

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



## **Proteomika cervikálního hlenu**

**Diplomová práce**

**Bc. Vendula Rašková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

**Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Oždian**

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že předloženou diplomovou práci jsem vypracovala samostatně za použití citované literatury“

V Olomouci dne 23. 7. 2015

Bc. Vendula Rašková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Tomáši Oždianovi, Ph.D. za uvedení do problematiky, předané znalosti, cenné rady, připomínky, trpělivost, přátelské jednání a pomoc s vypracováním této diplomové práce. Ráda bych poděkovala Mgr. Dušanu Holubovi a Mgr. Janě Václavkové za pomoc s experimentální částí této práce. Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. bych chtěla poděkovat za pomoc s vyhodnocením statistické části práce. V neposlední řadě chci poděkovat docentu Dostálovi za uvedení do problematiky, cenné rady a poskytnutí vzorků pro zkoumání.

## **Souhrn**

Cílem diplomové práce je vývoj a optimalizace proteomické hmotnostně-spektrometrické analýzy cervikálního hlenu pro budoucí rutinní analýzu a statistická analýza se zaměřením hledání markeru receptivity endometria. K prostudování proteinů byly použity metody FASP separace, přečištění na C18 koloně ve špičkách, analýza Orbitrap Elite. Výsledky byly zpracovány softwary MaxQuant, Perseus a Bioconductor R project.

Analýza optimalizovanou metodou se provedla na 11 vzorcích cervikálního hlenu, u nichž byla známá úspěšnost či neúspěšnost in vitro fertilizace. Hodnoty intenzit byly měřeny u každého vzorku třikrát. Tyto triplety se statisticky vyhodnotily a byla vytvořena heat mapa zastoupení 29 proteinů v jednotlivých vzorcích a zároveň v jednotlivých tripletech, jejichž výskyt byl ovlivněn graviditou.

Na heat mapě jsou rozeznatelné proteiny, jež se vyskytovaly převážně u pacientek, jimž se podařilo otěhotnět. Výskyt těchto proteinů se v jednotlivých vzorcích lišil a byl také odlišný i v rámci tripletu vzorku. Mezi proteiny identifikovaných u gravidních pacientek patřily: calpain, galectin, hypoxia up-regulated protein 1, aldo-keto reductasa a kallistatin.

## Summary

The aim of this thesis is examine and optimalization of mass spectrometric proteomic profiling cervical mucus for the routine analysis and statistic research specialized on loading for the endometrium receptivity markers. Proteins were studied with the FASP separation, purification on C18 Stage Tips and Orbitrap Elite analysis. Results were processed by MaxQuant, Perseus and Bioconductor R project software.

I used the optimized analysis on 11 samples of cervical mucus, which are known for their role in success/failure in vitro fertilization. Point on the scale of intensity of each sample was measured three times. These triplets were statistically evaluated and then the heat map of pattern representation of 29 proteins in each sample and each triplet created.

We can recognize certain proteins in the samples of patients, who were successful in their effort of getting pregnant. These proteins we can see in the heat map and the way of their appearance is different not only in the individual samples, but also on the triplets of samples in question. The group of proteins which were identified in the samples of pregnant patients contains following ones: calpallin, galectin, hypoxia up-regulated protein 1, aldo-keto reductase and kallistatin.

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Současný stav řešené problematiky .....	9
2.1. Reprodukční anatomie ženy.....	9
2. 1. 1. Cervikální hlen.....	13
2. 2. Proteomika .....	19
2. 2. 1. Metody používané v proteomice.....	20
3. Cíl práce.....	22
4. Experimentální část.....	23
4. 1. Materiál.....	23
4. 1. 1. Biologický materiál.....	23
4. 1. 2. Přístrojové vybavení .....	23
4. 1. 3. Chemikálie .....	24
4. 1. 4. Roztoky.....	24
4. 1. 5. Software .....	25
4. 2. Metodika .....	25
4. 2. 1. Zpracování odebraného vzorku cervikálního hlenu.....	25
4. 2. 2. Optimalizace rozpouštění .....	26
4. 2. 3. Měření obsahu proteinů .....	26
4. 2. 3. 1. Direct Detect spektrometr.....	26
4. 2. 3. 2. Pierce Assay.....	27
4. 2. 3. 3. Spektrofotometr NanoDrop .....	28
4. 2. 4. Optimalizace digesce .....	28
4. 2. 4. 1. In solution digesce .....	28
4. 2. 4. 2. Štěpení proteinů na membráně .....	29
4. 2. 4. 3. Frakcionace peptidové směsi .....	30

