodnoty 39 ng . Tento kvantifikační limit byl dosažen i použitím chromatografické kolony o průměru 1 mm . Ve spojení s nižším průtokem $100 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ a UV detektorem s odpovídající menší UV celou vede ke zvýšení poměru odezvy detektoru vzhledem k



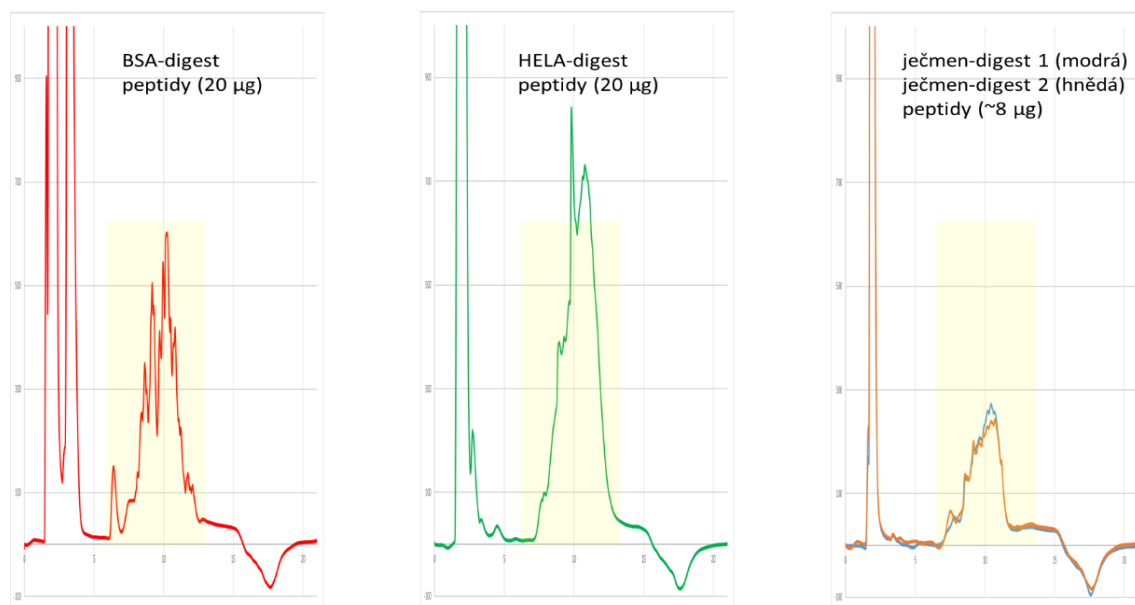
Obr. 12 Chromatogram vzorků BSA, které byly nastříknuty v různých objemech (barevně rozlišeno). Větší plochy píku znázorňují větší objem nastříknutý na kolonu, kdy lze využít porovnání ploch píku k přibližné kvantifikaci.

množství analyzovaného materiálu, a tím i ke zvýšení citlivosti samotné detekce. Odezva analytu se při přechodu z kolony o průměru 2,1 mm na 1 mm zvedne až 20x (Meyer, 2010). Přibližně to odpovídá rozdílu kvantifikačních limitů zjištěných v naší práci a v práci Wanga a kolektivu (2014).

Nutno říct, že každý typ vzorku – jednotlivé peptidy, proteolyticky připravené digesty jednotlivých proteinů nebo proteolytické digesty komplexních proteinových směsí – potřebuje proměřit kalibrační závislost. K této skutečnosti se došlo po experimentu, v kterém byly na kolonu postupně nanášeny roztoky třech různých peptidů (enkefalin, angiotenzin, leupeptin). Vzorky byly nastříkovány se stejným obsahem peptidu v nastříkovaném objemu. Mimo vzorky těchto peptidů byly navíc na kolonu nanášeny vzorky obsahující peptidy z digestu BSA a komplexní digesty pocházející jak z živočišných buněk (HeLa S3), tak z rostlinného materiálu pocházejícího z ječmene (dva nezávislé vzorky). V tomto experimentu jsme došli k závěru, že plochy píků odpovídající zejména jednotlivým čistým peptidům jsou navzájem velmi odlišné, a to jak mezi jednotlivými peptidy, ale také velmi výrazně od chromatografických záznamů a celkových ploch píků získaných pro digest vybraného proteinu (BSA) nebo ploch píků získaných pro komplexní vzorky (živočišné buňky, rostlinný materiál) (Obr. 14). Došli jsme tedy k závěru, že velmi záleží na primární struktuře daného peptidu a není možné přímo srovnávat celkové plochy píků různých typů vzorků jako jsou peptidy versus



Obr. 13 Graf závislosti plochy píku na množství proteinu v nastříkovaném objemu na kolonu. naštěpené jednotlivé proteiny nebo naštěpená komplexní směs proteinů. V nejlepším případě je tedy nutné vytvořit kalibrační závislost se standardem stejného typu, jelikož má stejný typ velmi podobný průběh chromatografického záznamu (Obr. 14- třetí chromatogram obsahující dva nezávisle připravované vzorky peptidů z rostlinného materiálu pocházejícího z ječmene).



Obr. 14 Porovnání chromatografických záznamů získaných analýzou různých typů vzorků – BSA digest, digest živočišných buněk (HeLa S3) a digest rostlinných vzorků (ječmen).

4.2 Vliv frakcionace peptidů na kvalitu identifikace a kvantifikace

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této práce, proteom je velmi složitý a dynamický soubor, pro jehož analýzu se nejvíce využívají multidimenzionální chromatografické techniky. Bohužel i přes jednoduchost a nižší náročnost práce není přímá analýza komplexního vzorku pro analýzu proteomu vhodná a nedosáhne do takové hloubky jako multidimenzionální techniky. Kombinace vybraných chromatografických technik následovaná finální kapilární LC-MSMS analýzou je relativně snadným způsobem, jak zvýšit celkovou separační kapacitu pro rozdělení, identifikaci a kvantifikaci širokého spektra peptidů v komplexních směsích (Wolters et al., 2001).

V následujících experimentech jsme se zaměřili na porovnání různých podmínek pro offline frakcionaci komplexních peptidů s využitím RP-RP dvoudimenzionální chromatografie, jelikož tato RP-RP separace s kolonami plněnými sorbentem C18 získává v posledních letech na popularitě (Gilar et al., 2005b). Nejdříve se testovala ortogonalita vybraných mobilních fází a následně byly porovnávány dva experimentální přístupy k offline frakcionaci peptidů. Prvním z nich byl HPLC-UV systém s kolonou (Gemini-NX, 5 μ m, 150 \times 2,1 mm) plněnou sorbentem RP-C18 a druhý z nich byla mikrogradientová separace na malé cca 3 cm kolonce umístěné v PTFE kapiláře plněné sorbentem RP-C18 (AQUA C18 sorbent, 5 μ m, Dr. Maisch, Německo).

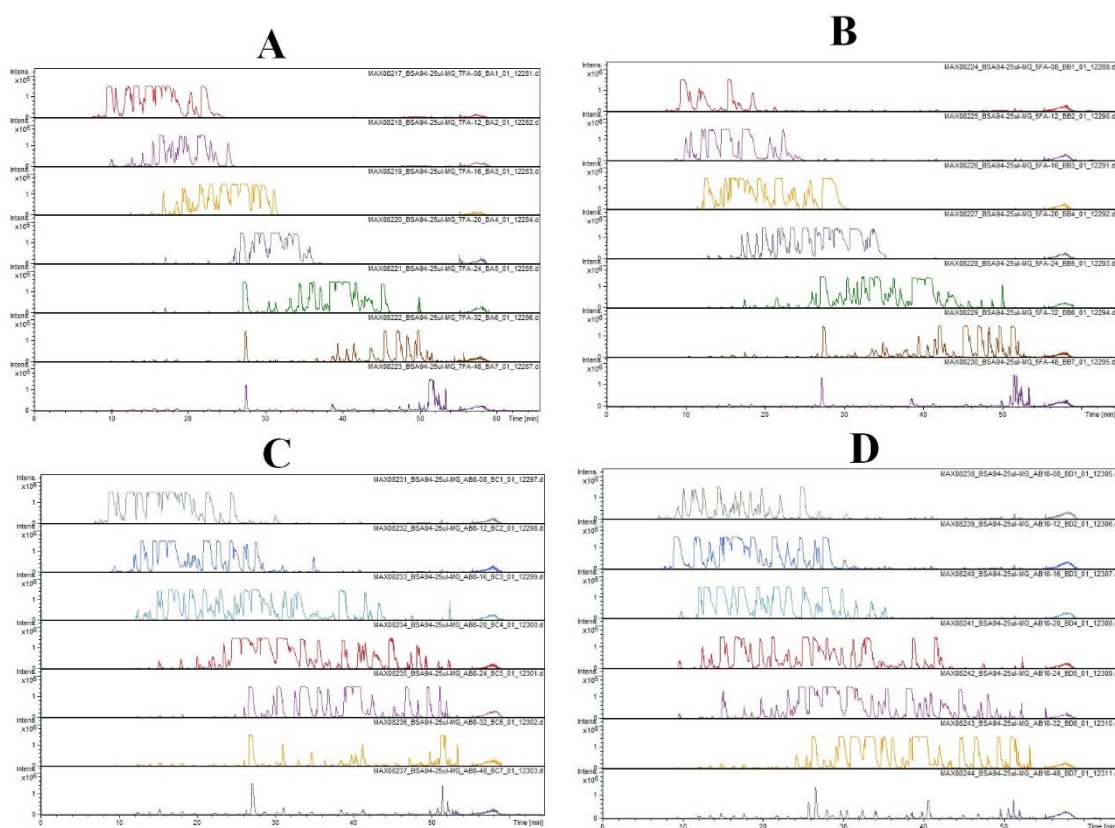
K hodnocení kvality separace peptidů a následné identifikace a kvantifikace peptidů a proteinů za různých podmínek bylo využito proteolytických digestů BSA a proteinů pocházejících z živočišných buněk Hela S3, které jsou široce využívány ke studiu proteomu v lidské buněčné biologii (Masters, 2002) a různých proteomických studiích (von Stechow et al., 2015).

4.2.1 Mikrogradientová frakcionace proteolytických peptidů z BSA proteinu za různých podmínek, ověření ortogonalit dělení

Pro správné využití mikrogradientové frakcionace bylo nutné nejdříve optimalizovat podmínky samotné separace. K základní optimalizaci se využily vzorky hovězího sérového albuminu (BSA), které byly frakcionovány ve 4 různých prostředích. První dvě byly kyselé (0,1% TFA – Obr. 15-A; 0,1% FA – Obr. 15-B), kdy obě vykazovaly podobné schopnosti frakcionace, ale i zde je možné si všimnout rozdílů. V případě mobilní fáze obsahující 0,1% TFA distribuce eluovaných peptidů z první reverzní kolony téměř velmi přesně kopíruje i eluci peptidů z reverzní kolony použité v druhém rozměru, což znamená

minimální ortogonalitu vícerozměrné separace. Podobně se projevuje také dělení peptidů s využitím mobilní fáze obsahující 0,1 % FA. I zde je pozorovatelná menší ortogonalita separace peptidů vlivem stejných pH podmínek použitých v obou krocích dělení peptidů. Je ale možné si všimnout výrazných rozdílů mezi použitím TFA a FA při dělení peptidů na sorbentech reverzní fáze, což odpovídá odlišné interakci jednotlivých kyselin s peptidy a následně s reverzní fází. Použití TFA oproti FA nejen nastavuje kyselé pH prostředí, ale zároveň funguje pro peptidy také jako ion-párové činidlo a výrazně ovlivňuje samotnou interakci peptidů s reverzní fází, v důsledku čehož způsobuje užší a intenzivnější peptidové píky, ale bohužel výrazně negativně ovlivňuje ionizaci peptidů v ESI zdroji (Chakraborty a Scott, 2005).

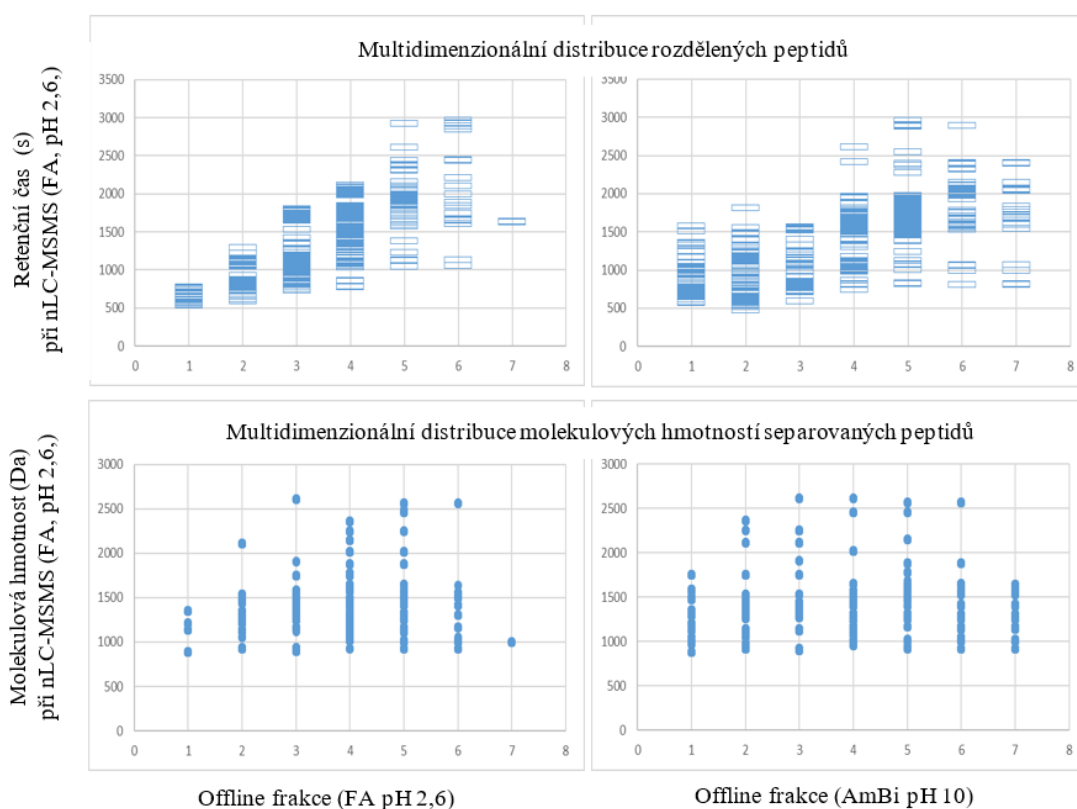
Z důvodu nízké ortogonalitu kyselých frakcí a potřeby ortogonalitu zvýšit bylo pro frakcionaci vyzkoušeno i zásadité prostředí dle práce Gilar a kolektiv (2005b). Pro frakcionaci byly zvoleny dva roztoky hydrogenuhličitanu amonného (AmBi) o koncentraci 20 mM. Roztoky se lišily hodnotou pH, kdy první měl hodnotu 8 (Obr. 15-C) a druhý hodnotu 10 (Obr. 15-D). Pokud srovnáme chromatogramy A+B versus C+D, je jasné, že je frakcionace v bazickém prostředí jakožto první rozměr dělení



Obr. 15 Chromatogramy vzniklé mikrogradientovou frakcionací vzorku BSA v prostředí: A-0,1% TFA, B-0,1% FA, C-20 mM AmBi (pH 8) a D-20 mM AmBi (pH 10). Frakce jsou barevně odlišeny.

peptidů na koloně RP-C18 efektivnější a je dosaženo výraznější změny v distribuci eluovaných peptidů ve srovnání s rozměrem druhým, který vždy probíhá v kyselém prostředí s využitím FA jako modifikátoru mobilní fáze (Gilar et al, 2005a) pro svou kompatibilitu s ESI ionizací (Chakraborty a Berger, 2006). Hodnocení dvou různých hodnot pH (pH 8 a pH 10) pro multidimenzionální separaci peptidů bylo testováno z důvodů proto, že dlouhodobé používání mobilní fáze s bazickým pH způsobuje degradaci chromatografických sorbentů založených na oxidu křemičitém, zvláště pak mobilní fáze s pH výrazně vyšším než 8 (Kirkland et al., 1995).

Kromě porovnání mezi kyselou a bazickou frakcionací můžeme na obr. 15 pozorovat i viditelné rozdíly v jednotlivých frakcích 1,5 a 6. Výsledky ukazují lepší rozdělení peptidů při použití mobilní fáze AmBi s pH 10 pro frakcionaci v prvním kroku, což poskytuje předpoklady pro lepší frakcionaci směsi peptidů v důsledku širší distribuce peptidů do jednotlivých frakcí. Na základě tohoto pozorování je možné předpokládat i vyšší počty identifikací peptidů a proteinů v následující finální LC-MS/MS analýze.



Obr. 16 Srovnání multidimenzionální distribuce proteolyticky naštěpených peptidů z BSA z hlediska jejich retenčního času a molekulové hmotnosti v rámci kombinace kolon RP-RP. Levá strana reprezentuje kombinaci dělení peptidů na obou RP kolonách s použitím 0,1% FA (pH2,6); pravá strana kombinaci dělení peptidů na první RP koloně s použitím 20 mM AmBi (pH 10) a druhé RP koloně s použitím 0,1% FA (pH2,6).

Kromě chromatogramů pro jednotlivé frakcionace můžeme pozorovat rozdíly v rozdělení směsi peptidů pomocí multidimenzionální separace za různých pH-podmínek (Obr. 16). Velmi hezky lze vidět změny, ke kterým dochází při změně pH prostředí při dělení peptidů na RP-C18 fázi. Ke změnám dochází hlavně v molekulách ionizovatelných aminokyselin v peptidech, kdy v důsledku tato změna ovlivní i retenci na reverzní fázi v koloně. Při frakcionaci v prostředí pH 10 je potlačena ionizace NH₂-skupin u bazických aminokyselin (arginin, lysin, histidin, glutamin a asparagin) a podpořena ionizace -COOH skupin aminokyselin (kyselina glutamová a asparagová), čímž se výrazně ovlivní retence peptidů na RP-C18 obsahujících tyto aminokyseliny. U peptidů získaných proteolytickým štěpením pomocí trypsinu, který uvolňuje peptidy obsahující minimálně jednu z bazických aminokyselin na C-konci každého peptidu, je tento efekt většinou výraznější.