4. 2. 5. Analýza na Orbitrapu Elite .....	32
4. 2. 6. Statistické zpracování výsledků.....	33
5. Výsledky .....	34
5. 1. Optimalizace rozpouštění .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5. 2. Optimalizace měření obsahu proteinů .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5. 3. Optimalizace digesce .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5. 4. Optimalizovaná metoda měření .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5. 5. Statistické zpracování .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
6. Diskuse.....	35
7. Závěr .....	36
8. Literatura.....	37
9. Seznam použitých zkratk .....	46

## 1. Úvod

Tato diplomová práce se zabývá studiem cervikálního hlenu, ten vyplňuje děložní hrdlo, kde působí jako ochranná bariéra a je vylučován do pochvy (Andersch-Björkman a kol., 2007). V průběhu reprodukčního cyklu se mění složení i struktura hlenu. Během ovulace dochází k růstu hladiny estrogenu, což má za následek stimulaci a větší prokrvení endometria. To je pak připraveno pro přijetí vajíčka (Cambell a Reece, 2008). Estrogen také indukuje větší hydrataci hlenu. Hlen obsahuje více vody, má sníženou viskozitu, elasticitu a je prostupnější pro spermie (Carlstedt a kol., 1983). Struktura cervikálního hlenu je dobře prostudována, o jeho složení však moc informací není. Diplomová práce je zaměřena na studium proteinů cervikálního hlenu. Zajímala mě odpověď, zda se nějak liší exprese proteinů v hlenu těhotné a netěhotné pacientky a zda existují markery pro receptivitu endometria. Ve spolupráci s porodnicko-gynekologickou klinikou fakultní nemocnice v Olomouci jsme vyvinuli a optimalizovali hmotnostně-spektrometrickou analýzu, jež je vhodná pro budoucí rutinní analýzu proteinového složení hlenu a stanovení receptivity endometria pomocí markerů.



## 2. Současný stav řešené problematiky

### 2.1. Reprodukční anatomie ženy

Ženské pohlavní orgány jsou děleny na zevní a vnitřní rodidla. Mezi zevní rodidla se řadí hrma, velké a malé stydké pysky, poševní předsíň, klitoris, panenská blána, vestibulární žlázy a hráz. K vnitřním rodidlům se počítá pochva, děloha se závěsným a podpurným aparátem, vejcovody a vaječníky (Kudela, 2008). Diplomová práce se zabývá děložním čípkem, který patří k vnitřním rodidlům, proto zde nebudou zevní rodidla popisována.

Vývoj vnitřních pohlavních orgánů souvisí s diferenciací Müllerových a Wolfových vývodů. Wolfovy vývody, jež jsou ontogeneticky a fylogeneticky starší, u ženy zanikají a vznikají z nich ureterální pupeny, z nichž vzniká ledvinná pánvička, uretery a trigonum močového měchýře. Podél Wolfových vývodů rostou a diferencují se vývody Müllerovy (Kudela, 2008). Z nich během embryonálního a fetálního vývoje ženského plodu vznikají vejcovody, děloha a horní třetina pochvy (Langman a Sadler, 2012).

**Děloha** (*uterus, hystera*) je dutý orgán se silnou svalovou stěnou, vystlaný mukózou, ve kterém dochází k uchycení embrya a následně až do porodu k vývoji zárodku. Děloha má hruškovitý tvar, kaudálně se zužuje a nahoře je laterálně vytažena v rohy děložní (Čihák, 2013) Nachází se v malé pánvi mezi močovými měchýřem a rektum. Je 7-8 cm dlouhá a 5 cm široká v horní části u děložních rohů (Kudela, 2008). Během menstruace a těhotenství dochází ke zvětšení dělohy (Čihák, 2013). Skládá se ze tří částí: tělo děložní (*corpus uteri*), hrdlo děložní (*cervix uteri*) a úžina (*isthmus*).