Dále lze sledovat retenci i u delších peptidů, kdy se se zvyšující se délkou zvyšuje i počet neutrálních aminokyselin v řetězci peptidu, a tudíž i hydrofobicita. Vyšší hydrofobicita poté znamená větší retenci na koloně. Je to s velkou pravděpodobností jeden z hlavních efektů ovlivňujících vazbu peptidu na RP-C18 fázi (Mant et al., 1989). Právě frakcionace v prostředí 0,1% FA (pH 2,6) velmi pěkně kopíruje velikost peptidu (Obr. 16 vlevo), avšak frakcionace v bazickém prostředí nejeví tak velkou závislost retence peptidu na délce peptidu. Již první frakce obsahují i peptidy s delším řetězcem a vyšší hmotností ve srovnání s peptidy eluovanými při kyselém pH. Zdá se, že při frakcionaci peptidů při pH 10 hraje bazické pH velmi významnou roli při ovlivňování interakce peptidů se stacionární RP-C18 fází.

4.2.2 Porovnání kvality proteomické analýzy proteinů (identifikace, kvantifikace) s využitím multidimenzionální separace v systému RP-RP

V této části experimentů byly porovnány tři různé experimentální přístupy k analýze komplexního vzorku o koncentraci peptidů 2 µg/1 µl vytvořeného proteolytickým štěpením všech proteinů izolovaných z živočišných buněk Hela S3. Nejdříve byl komplexní vzorek analyzován přímo bez frakcionace systémem kapilární LC-MS/MS s ESI ionizací tzv. „single shot“ analýzou. Dále byl vzorek (20 µg) analyzován multidimenzionální (RP-RP) metodou mikrofrakcionace s využitím krátké 3 cm kolony vytvořené v PTFE kapiláře, kdy byl vzorek rozdělen vždy do 7 frakcí s použitím mobilní

	Jediná analýza celého vzorku – měření:					Analýza 7 frakcí – měření:				Analýza 30 frakcí – měření:	
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	1.	2.
	Průměrná hodnota ze všech 5 měření					Průměrná hodnota ze všech 4 měření				Průměrná hodnota	
Počet proteinů	1094	921	903	928	1013	2777	2803	2792	2756	4412	4388
			972					2782		4400	
Počet proteinů identifikovaných pouze jedním peptidem	337	326	320	309	342	741	763	727	700	1095	1082
			327					733		1089	
Počet peptidů	5123	3573	3167	3571	4284	14735	14631	15445	15454	21641	21215
			3944					15066		21428	
Průměr identifikovaných peptidů na protein	4,7	3,9	3,5	3,8	4,2	5,3	5,2	5,5	5,6	4,9	4,8
			4,03					5,42		4,87	
Medián identifikovaných peptidů na protein	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
			2,2					3,0		3,0	
Minimum identifikovaných peptidů na protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			1					1		1	
Maximum identifikovaných peptidů na protein	77	53	42	47	67	148	143	150	141	141	134
			57					146		138	
Kvartil 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
			1					1		2	
Kvartil 3	6	4	4	4	5	6	6	7	7	6	6
			4,6					6,5		6,0	

Obr. 17 Souhrnné srovnání proteomických parametrů identifikace proteinů a peptidů komplexního vzorku peptidů z Hela S3 lyzátu analyzovaného třemi různými experimentálními přístupy.

fáze s bazickým pH (AmBi, pH 10). Nakonec byl vzorek (40 µg) analyzován také multidimenzionální (RP-RP) metodou frakcionace s použitím HPLC-UV systému s náplňovou analytickou kolonou Gemini-NX (RP-C18, 5µm, 150×2,1 mm) opět s použitím mobilní fáze s bazickým pH (AmBi, pH 10), avšak rozdíl oproti předešlé metodě byl v rozdělení vzorku. Vzorek byl rozdělen do 30 frakcí.

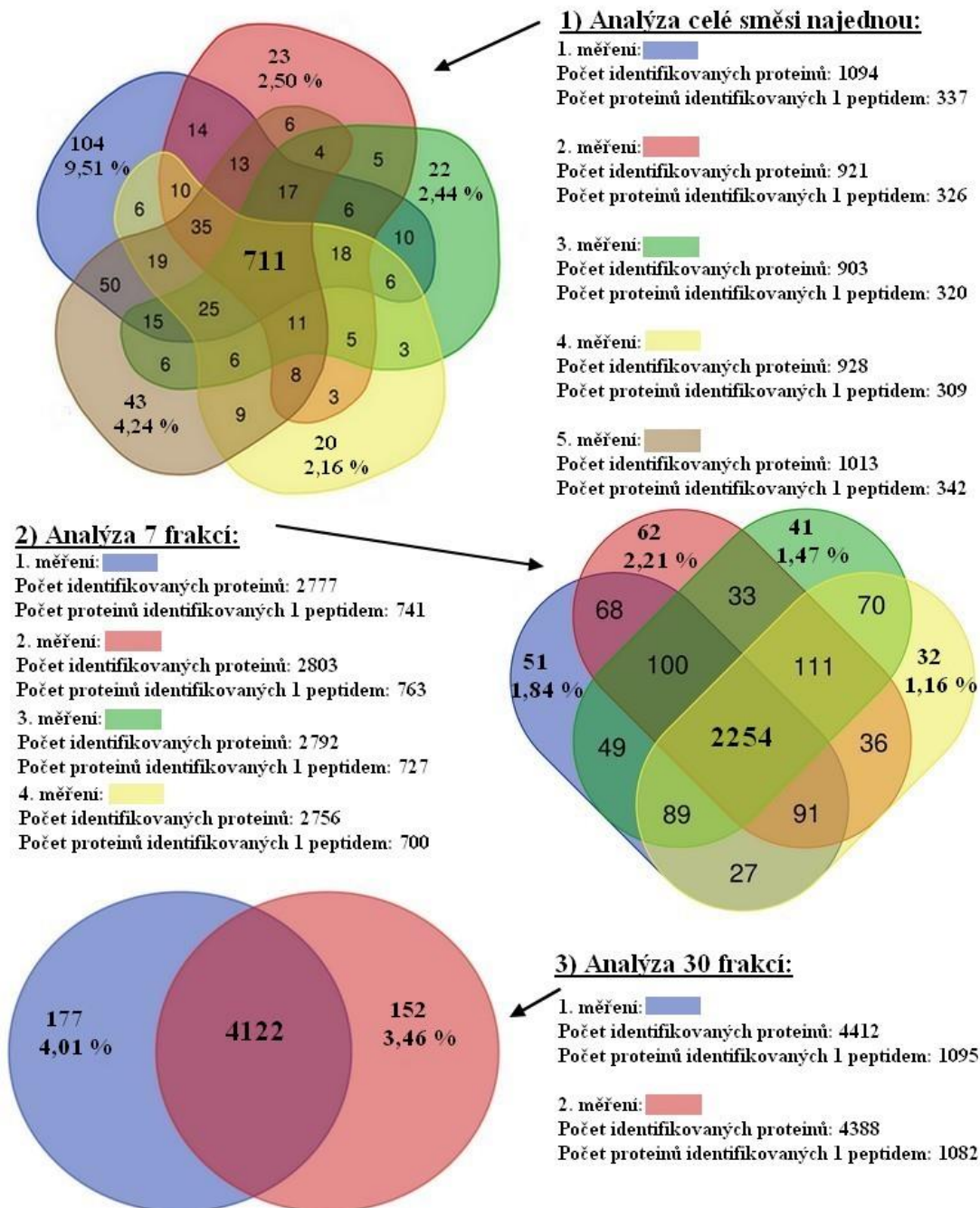
Základní údaje ze všech třech analýz byly zavedeny do tabulky (Obr. 17), kde lze vyčíst několik významných souvislostí. První rozdíl je v rozsahu identifikace peptidů a proteinů, kdy rozsah roste v závislosti na počtu frakcí získaných offline frakcionací. Celkový průměrný počet identifikací v jedné analýze je 972 proteinů a 3944 peptidů, přičemž téměř 34 % proteinů je identifikováno pouze díky jednomu unikátnímu peptidu. Frakcionací vzorku do 7 frakcí pomocí mikrogradientu se zvýšil počet identifikací na 2782 proteinů, což je 2,9x vyšší počet oproti počtu získaného analýzou vzorku bez frakcionace, a 15066 peptidů, kde je počet oproti první analýze 3,8x vyšší. Taky se snížil počet identifikovaných proteinů pouze jedním unikátním peptidem na 26 %. Díky frakcionaci pomocí HPLC-UV systému získáme ještě větší počet identifikací, a to 4400 proteinů a 21428 peptidů, kde je okolo 25 % proteinů identifikováno díky jednomu unikátnímu peptidu. Výsledky jsou podobné výsledkům z frakcionace pomocí mikrogradientu. Když porovnáme hodnoty identifikací z 30 frakcí s daty získanými

z jedné analýzy, jsou nárůsty identifikací významné, avšak významnější je porovnat nárůst identifikací oproti 7 frakcím z mikrogradientu. Nárůst je v tomto případě 1,58x v případě proteinů a 1,42x v případě peptidů.