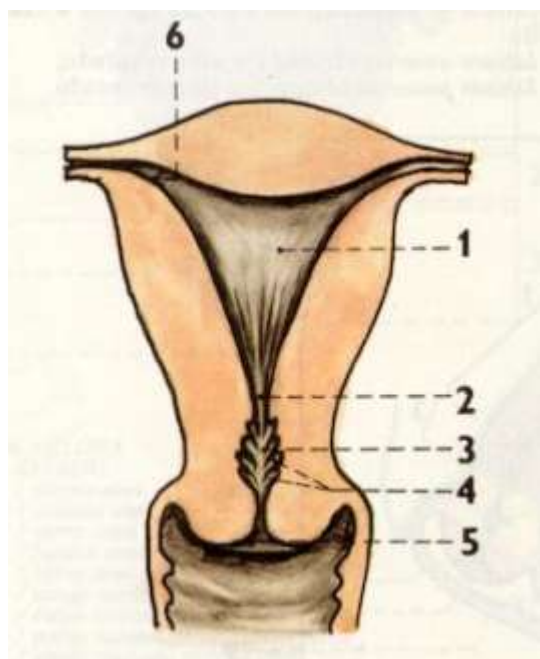
U dospělé ženy je **děložní tělo** k děložnímu hrdlu v poměru 2:1, u dětí je tento poměr 1:1 nebo 1:2. Děloha je tvořena přední a zadní stěnou, jež se v okrajích spojují v hrany děložní a v horní části přechází v rohy děložní, ze kterých odstupují vejcovody (Kudela, 2008).

**Děložní hrdlo** má válcovitý tvar a směrem od dělohy k pochvě se kónicky zužuje (Kudela, 2008). Hrdlo je poševním úponem rozděleno na několik částí. Horní úsek děložního hrdla nese jméno *portio supravaginalis*. Dolní konický a zaoblený úsek hrdla se nazývá *portio vaginalis*. Tato část hrdla vyčnívá do dutiny pochvy.

Zevní branka děložní (*ostium uteri*) se nachází uprostřed vrcholu čípku a je to otvor děložní dutiny do vaginy, který je nápadně ohraničen (Čihák, 2013).

**Úžina dělohy** je pruh mezi děložním tělem a hrdlem, tato úžina má funkční význam pouze v těhotenství a během porodu (Kudela, 2008).