I přesto, že je nárůst identifikací proteinů i peptidů vyšší pro analýzu vzorku rozděleného do 30 frakcí, je nutno brát v potaz i čas analýzy. V případě jediné analýzy trvala celá LC-MS/MS analýza 120 minut čistého gradientu plus nanášení vzorku a ekvilibrace kolony. V experimentech analyzujících frakce z mikrogradientu nebo i HPLC-UV gradientu trvala jedna celá LC-MS/MS analýza jedné frakce 85 min (gradient + nanášení vzorku a ekvilibrace kolony). Celkově po sečtení dostaneme pro analýzu 7 frakcí 595 minut, což je 4,9x víc než u jediné analýzy. V případě analýzy 30 frakcí je to dohromady už 2550 minut. Je to velmi významný nárůst oproti jediné analýze (21,3x). Je tedy nutno podotknout, že i přes vysoký nárůst identifikací pro analýzu 30 frakcí je tato analýza pomocí LC-MS/MS systému vhodná zejména pro analýzu složitých komplexních vzorků v malých sériích, a to z důvodu časové náročnosti.

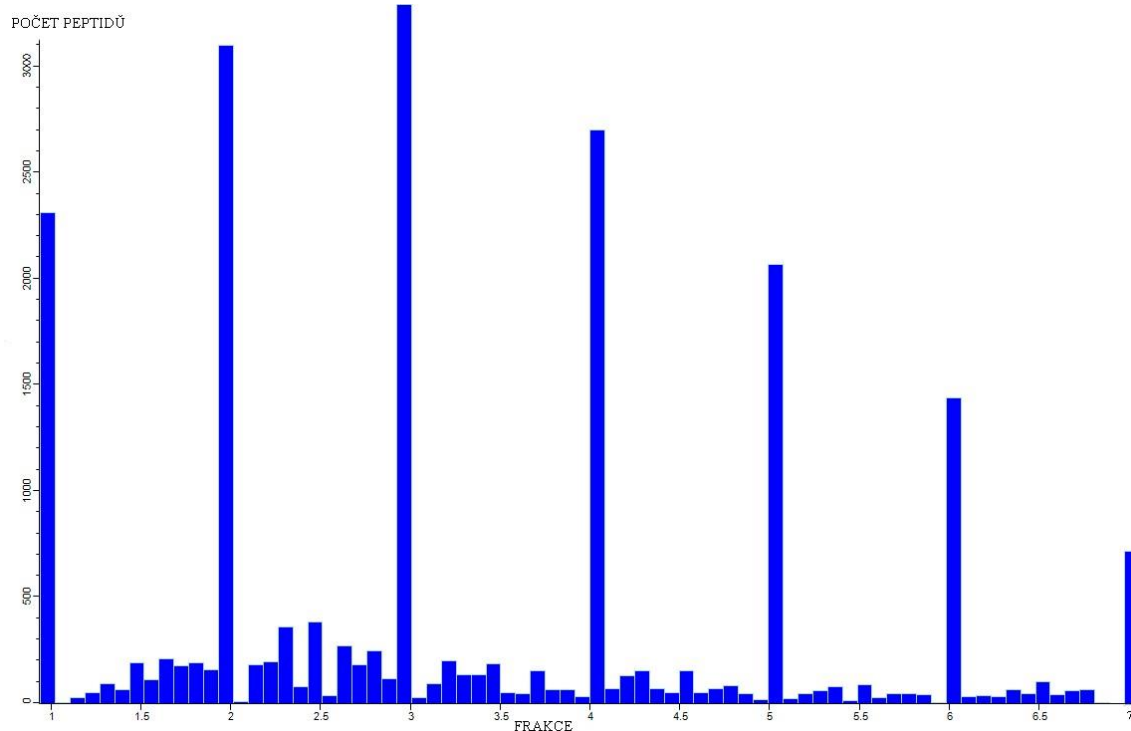
Frakcionace pomocí mikrogradientu a analýza 7 frakcí je obhajitelná, protože nárůst časové a experimentální náročnosti 4,9x je zdůvodnitelný významným nárůstem identifikací proteinů 2,9x (z 972 na 2872) a peptidů 3,8x (z 3944 na 15066) a také hlavně 8% poklesem počtu proteinů identifikovaných pouze jedním unikátním peptidem.

Významnou vlastností proteomické analýzy je reprodukovatelnost opakovatelné identifikace proteinů a peptidů. Celkové identifikace vždy obsahují určité procento proteinů a peptidů identifikované jen v určitém počtu opakovaných analýz (Obr. 18). Reprodukovatelnost identifikace stejných proteinů se pohybovala v rozmezí od 73 % pro jediné analýzy bez frakcí, přes 81 % pro analýzy ze 7 frakcí až po 94 % pro opakované analýzy z 30 frakcí. Toto chování lze vysvětlit tzv. stochastickým principem, který je popsán ve studii autorů Kreimer a kolektiv (2016), a který se uplatňuje na výběr prekurzorů při automatické fragmentační analýze závislé na datech (DDA) a fragmentaci prekurzorů (peptidů), které jsou detekovány v MS spektru. Analýza DDA vybírá k fragmentaci a další analýze hlavně peptidy ve vysoké koncentraci. Peptidy, které jsou zastoupeny v nízké koncentraci a mají malou variabilní intenzitu v MS spektru, jsou díky náhodnému výběru a nedostatku měřicího času přeskočeny. Vysoký stupeň reprodukovatelnosti identifikace stejných proteinů u analýzy 30 frakcí může již být také vysvětlen dosažením dostatečného stupně zjednodušení komplexního vzorku směsi peptidů v jednotlivých frakcích umožňujícího ionizaci, detekci a fragmentaci většiny peptidů obsažených v dané analýze s dostatečnou koncentrací v daném vzorku.



Obr. 18 Porovnání reprodukovatelnosti opakovatelné identifikace stejných proteinů v jednotlivých experimentálních přístupech, 1) opakované jednotlivé „single-shot“ analýzy 2 ug komplexního vzorku, 2) opakované analýzy 20 µg komplexních vzorků Hela S3 rozdělené vždy do 7 frakcí z mikrogradientové frakcionace, 3) opakované analýzy 40 µg komplexních vzorků Hela S3 rozdělené vždy do 30 frakcí z HPLC-UV frakcionace.

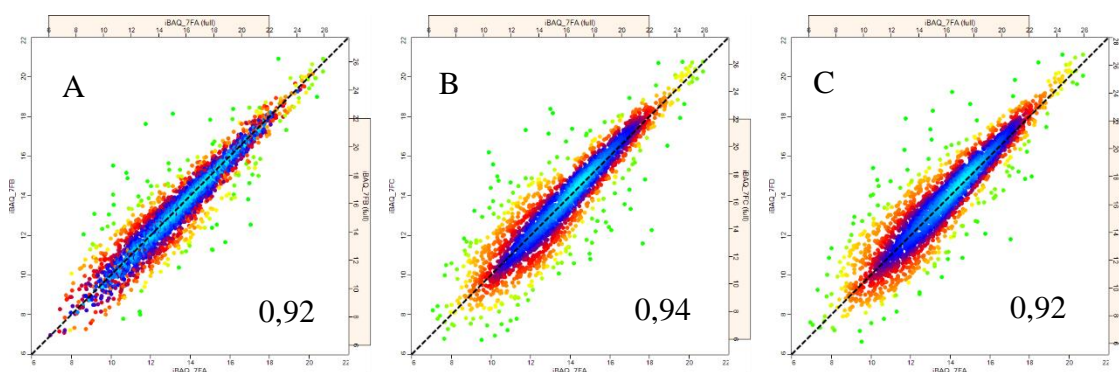
Kvantifikace peptidů metodou „label-free“ neboli bez značení a diferenční proteomická analýza různých vzorků probíhají na základě detekce molekulárních vlastností jednotlivých píků, tzv. „molecular features“, které reprezentují peptidy. Ze studie autorů Bantscheff a kolektiv (2007) víme, že MS spektra obsahují výrazně vyšší



Obr. 19 Distribuce unikátních identifikovaných peptidů z komplexního vzorku Hela S3 v jednotlivých frakcích mikrogradientu. Význam výskytu unikátních peptidů opakovaně pouze v jedné frakci je významný z hlediska „labelfree“ kvantifikace. Malé sloupce zobrazené mezi jednotlivými sloupci v pozicích 1-2-3-4-5-6-7 reprezentují počty peptidů detekovatelných ve více než jedné offline frakci, a to nejčastěji ve dvou nejbližších frakcích.

počet detekovatelných píků, které nejsou během procesu selekce a fragmentace analyzovány, což je důvod toho, že k nim nejsou identifikovány peptidy. Navíc se vyskytuje určité procento píků, které selekcí a fragmentací prošlo, avšak získaná fragmentační spektra nejsou dostatečně kvalitní, aby došlo ke spolehlivé identifikaci peptidů, v důsledku čehož nejsou přiřazeny k proteinům.