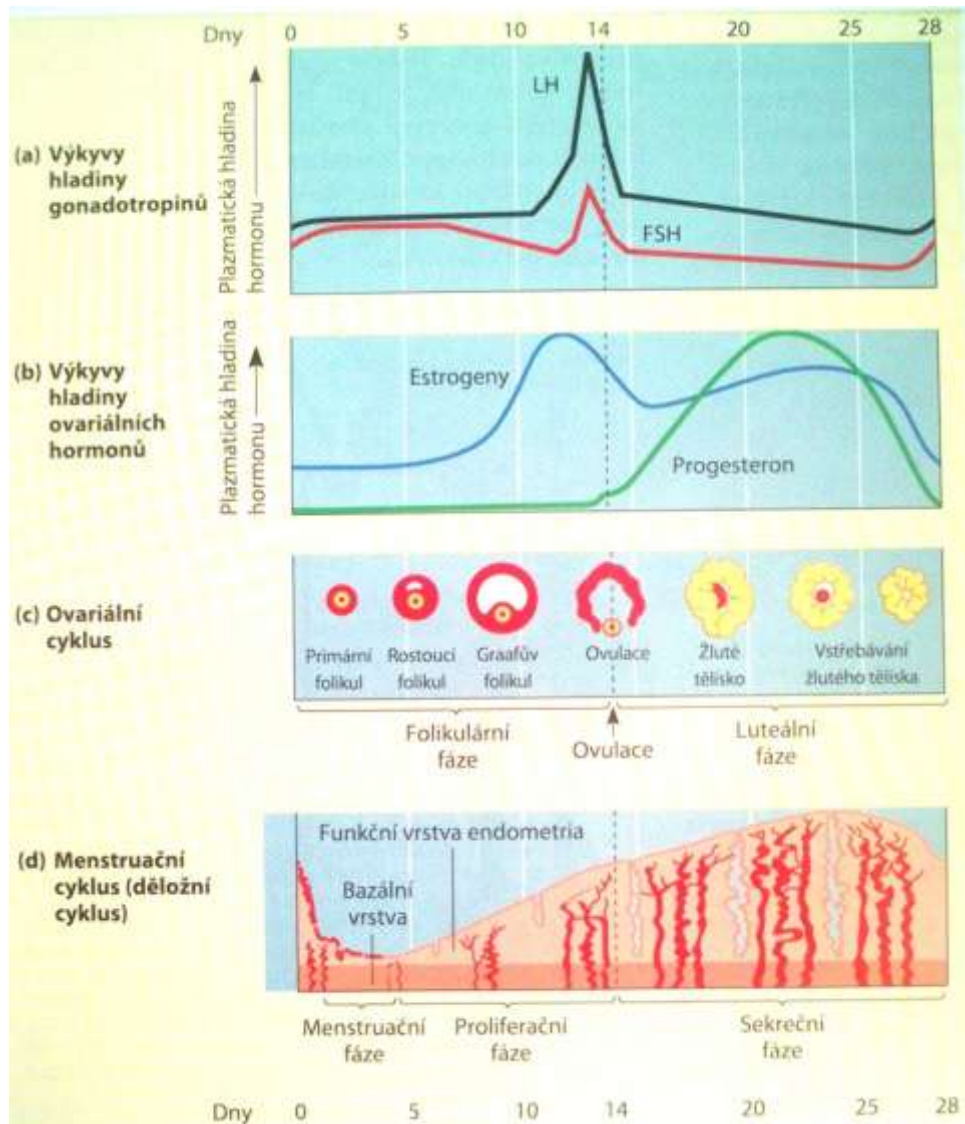
**Dutina děložní** (*cavum uteri*) je vystlána sliznicí, má trojúhelníkový tvar, kdy dva vrcholy trojúhelníku jsou nasměrovány do rohů děložních (obr. 1). Pokračováním dutiny děložní je kanál hrdla děložního (*canalis cervicis*). Mezi tělem a hrdlem děložním se děloha zužuje, toto velmi těsné zúžení se nazývá vnitřní branka děložní (*canalis isthmi*). Sliznice je hustě zřasena (*plicae palmatae*) a nachází se zde také slizniční žlázy (*glandulae cervicales*), jejichž sekret vyplňuje vnitřní branku děložní (Čihák, 2013).



Obr. 1: Schéma dutiny děložní. 1 - dutina děložní; 2 - vnitřní branka děložní; 3 - kanál děložního hrdla; 4 - řasnatý epitel; 5 - zevní branka děložní; 6 - vnitřní ústí vejcovodu v děložním rohu (převzato Čihák, 2013)

Stěna dělohy je tvořena sliznicí (endometrium), svalovinou (myometrium) a serózní vrstvou (perimetrium). **Endometrium** má šedorůžovou barvu, je pevně srostlé se svalovinou a je složeno ze slizničního vaziva a epitelu (Čihák, 2013). Na povrchu je kryto jednovrstevným cylindrickým epitelem s řasinkami. Slizniční

vazivo je řídké a spolu s epitelem obsahuje děložní žlázy (Kudela, 2008). Ty se skládají z tubulů a zasahují až do svaloviny. Endometrium prochází v průběhu cca 28 dnů charakteristickými změnami, kterým říkáme menstruační cyklus (obr. 2). Tento cyklus začíná být pravidelný u dívek v pubertě okolo 13. - 14. roku. Endometrium má dvě vrstvy, tenčí bazální vrstvu (zona basalis), jež se v průběhu menstruačního cyklu nemění a funkční vrstvu (zona functionalis), která prochází v několika fázích změnami (Čihák, 2013). V menstruační fázi dochází k odloučení převážné části funkční vrstvy, která odchází s menstruační krví z těla. Následuje proliferační fáze, ve které se funkční vrstva začíná opět obnovovat a zvětšovat se. V poslední sekreční fázi endometrium roste, je prokrvenější a vyvíjejí se žlázy produkující cervikální hlen. Jestliže v sekreční fázi nedojde k implantaci zárodku do děložní sliznice, začíná nový menstruační cyklus. Současně s menstruačním cyklem probíhá ovariální cyklus. Oba tyto cykly jsou koordinovány pěti hormony: gonadotropin spouštěcí hormon, folikuly stimulující hormon (FSH), luteinizační hormon (LH), estrogeny a progesteron. Estrogeny a progesteron způsobují zbytnění endometria a podporují tvorbu cervikálního hlenu (Campbell a Reece, 2008).



Obr. 2: Reprodukční cyklus ženy. Hormony ženy koordinují menstruační a ovariální cykly a připravují endometrium před ovulací na implantaci embrya. a) Změny v hladinách LH a FSH. b) Změny v hladinách estrogenů a progesteronů. c) Ovariální cyklus je složen z několika fází. Během folikulární fáze dochází k růstu folikul, vylučují se estrogeny. Další je ovulace a luteální fáze, kdy žluté tělísko vylučuje estrogeny a progesteron. d) Menstruační cyklus je složen z menstruační, proliferační a sekreční fáze. K menstruaci a odloučení endometria dojde v menstruační fázi, v proliferační fázi estrogeny rostoucího folikulu stimulují endometrium, které začíná být více prokrvené. V sekreční fázi endometrium roste a to především díky vysoké přítomnosti estrogenů a progesteronů, jež jsou vylučovány žlutým tělískem. Tato fáze probíhá současně s luteální fází ovariálního cyklu. Vstřebáváním žlutého tělíska a snížením množství estrogenů a progesteronů dochází k odloučení endometria. V případě těhotenství jsou udrženy vysoké hladiny hormonů a k odloučení endometria nedochází (převzato Cambell a Reece, 2008).

**Myometrium** (svalovina dělohy) je tlustá 1-1,5 cm a je složena ze snopců hladké svaloviny, prostoupených vazivem (Čihák, 2013). Svalovina je uložena ve třech vrstvách. Vlákna zevní a vnitřní vrstvy probíhají podélně. Vlákna střední vrstvy probíhají cirkulárně a spirálně. Tato vrstva je nejmohutnější. Takto uspořádaná svalová vlákna umožňují zvětšení dělohy v těhotenství (Kudela, 2008).

**Perimetrium** je vnější vrstva dělohy, která po stranách přechází do širokého vazivového obalu, který se v oblasti hrdla děložního zesiluje a tvoří závěsný aparát dělohy (Čihák, 2013).