V diferenční analýze standardně využíváme k analýze změn „shotgun“ analýzu. Ta je založená na „single-shot“ analýze, tedy analýze komplexní směsi v rámci dlouhého gradientu. Jak již bylo zmíněno, LFQ kvantifikace vyžaduje detekci stejných molekulárních vlastností píků reprezentujících stejný peptid ve všech srovnávaných analýzách, tj. ve všech chromatogramech ve velmi podobném retenčním čase (Cox et al., 2014). V případě, že k tomu nedojde, nelze vypočítané charakteristiky píků reprezentující identifikovaný peptid využít ke kvantitativním účelům. Pro multidimenzionální separaci komplexní směsi peptidů je nezbytné zajistit co nejlepší reprodukovatelnost rozdělení peptidů do jednotlivých frakcí. Použití systému RP-RP za různých pH podmínek toto splňuje (Lau et al., 2011). Můžeme vidět, že více než 85 % všech unikátních peptidů



Obr. 20 Srovnání vypočtených hodnot iBAQ pro jednotlivé identifikované proteiny v rámci opakovaných frakcionací s využitím mikrogradientu; porovnávána jsou technická opakování reprezentující 4 vzorky peptidů z Hela S3, přičemž na ose X je vždy vynesena první analýza a ta je porovnávána s dalšími následnými analýzami a to takto: A) 1 analýza vs 2 analýza; B) 1 analýza vs 3 analýza; C) 1 analýza vs 4 analýza. Černá přerušovaná čára reprezentuje přímku se směrnici rovnou 1. Čím více se jednotlivé body blíží této přerušované čáře, tím lepší je reprodukovatelnost stanovení kvantitativních dat metody. Kvalitu reprodukovatelnosti také vyjadřuje hodnota Pearsonův korelační faktor, který je ve všech případech vyšší než 0,90.

identifikovaných ve frakcích rozdělených pomocí mikrogradientu do 7 frakcí je zahrnuto a identifikováno pouze v jedné frakci (Obr. 19).

Pomocí bodových grafů můžeme graficky zobrazit reprodukovatelnost stanovení obsahu proteinů v opakovaných analýzách vnesením stanovené absolutní kvantity proteinů vypočtené na základě intenzit peptidů iBAQ (intensity-based absolute quantification of proteins) v jednotlivých technických opakovaných frakcionacích a LC-MS/MS měřeních (Obr. 20). Reprodukovatelnost technických opakování nezávislých frakcionací vede k velmi podobným hodnotám, což se projevuje i na hodnotách Pearsonových korelačních faktorů v rozsahu od 0,92 – 0,94.

5 ZÁVĚR

Z experimentálních výsledků můžeme odvodit, že testovaná metoda kvantifikace peptidů metodou HPLC-UV, při které se využívá chromatografie na reverzní fázi, je vhodná a dá se využít pro detekci a kvantifikaci peptidů ve vzorcích různého typu. Avšak je důležité myslet na to, aby byla pro každý typ vzorku – jednotlivé vybrané peptidy, digesty jednotlivých proteinů nebo digesty komplexních směsí – vytvořena samostatná kalibrační závislost. Pro kvantifikaci vybraných jednotlivých peptidů je nutné mít standard analyzovaného peptidu. V horším případě je nutné využít jako standard strukturně velmi podobný peptid, jenž má nejlépe i stejné fyzikální a chemické vlastnosti. V případě jednotlivých proteinů je nutné připravit kalibrační závislost s využitím standardního proteinu s podobnou velikostí a fyzikálně-chemickými charakteristikami, jako budou mít kvantifikované proteiny ve vzorcích. Relativně nejjednodušší je příprava kalibrační závislosti pro vzorky obsahující peptidy z proteolytického štěpení komplexních směsí proteinů. Zde stačí připravit definovaný extrakt proteinů ze stejného typu materiálu, tento extrakt dobře zkvantifikovat na úrovni proteinů, pak reprodukovatelně naštěpit na peptidy a provést proměření kalibrační závislosti pro daný typ materiálu.

Hlavní náplní práce bylo otestovat mikrogradientovou frakcionaci za různých podmínek. Frakcionace za kyselých podmínek rozdělovala peptidy do frakcí v zásadě dle velikosti peptidů, protože s délkou peptidů rostla retence na reverzní fázi. Tento princip se však uplatňoval pouze u kyselé frakcionace a u bazické tomu tak nebylo. Jako nejvhodnější se tedy ukázala být frakcionace v prostředí hydrogenuhličitanu amonného o koncentraci 20 mM a pH 10, kdy docházelo k největší distribuci peptidů do frakcí, což mělo za následek i vyšší počet identifikací.

Nakonec se srovnávaly různé experimentální přístupy (jediná analýza, analýza 7 frakcí, analýza 30 frakcí) pro analýzu komplexních vzorků a na základě všech získaných a prezentovaných dat bylo zhodnoceno, že nejvhodnější experimentální uspořádání pro analýzu komplexních vzorků zajišťuje mikrogradientová frakcionace na RP-C18 fázi s bazickou mobilní fází o pH 10 v uspořádání popsaném v kapitole 3.3.5, která dělila peptidy do 7 frakcí. Toto uspořádání je vhodné jak z hlediska identifikace peptidů a proteinů, tak z hlediska kvantifikace pro cílenou diferenční proteomickou analýzu. Pro malé shrnutí mikrogradientovou frakcionací vzorku do 7 frakcí se počet identifikací dostal na 2782 proteinů, což je 2,9x vyšší počet oproti počtu získaného jedinou analýzou vzorku bez frakcionace, a 15066 peptidů, kde je počet oproti jediné

analýze bez frakcionace 3,8x vyšší. Také se snížil počet identifikovaných proteinů pouze jedním unikátním peptidem na 26 %. Analýza 30 frakcí v počtu identifikací vede k vyšším číslům než analýza 7 frakcí, avšak díky analýze tolika frakcí se dostala celková časová náročnost na 2550 minut, což je v mnoha případech rozhodující faktor při výběru vhodného přístupu pro analýzu velkého počtu komplexních proteomických vzorků.

6 LITERATURA

- Alpert A.J. (1990): Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography* **499**, 177-196.
- Bagag. A., Jault J.M., Sidahmed-Adrar N., Refregiers M., Giuliani A., Le Naour F. (2013): Characterization of hydrophobic peptides in the presence of detergent by photoionization mass spectrometry. *Plos One* **8**, e79033.
- Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007): Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1017-1031.
- Bassler B.J., Hartwick R.A. (1989): *Journal of Chromatographic Science* **27**, 162-165.
- Beck S, Michalski A, Raether O, Lubeck M, Kaspar, S, Goedecke N, Baessmann C, Hornburg D, Meier F, Paron I, Kulak NA, Cox J, Mann M. (2015): The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **14**, 2014–2029.
- Blackburn K., Cheng F.Y., Williamson J.D., Goshe M.B. (2010): Data-independent liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MSE) detection and quantification of the secreted *Apium graveolens* pathogen defense protein mannitol dehydrogenase. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**, 1009-1016.
- Boersema P.J., Divecha N., Heck A.J.R., Mohammed S. (2007): Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as an alternative MudPIT strategy. *Journal of Proteome Research* **6**, 937-946.
- 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.
- Braisted J.C., Kuntumalla S., Vogel C., Marcotte E.M., Rodrigues A.R., Wang R., Huang S.T., Ferlanti E.S., Saeed A.I., Fleischmann R.D., Peterson S.N., Pieper R. (2008): The APEX quantitative proteomics tool: Generating protein quantitation estimates from LC-MS/MS proteomics results. *BMC Bioinformatics* **9**, 529.
- Cantin G.T., Shock T.R., Park S.K., Madhani H.D., Yates III. J.R. (2007): Optimizing TiO₂-Based Phosphopeptide Enrichment for Automated Multidimensional Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **79**, 4666-4673.
- Cargile B.J., Bundy J.L., Stephenson J.L. (2004): Potential for false positive identifications from large databases through tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **3**, 1082-1085.
- Celis J.E., Ostergaard M., Rasmussen H.H., Gromov P., Gromova I., Varmark H., Palsdottir H., Magnusson N., Andersen I., Basse B., Lauridsen J.B., Ratz G., Wolf H., Orntoft T.F., Celis P., Celis A. (1999): A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer. *Electrophoresis* **20**, 300-309.
- Chakraborty A., Berger S.J. (2006): Optimization of reversed-Phase peptide liquid chromatography ultraviolet mass spectrometry analyses using an automated blending methodology. *Journal of Biomolecular Techniques* **16**, 327-335.
- Chelius D., Bondarenko P.V. (2002): Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **1**, 317-323.
- Chen Y.X., Mant C.T., Hodges R.S. (2003): Temperature selectivity effects in reversed-phase liquid chromatography due to conformation differences between helical and non-helical peptides. *Journal of Chromatography A* **1010**, 45-61.
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. (2011): Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *Journal of Proteome Research* **10**, 1794–1805.
- Cox J., Hein M.Y., Lubner C.A., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014): Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular and Cellular Proteomics* **13**, 2513-2526.