### **2. 1. 1. Cervikální hlen**

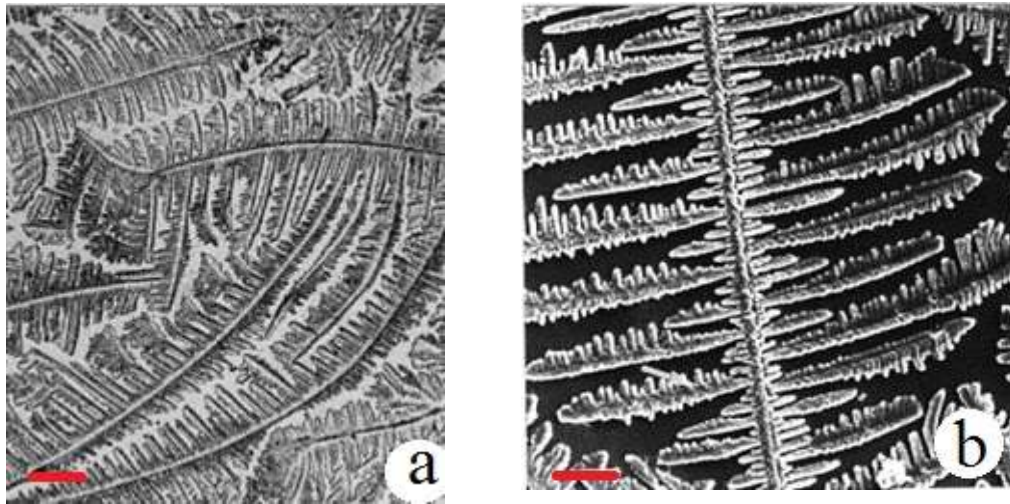
Cervikální hlen vyplňuje děložní hrdlo, zde působí jako ochranná bariéra zabráňující patogenům vstup z pochvy do dělohy. Hlen je vylučován do pochvy, kde zachycuje mikroorganismy a pomáhá jejich vylučování z těla (Andersch-Björkman a kol., 2007). Pomáhá regulovat průnik spermií do dělohy, má kyselé pH, zvlhčuje děložní čípek a zabráňuje jeho vysychání, čímž zpomaluje jeho enzymatickou degradaci (Habte a kol., 2008). Cervikální hlen je tvořen v době ovulace z 95-99% vodou, ale také obsahuje komplexní směs organických látek, anorganických iontů, enzymů, proteinů a bakteriocidních plazmatických proteinů mucinů (Andersch-Björkman a kol., 2007). V těhotenství se vytvoří cervikální zátka, jež chrání plod před patogeny a infekcí (Becher a kol., 2008).

Během ovulace, estrogény indukují větší hydrataci hlenu, což má za následek sníženou viskozitu a elasticitu hlenu. Tento hlen je dobře prostupný pro spermie. V sekreční fázi menstruačního cyklu hlen obsahuje méně vody a poskytuje účinnou bariéru vůči spermiím. Na této strukturní změně se spolu s hormony podílí také glykoproteiny muciny (Carlstedt a kol., 1983). Ke změně sekrece cervikálního hlenu dochází působením hormonální antikoncepce, kdy dochází k potlačení tvorby gonadotropinů. Hormonální antikoncepce obsahuje progesterony, jež působí na endometrium a snižují pravděpodobnost nidace vajíčka (příbalová informace Lindynette 20, 2014).

**Muciny** jsou velké polymerní molekuly, jež jsou zodpovědné za viskozitu a elasticitu hlenu (Andersch-Björkman a kol., 2007). Na základě fyzikálních vlastností rozlišujeme muciny sekreční a membránové. Membránové muciny jsou silně glykosylované a poskytují selektivní bariéru, jež chrání povrch děložní sliznice, na němž se vyskytují (Idris a Carraway, 1999). Muciny je kvůli jejich velikosti, polymerní povaze a heterologní glykosylaci těžké charakterizovat. Tyto multimery jsou spojeny disulfidovými vazbami a složeny z monomerů bílkovin větších jak 500 kDa. Muciny obsahují velkou mucinovou doménu (PTS), která je bohatá na aminokyseliny serin, threonin a prolin a poskytují velké množství vazebných míst pro O-vázané sacharidy. Hlavní složkou cervikálního hlenu je MUC4 a MUC5B, jejichž množství se mění v průběhu menstruačního cyklu (Andersch-Björkman a kol., 2007). V sekreční fázi menstruačního cyklu roste hladina progesteronu a klesá MUC5B (Argüeso a kol., 2002).