- Dayon L., Hainard A., Licker V., Turck N., Kuhn K., Hochstrasser D.F., Burkhard P.R., Sanchez J.C. (2008): Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Analytical Chemistry* **80**, 2921-2931.
- Delmotte N., Lasaosa M., Tholey A., Heinzle E., Huber C.G. (2007): Two-dimensional reversed-phase x ion-pair reversed-phase HPLC: An alternative approach to high-resolution peptide separation for shotgun proteome analysis. *Journal of Proteome Research* **6**, 4363-4373.
- Di Palma S., Hennrich M.L., Heck A.J.R., Mohammed S. (2010): Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *Journal of Proteomics* **75**, 3791-3813.
- Dolnik V., Liu S.R., Jovanovich S. (2000): Capillary electrophoresis on microchip. *Electrophoresis* **21**, 41-54.
- Dongre A.R., Eng J.K., Yates J.R. (1997): Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. *Trends in Biotechnology* **15**, 418-425.
- Dwivedi R.C., Spicer V., Harder M., Antonovici M., Ens W., Standing K.G., Wilkins J.A., Krokhin O.V. (2008): Practical implementation of 2D HPLC scheme with accurate peptide retention prediction in both dimensions for high-throughput bottom-up proteomics. *Analytical Chemistry* **80**, 7036-7042.
- Essader A.S., Cargile B.J., Bundy J.L., Stephenson J.L. (2005): A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. *Proteomics* **5**, 24-34.
- Evans C.R., Jorgenson J.W. (1978): Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**, 1952-1961.
- Fialka I., Pasquali C., Kurzbauer R., Lottspeich F., Huber L.A. (1999): Loss of epithelial polarity is accompanied by differential association of proteins with intracellular membranes. *Electrophoresis* **20**, 1122-1122.
- Florens L., Carozza M.J., Swanson S.K., Fournier M., Coleman M.K., Workman J.L., Washburn M.P. (2006): Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors. *Methods* **40**, 303-311.
- Forgács E., Cserhati T., Bordas B. (1993): Comparison of the retention behavior of phenol derivatives on porous graphitized and octadecylsilica columns. *Chromatographia* **36**, 19-26.
- 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 Sciences of the United States of America* **100**, 6940-6945.
- Geromanos S.J., Vissers J.P.C., Silva J.C., Dorschel C.A., Li G.Z., Gorenstein M.V., Bateman R.H., Langridge J.I. (2009): The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependent LC-MS/MS. *Proteomics* **9**, 1683-1695.
- Giddings J.C. (1984): Two-dimensional separation – concept and promise. *Analytical Chemistry* **56**, 1258.
- Gilar M., Olivova P., Daly A.E., Gebler J.C. (2005a): Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **77**, 6426-6234.
- Gilar M., Olivova P., Daly A.E., Gebler J.C. (2005b): Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in first and second separation dimensions. *Journal of Separation Science* **28**, 1694-1703.
- Gilbert M.T., Knox J.H., Kaur B. (1982): Porous glassy-carbon, a new columns packing material for gas-chromatography and high-performance liquid-chromatography. *Chromatographia* **16**, 138-148.
- Gingras A.C., Gstaiger M., Raught B., Aebersold R. (2007): Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 645-654.
- Gray M.J., Dennis G.R., Slonecker P.J., Shalliker R.A. (2003): Evaluation of the two-dimensional reversed-phase-reversed-phase separations of low-molecular mass polystyrenes. *Journal of Chromatography A* **1015**, 89-98.
- Griffin N.M., Yu J., Long F., Oh P., Shore S., Li Y., Koziol J.A., Schnitzer J.E. (2010): Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis. *Nature Biotechnology* **28**, 83-89.

- Gupta, N., Bandeira, N., Keich, U. & Pevzner, P. A. (2011): Target-decoy approach and false discovery rate: when things may go wrong. *Journal of America Society Mass Spectrometry* **22**, 1111–1120.
- Gustavsson S.A., Samskog J., Markides K.E., Langstrom B. (2001): Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *Journal of Chromatography A* **937**, 41-47.
- 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**, 994-999.
- Hajdich M., Casteel J.E., Tang S.X., Hearne L.B., Knapp S., Thelen J.J. (2007): Proteomic analysis of near-isogenic sunflower varieties differing in seed oil traits. *Journal of Proteome Research* **6**, 3232-3241.
- Heller M., Michel P.E., Morier P., Crettaz D., Wenz C., Tissot J.D., Reymond F., Rossier J.S. (2005): Two-stage Off-Gel (TM) isoelectric focusing: Protein followed by peptide fractionation and application to proteome analysis of human plasma. *Electrophoresis* **26**, 1174-1188.
- Hemstrom P., Irgum K. (2006): Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* **29**, 1784-1821.
- Herzler M., Herre S., Pragst F. (2003): Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2682 compounds. *Journal of Analytical toxicology* **27**, 233-242.
- Horth P., Miller C.A., Preckel T., Wenz C. (2006): Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Molecular and Cellular Proteomics* **5**, 1968-1974.
- Howard G.A., Martin A.J.P. (1950): The separation of the C12-C18 fatty acids by reversed-phase partition chromatography. *Biochemical Journal* **46**, 532-538.
- Hunter T.C., Andon N.L., Koller A., Yates J.R., Haynes P.A. (2002): The functional proteomics toolbox: methods and applications. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **782**, 165-181.
- Hupe K.P. (1985): Fundamental Chromatographic Relationships. In: *High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry*. (Henschen A., Hupe K.P., Lottspeich F., Voelter W., eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 1-14.
- Ishihama Y., Oda Y., Tabata T., Sato T., Nagasu T., Rappsilber J., Mann M. (2005): Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular and Cellular Proteomics* **4**, 1265-1272.
- Issaq H.J., Chan K.C., Janini G.M., Conrads T.P., Veenstra T.D. (2005): Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *Journal of Chromatography B* **817**, 35-47.
- Karch K., Sebastian I., Halasz I., Engelhardt H. (1976): Optimization of reversed-phase separations. *Journal of Chromatography* **122**, 171-184.
- Kaur B. (1990): The use of porous graphitic carbon in high-performance liquid-chromatography. *LC GC-Magazine of Separation Science* **8**, 468.
- Kirkland J.J., van Straten M.A., Claessens H.A. (1995): High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* **691**, 3-19.
- Kong R.P., Siu S.O., Lee S.S., Lo C., Chu I.K. (2011): Development of online high-/low-pH reversed-phase-reversed-phase two-dimensional liquid chromatography for shotgun proteomics: a reversed-phase-strong-cation exchange-reversed-phase approach. *Journal of Chromatography A* **1218**, 3681-3688.
- Kovacs J.A., Mant C.T., Kwok S.C., Osguthorpe D.J., Hodges R.S. (2006): Quantitation of the nearest-neighbour effects of amino acid side-chains that restrict conformational freedom of the polypeptide chain using reversed-phase liquid chromatography of synthetic model using reversed-phase liquid chromatography of synthetic model peptides with L- and D-amino acid substitutions. *Journal of Chromatography A* **1123**, 212-224.

- Kováts E. (1958): Gas-Chromatographische charakterisierung organischer verbindungen .1. retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta* **41**, 1915-1932.
- Kreimer S., Belov M.E., Danielson W.F., Levittsky L.I., Gorshkov M.V., Karger L., Ivanov A.R. (2016): Advanced precursor ion selection algorithms for increased depth of bottom-up proteomic profiling. *Journal of Proteome Research* **15**, 3563-3573.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam H.T., Jossierand J., Lion N., Girault H.H. (2007): Modeling the isoelectric focusing of peptides in an OFFGEL multicompartement cell. *Journal of Proteome Research* **6**, 1666-1676.
- Lau E., Lam M.P.Y., Siu S.O., Kong R.P.W., Chan W.L., Zhou Z.J., Huang J.R., Lo C., Chu I.K. (2011): Combinatorial use of offline SCX and online RP-RP liquid chromatography for iTRAQ-based quantitative proteomics applications. *Molecular Biosystems* **7**, 1399-1408.
- Law H.C.H., Kong R.P.W., Li M., Szeto S.S.W., Chu I.K. (2020): Implementation of a multiple-fraction concatenation strategy in an online two-dimensional high-/low-pH reversed-phase/reversed-phase liquid chromatography platform for qualitative and quantitative shotgun proteomic analyses. *Journal of Mass Spectrometry*, e4591.
- Lazar C., Gatto L., Ferro M., Bruley C., Burger T. (2016): Accounting for the multiple natures of missing values in label-free quantitative proteomics data sets to compare imputation strategies. *Journal of Proteome Research* **15**, 1116-1125.
- Li X., Wang W.Q., Chen J.J. (2015): From pathways to networks: Connecting dots by establishing protein-protein interaction networks in signaling pathways using affinity purification and mass spectrometry. *Proteomics* **15**, 188-202.
- Li Z., Adams R.M., Chourey K., Hurst G.B., Hettich R.L., Pan C.L. (2012): Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ orbitrap velos. *Journal of Proteome Research* **11**, 1582-1590.
- Liebler D.C. (2002): Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. Humana Press, Totowa, New Jersey, 198 stran.
- Listgarten J., Emili A. (2005): Statistical and computational methods for comparative proteomic profiling using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* **4**, 419-434.
- Liu C.I., Hsu K.Y., Ruaan R.C. (2006): Hydrophobic contribution of amino acids in peptides measured by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 9148-9154.
- Liu H., Lin D., Yates J.R. (2002): Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. *BioTechniques* **32**, 898.
- Liu H.B., Sadygov R.G., Yates J.R. (2004): A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical Chemistry* **76**, 4193-4201.
- Liu Y.M., Guo Z.M., Jin Y., Xue X.Y., Xu Q., Zhang F.F., Liang X.M. (2008): Click oligo(ethylene glycol): An excellent orthogonal stationary phase to C18 for two-dimensional reversed-phase/reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1206**, 153-159.
- Lovrić J. (2011): *Introducing Proteomics: from concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis*. 1st ed., Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom, 283 stran.
- Lu P., Vogel C., Wang R., Yao X., Marcotte E.M. (2007): Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nature Biotechnology* **25**, 117-124.
- Lundgren D.H., Hwang S.I., Wu L.F., Han D.K. (2010): Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Review of Proteomics* **7**, 39-53.
- Malerod H., Lundanes E., Greibrokk T. (2010): Recent advances in on-line multidimensional liquid chromatography. *Analytical Methods-UK* **2**, 110-122.
- Mallick P., Schirle M., Chen S.S., Flory M.R., Lee H., Martin D., Raught B., Schmitt R., Werner T., Kuster B., Aebersold R. (2007): eComputational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nature Biotechnology* **25**, 125-131.