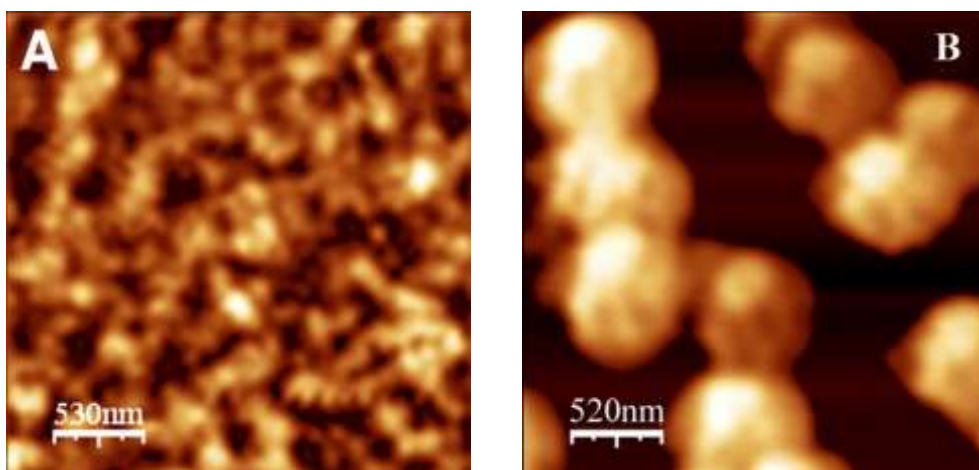
Cervikální hlen obsahuje různé druhy enzymů: amylázy, alkalické fosfatázy, aminopeptidáza, laktátdehydrogenáza a peroxidáza. Koncentrace těchto enzymů prudce klesá před ovulací a po ovulaci díky působení progesteronu v sekreční fázi zase prudce roste (Moriyama a kol., 1999).

První studie cervikálního hlenu byly provedeny pomocí **světelné mikroskopie** a nukleární magnetické rezonance, kdy bylo zjištěno, že cervikální hlen není homogenní, ale heterogenní. Je složen ze čtyř různých typů sekretů, kdy každý typ je sekretován ve specifické oblasti děložního čípku (Menárquez a kol., 2003). Při studiu hlenu světelnou mikroskopií se hlen nanese na sklíčko, nechá se vysušit a sleduje se charakteristická kapradinová krystalizace solí (obr. 3; Brunelli a kol., 2007). Světelnou mikroskopii nahradila **rastrovací elektronová mikroskopie**, která umožňuje lepší vysušení hlenu na sklíčku a podrobnější pozorování molekulové struktury hlenu (Menárquez a kol., 2003).



Obr. 3: a) světelná mikroskopie vysušeného vzorku cervikálního hlenu (měřítko - 208  $\mu\text{m}$ ); b) rastrovací elektronová mikroskopie vysušeného vzorku cervikálního hlenu (měřítko = 60 $\mu\text{m}$ ; převzato Menárquez, 2003)

Další metodou studia cervikálního hlenu byla **polarizační mikroskopie**, která byla zaměřena na anizotropní struktury sodných a draselných sulfátů. Ani tato metoda však nedokázala lépe charakterizovat strukturu mucinů. Jejich změnu v průběhu cyklu dokázala popsat **mikroskopie atomárních sil** ve vodném prostředí. Bylo zjištěno, že v době před ovulací nemá hlen hustou vláknitou strukturu, ale je složen z rozptýlených kuliček mucinových molekul (obr. 4). Přechod z kulovité struktury do husté vláknité je ovlivněn snížením pH (Brunelli a kol., 2007).



Obr. 4: A) struktura cervikálního hlenu před ovulací; B) struktura cervikálního hlenu během ovulace (převzato Brunelli a kol., 2007)

Mikroskopické metody postupně nahradily metody biochemické, a to především elektroforéza a western blotting, které zkoumají v cervikálním hlenu především glykoproteiny. Tyto metody pomohly identifikovat různé typy mucinů, které se mikroskopii nedaly rozlišit. Studuje se také jejich množství v průběhu reprodukčního cyklu. Western blotting se využívá při studiu HIV ve vztahu k cervikální zátce. Zde se studoval vliv přítomnosti mucinu na inhibici virové infekce HIV (Habte a kol., 2008).

Další biochemickou metodou zkoumající cervikální hlen, je imunoprecipitace, kdy se již používají specifické protilátky vůči konkrétním mucinům. Imunoprecipitace se používá ke studiu imunoglobulinů v cervikálním hlenu. Zde převládá IgG, u něhož není zcela objasněna přesná imunitní funkce ochrany před viry. Předpokládá se, že se akumuluje na povrchu patogenu, vytvoří adhezní vazby, které znehybní patogen (Wang a kol., 2014).