- Manadas B., Mendes V.M., English J., Dunn M.J. (2010): Peptide fractionation in proteomics approaches. *Expert review of Proteomics* **7**, 655-663.
- Mant C.T., Burke T.W.L., Black J.A., Hodges R.S. (1988): Effect of peptide-chain length on peptide retention behavior in reversed-phase chromatography. *Journal of chromatography* **458**, 193-205.
- Mant C.T., Zhou N.E., Hodges R.S. (1989): Correlation of protein retention times in reversed-phase chromatography with polypeptide chain length and hydrophobicity. *Journal of Chromatography A* **476**, 363-375.
- Masters J.R. (2002): HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Review of Cancer* **2**, 315-319.
- Meek J.L. (1980): Prediction of peptide retention times in high-pressure liquid-chromatography on the basis of amino-acid-composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **77**, 1632-1636.
- Meyer V.R. (2010): *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 426 stran.
- Mihailova A., Malerod H., Wilson S.R., Karaszewski B., Hauser R., Lundanes E., Greibrokk T. (2008): Improving the resolution of neuropeptides in rat brain with on-line HLIC-RP compared to on-line SCX-RP. *Journal of Separation Science* **31**, 459-467.
- Mitulović G., Stingl C., Smoluch M., Swart R., Chervet J.P., Steinmacher I., Gerner C., Mechtler K. (2004): Automated, on-line two-dimensional nano liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid analysis of complex protein digests. *Proteomics* **4**, 2545-2557.
- Mooney B.P., Miernyk J.A., Greenlief C.M., Thelen J.J. (2006): Using quantitative proteomics of Arabidopsis roots and leaves to predict metabolic activity. *Physiologia Plantarum* **128**, 237-250.
- Moore A.W. a Jorgenson J.W. (1995): Comprehensive three-dimensional separation of peptides using size exclusion chromatography/reversed phase liquid chromatography/optically gated capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **67**, 3456-3463.
- Muszynska G., Andersson L., Porath J. (1986): Selective adsorption of phosphoproteins on gellimmobilized ferric chelate. *Biochemistry* **25**, 6850-6853.
- Naidong W., Shou W., Chen Y.L., Jiang X.Y. (2001): Novel liquid chromatographic-tandem mass spectrometric methods using silica columns and aqueous-organic mobile phases for quantitative analysis of polar ionic analytes in biological fluids. *Journal of chromatography B* **754**, 387-399.
- Neue U.D. (2000): Silica Gel and its derivatization for Liquid Chromatography. In: *Encyclopedie of Analytical Chemistry*. (Meyers R.A. ed), John Wiley & Sons, Chichester, 11450-11472.
- Norden A.G.W., Lapsley M., Igarashi T., Kelleher C.L., Lee P.J., Matsuyama T., Scheinman S.J., Shiraga H., Sundin D.P., Thakker R.V., Unwin R.J., Verroust P., Moestrup S.K. (2002): Urinary megalin deficiency implicates abnormal tubular endocytic function in Fanconi syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* **13**, 125-133.
- 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 and Cellular Proteomics* **1**, 376-386.
- Ostrove S. (1990): Affinity-chromatography – General methods. *Methods in Enzymology* **182**, 357-371.
- Paoletti A.C., Zybailov B., Washburn M.P. (2004): Principles and applications of multidimensional protein identification technology. *Expert of Review Proteomics* **1**, 275-282.
- Pappireddi N., Martin L., Wühr M. (2019): A review on quantitative multiplexed proteomics. *A European Journal of Chemical Biology* **20**, 1210-1224.
- Parker S.J., Halligan B.D., Greene A.S. (2010): Quantitative analysis of SILAC data sets using spectral counting. *Proteomics* **10**, 1408-1415.
- Patel D. (1993): Chromatographic fractionation media. In: *Biochemistry Labfax*. (Chambers J.A.A., Rickwood D., eds.), BIOS, Oxford, 49-68.
- Patterson S.D., Spahr C.S., Daugas E., Susin S.A., Irinopoulou T., Koehler C., Kroemer G. (2000): Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death and Differentiation* **7**, 137-144.

- Peng J.M., Elias J.E., Thoreen C.C., Licklider L.J., Gygi S.P. (2003): Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: The yeast proteome. *Journal of Proteome Research* **2**, 43-50.
- Perkins D.N., Pappin D.J.C., Creasy D.M., Cottrell J.S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Peterson A., Hohmann L., Huang L., Kim B., Eng J.K., Martin D.B. (2009): Analysis of RP-HPLC loading conditions for maximizing peptide identifications in shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research* **8**, 4161-4168.
- Petritis K., Kangas L.J., Ferguson P.L., Anderson G.A., Pasa-Tolic L., Lipton M.S., Auberry K.J., Strittmatter E.F., Shen Y.F., Zhao R., Smith R.D. (2003): Use of artificial neural networks for the accurate prediction of peptide liquid chromatography elution times in proteome analyses. *Analytical Chemistry* **75**, 1039-1048.
- Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A. (2002): *Biochemical Methods: A concise Guide for Students and Researchers*. 1st. ed., Wiley-VCH, Weinheim, 360 stran.
- Pinkse M.W., Uitto P.M., Hilhorst M.J., Ooms B., Heck A.J. (2004): Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-nanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Analytical Chemistry* **76**, 3935-3943.
- Podwojski K., Eisenacher M., Kohl M., Turewicz M., Meyer H.E., Rahnenfuhrer J., Stephan C. (2010): Peek a peak: a glance at statistics for quantitative label-free proteomics. *Expert Review of Proteomics* **7**, 249-261.
- Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M., Seraphin B. (2001): The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.
- Quiming N.S., Denola N.L., Ueta I., Saito Y., Tatematsu S., Jinno K. (2007a): Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on a diol column in hydrophilic interaction chromatography. *Analytica Chimica Acta* **598**, 41-50.
- Quiming N.S., Denola N.L., Saito Y., Jinno K. (2007b): Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on unmodified silica phase in hydrophilic interaction chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**, 1693-1706.
- Quiming N.S., Denola N.L., Bin Samsuri S.R., Saito Y., Jinno K. (2008): Development of retention prediction models for adrenoreceptor agonists and antagonists on a polyvinyl alcohol-bonded stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* **31**, 1537-1549.
- Radulovic D., Jelveh S., Ryu S., Hamilton T.G., Foss E., Mao Y.Y., Emili A. (2004): Informatics platform for global proteomic profiling and biomarker discovery using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* **3**, 984-997.
- Rappsilber J., Ryder U., Lamond A.I., Mann M. (2002): Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research* **12**, 1231-1245.
- Reese C.E., Huang L.Y., Hsu S.H., Tripathi S., Lochmuller C.H. (1996): Universal retention indices and their prediction in reversed-phase liquid chromatography based on principal component analysis and target testing. *Journal of Chromatographic Science* **34**, 101-110.
- Righetti P. (1983): *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*. 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 385 stran.
- Ross P.L., Huang Y.N., Marchese J.N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhász P., Martin S., Bartlett-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D.J. (2004): Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular and Cellular Proteomics* **3**, 1154-1169.
- Schägger H. a 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**, 368-379.
- See Y.P. a Jackowski G. (1989): Estimating molecular weights of polypeptides by SDS PAGE. In: *Protein Structure*. (Creighton T.E. ed.), IRL Press, Oxford, 1-21.

- Sereda T.J., Mant C.T., Hodges R.S. (1995): Selectivity due to conformational differences between helical and non-helical peptides in reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography A* **695**, 205-221.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* **68**, 850-858.
- Silva J.C., Denny R., Dorschel C.A., Gorenstein M., Kass I.J., Li G.Z., McKenna T., Nold M.J., Richardson K., Young P., Geromanos S. (2005): Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Analytical Chemistry* **77**, 2187-2200.
- Silva J.C., Denny R., Dorschel C., Gorenstein M.V., Li G.Z., Richardson K., Wall D., Geromanos S.J. (2006a): Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the Escherichia coli proteome – A sweet tale. *Molecular and Cellular Proteomics* **5**, 589-607.
- Silva J.C., Gorenstein M.V., Li G.Z., Vissers J.P.C., Geromanos S.J. (2006b): Absolute quantification of proteins by LCMSE – A virtue of parallel MS acquisition. *Molecular and Cellular Proteomics* **5**, 144-156.
- Song C., Ye M., Han G., Jiang X.N., Wang F.J., Yu Z.Y., Chen R., Zou H.F. (2010): Reversed-phase-reversed-phase liquid chromatography approach with high orthogonality for multidimensional separation of phosphopeptides. *Analytical Chemistry* **82**, 53-56.
- Stellwagen E. (1990): Gel filtration. *Method in Enzymology* **182**, 317-328.
- Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Shevchenko A. (2006): Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959-2963.
- Tabb D.L., McDonald W.H., Yates J.R. (2002): DTASelect and contrast: Tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research* **1**, 21-26.
- Thelen J.J. (2009): Proteomics tools and resources for investigating protein allergens in oilseeds. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **54**, 541-545.
- Tolonen A.C. a Haas W. (2014): Quantitative proteomics using reductive dimethylation for stable isotope labeling. *Jove-Journal of Visualized Experiments*.
- Tyanova, S., Temu, T., Cox, J. (2016): The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Proteomics* **11**, 2301–2319.
- Vissers J.P.C. (1999): Recent developments in microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **856**, 117-143.
- Vollmer M., Horth P., Nagele E. (2004): Optimization of two-dimensional off-line LC/MS separations to improve resolution of complex proteomic samples. *Analytical Chemistry* **76**, 5180-5185.
- Volters D.A., Washburn M.P., Yates J.R. (2001): An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical Chemistry* **73**, 5683-5690.
- Von Stechow L., Francavilla C., Olsen J.V. (2015): Recent findings and technological advances in phosphoproteomics for cells and tissues. *Expert Review of Proteomics* **12**, 469-487.
- Wagner K., Miliotis T., Marko-Varga G., Bischoff R., Unger K.K. (2002): An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. *Analytical Chemistry* **74**, 809-820.
- Wang N., Tang Y.N., Chen L., Li L. (2014): Microbore liquid chromatography ultraviolet detection for quantification of total peptide amount and its application for assessing sample quality in shotgun proteome analysis of hundreds of cells. *Journal of Chromatography A* **1338**, 51-57.
- Wang Y., Gu X., Zhang J., Zhang X.M. (2005): Prediction of peptide retention in RP-LC. *Chromatographia* **62**, 385-392.
- Wang Y.X., Yang F., Gritsenko M.A., Wang Y.C., Clauss T., Liu T., Shen Y.F., Monroe M.E., Lopez-Ferrer D., Reno T., Moore R.J., Klemke R.L., Camp D.G., Smith R.D. (2011): Reversed-phase chromatography with multiple fraction concatenation strategy for proteome profiling of human MSF10A cells. *Proteomics* **11**, 2019-2026.
- Washburn M.P., Wolters D., Yates J.R. (2001): Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* **19**, 242-247.

- Webb-Robertson B.J.M., Wiberg H.K., Matzke M.M., Brown J.N., Wang J., McDemott J.E., Smith R.D., Rodland K.D., Metz T.O., Pounds J.G., Waters K.M. (2015): Review, evaluation and discussion of the challenges of missing value imputation for mass spectrometry-based label-free global proteomics. *Journal of Proteome Research* **14**, 1993-2001.
- Wei J., Sun J., Yu W., Jones A., Oeller P., Keller M., Woodnutt G., Short J.M. (2005): Global proteome discovery using an online three-dimensional LC-MS/MS. *Journal of Proteome Research* **4**, 801-808.
- Wei R.M., Wang J.Y., Su M.M., Jia E., Chen S.Q., Chen T.L., Ni Y. (2018): Missing value imputation approach for mass spectrometry-based metabolomics data. *Scientific Reports* **8**, 663.
- Westermeier R., Naven T., Höpker H.R. (2008): *Proteomics in Practise: A Guide to Successful Experimental Design*. 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 482 stran.
- Wolters D.A., Washburn M.P., Yates J.R. (2001): An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical Chemistry* **73**, 5683-5690.
- Wu Q., Yuan H., Zhang L., Zhang Y. (2012): Recent advances on multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics: From qualitative to quantitative analysis-A review. *Analytica Chimica Acta* **731**, 1-10.
- Wuhr M., Haas W., McAlister G.C., Peshkin L., Rad R., Kirschner M.W., Gygi S.P. (2012): Accurate multiplexed proteomics at the MS2 level using the complement reporter ion cluster. *Analytical Chemistry* **84**, 9214-9221
- Zhou F., Sikorski T.W., Ficarro S.B., Webber J.T., Marto J.A. (2011): Online nanoflow reversed phase-strong cation exchange-reversed phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry platform for efficient and in-depth proteome sequence analysis of complex organism. *Analytical Chemistry* **83**, 6996-7005.
- Zhou H., Dai J., Sheng Q.H., Li R.X., Shieh C.H., Guttman A., Zheng R. (2007): A fully automated 2-D LC-MS method utilizing online continuous pH and RP gradients for global proteome analysis. *Electrophoresis* **28**, 4311-4319.
- Zhou N.E., Mant C.T., Hodges R.S. (1990): Effect of preferred binding domains on peptide retention behavior in reversed-phase chromatography: amphipathic alpha-helices. *Peptide Research* **3**, 8-20.
- Zybailov B., Mosley A.L., Sardi M.E., Coleman M.K., Florens L., Washburn M.P. (2006): Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Proteome Research* **5**, 2339-2347.
- Zybailov B.L., Florens L., Washburn M.P. (2007): Quantitative shotgun proteomics using a protease with broad specificity and normalized spectral abundance factors. *Molecular Biosystems* **3**, 354-360.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMRT	retenční čas přesné hmoty (z anglického accurate-mass retention-time)
APEX	absolutní proteinová exprese (z anglického absolute protein expression)
AUC	plocha pod křivkou (z anglického area under the curve)
DDA	fragmentační analýza závislá na hmotnostních datech prekurzorů (z anglického data-dependent analysis)
2-DE	dvoudimenzionální elektroforéza (z anglického two-dimensional electrophoresis)
2D-HPLC	dvoudimenzionální vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického two-dimensional high pressure liquid chromatography)
DIA	fragmentační analýza nezávislá na hmotnostních datech prekurzorů (z anglického data independent analysis)
DIGE	diferenční gelová elektroforéza (z anglického differential gel electrophoresis)
emPAI	exponencionálně modifikovaný abundantní index proteinu (z anglického exponentially modified protein abundance index)
ESI	ionizace elektrosprejem (z anglického electrospray ionization)
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (z anglického hydrophilic interaction liquid chromatography)
HILIC-RP	dvoudimenzionální chromatografie v první dimenzi s hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií a v druhé dimenzi s chromatografií na reverzní fázi (z anglického hydrophilic interaction liquid chromatography-reversed phase chromatography)
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (z anglického high resolution mass spectrometry)
iBAQ	absolutní kvantity proteinů vypočtené na základě intenzit peptidů (z anglického intensity-based absolute quantification of proteins)
ICAT	izotopově-kódovaná afinitní značka (z anglického isotope coded affinity tag)
ITRAQ	isobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci (z anglického isobaric tags for relative and absolute quantitation)
IEF	izoelektrická fokusace (z anglického isoelectric focusing)
IEX	ionexová neboli iontoměničová chromatografie (z anglického ion exchange chromatography)
IMAC	chelatační afinitní chromatografie (z anglického immobilized metal affinity chromatography)

LCMS ^E	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s kolísavou kolizní energií (z anglického liquid chromatography-mass spectrometry-elevated energy)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z anglického liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry)
MALDI	ionizace laserem za využití matrice (z anglického matrix assisted laser desorption/ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického mass spectrometry)
MudPIT	technologie multidimenzionální proteinové identifikace (z anglického multidimensional protein identification technology)
NSAF	normalizovaný spektrální abundanční faktor (z anglického normalized spectral abundance factor)
Q-TOF	hmotnostní spektrometr s quadrupólem v tandemu s průletovým analyzátozem (z anglického quadrupole-Time of Flight)
PAI	abundanční index proteinu (z anglického protein abundance index)
PGC	porézní grafitizovaný uhlík (z anglického porous graphitic carbon)
RP	chromatografie na reverzní fázi (z anglického reversed-phase chromatography)
RP-LC	chromatografie na reverzní fázi (z anglického reversed-phase liquid chromatography)
RP-RP	dvoudimenzionální chromatografie v obou dimenzích s chromatografií na reverzní fázi (z anglického reversed-phase chromatography-reversed-phase chromatography)
SCX	katexová výměnná chromatografie (z anglického strong cation exchange)
SCX-RP	dvoudimenzionální chromatografie v první dimenzi s katexovou výměnnou chromatografií a v druhé dimenzi s chromatografií na reverzní fázi (z anglického strong cation exchange-reversed-phase chromatography)
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (z anglického sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis)
SILAC	stabilní izotopové značení aminokyselin v buněčných kulturách (z anglického stable isotope labeling by amino acids i cell culture)
SPC	sčítání spekter (z anglického spectral counting)
TMT	tandemová hmotnostní značka (z anglického tandem mass tag)
TOF	průletový analyzátozem (z anglického Time-of-Flight)