Imunoprecipitace bývá často doplněna ELISA metodou, ve které dochází také k identifikaci pomocí protilátek (Argüeso a kol., 2002). ELISA metoda byla využita při studiu extracelulárních matrix metaloproteináz (MMP), ty se nachází uvnitř neutrofilů v granulích nebo v extracelulární matrix jako proenzymy. Jejich nekontrolovatelná aktivita může ohrozit těhotenství nebo dozrávání děložního hrdla. Existují podezření, že přispívají k remodelaci tkáně dělohy, plodových obalů a děložního čípku v průběhu těhotenství. Metodou ELISA byly detekovány MMP-2, MMP-9, které mají lytickou aktivitu a při vysoké hladině mají silný potenciál degradovat vláknitou a bazální membránu kolagenu. Zdrojem těchto metaloproteináz mohou být zánětlivé reakce děložního hrdla (Becher a kol., 2004).

S rozvojem proteomických metod se ke studiu cervikálního hlenu začala používat hmotnostní spektrometrie (MS), jež byla využita k identifikaci konkrétních proteinů v cervikálním hlenu.

Hmotnostní spektrometrie se převážně využívá u studia cervikální zátky a předčasného porodu. Zde byly identifikovány specifické proteiny z vaginální tekutiny, které byly spojeny s imunitní odpovědí organismu a metabolismem. U pacientek, u nichž došlo k předčasnému porodu, byly identifikovány proteiny, související s intraaminální infekcí: imunitní modulátory (calgranulin C, cystatin A), insulin-like growth factor binding protein-1 (Hitti a kol., 2010). Dalšími



identifikovanými proteiny v cervikální zátce jsou matrix metaloproteinázy 9 (MMP-9) a glycodelin A (progestagen asociovaný s endometriálními proteiny). Oba proteiny hrají významnou roli v dozrávání cervikální zátky před porodem. Zátka obsahuje řadu proteinů s imunologickou funkcí: C3, C4a a C5 komplement, antimikrobiální peptidy (azurocidin, cathelicidin antimikrobiálního peptidu, defensin neutrofilů) a také muciny. Rovněž se studují rozdíly mezi cervikálním hlenem netěhotných žen a cervikální zátkou u těhotných. V cervikální zátce byly identifikovány proteiny plodové vody (resistin a retinol) a amnion (Lee a kol., 2011). Použitím metody multidimenzionální kapalinové chromatografie (2D-LC) ve spojení s MS bylo identifikováno jedinečné proteiny vyskytující se ve vaginální tekutině. 32 % tvořily proteiny účastníci se metabolismu organismu, jako jsou zánětlivé regulace (protein HSP90, bradykinin, kallikrein), degradace proteinů, inhibice proteázy (katepsin B,  $\alpha$ 1 antitrypsin). 22 % tvořily proteiny imunitního systému, další proteiny byly součástí buněčné proliferace, enzymatické regulace, transportu, buněčné diference a transportu. Tyto studie jsou klíčové, pro charakterizaci markerů pro neinvazivní diagnostiku poruch těhotenství (Dasari a kol., 2007).

Další MS metodou použitou pro studium cervikálního hlenu byla SELDI-TOF/MS a to jako metoda identifikace markeru rakoviny. SELDI-TOF metoda má ale omezené metody reprodukovatelnosti a to z důvodů nedostatku standardizace pre-analytické a analytické fáze, proto se pro dobrou reprodukovatelnost musí využít více statistických přístupů a všechny kroky analýzy se musí optimalizovat (Panicker a kol., 2009).

Pomocí HPLC-MS byly identifikovány jednotlivé typy mucinů a byla popsána jejich struktura. Muciny tvořící hlen jsou MUC5B, MUC5AC, MUC6. MUC5AC má podobnou strukturu jako MUC5B, oba typy jsou přítomny v cervikální zátce během těhotenství. MUC5B se nachází na děložním čípku i v průběhu menstruace. MUC6 je identifikován pouze ve vzorcích odebraných před ovulací a jeho koncentrace v hlenu je nižší jak ostatní muciny. Mezi transmembránové muciny se řadí MUC16, MUC1. Význam jednotlivých mucinů v současné době není vyřešen a pochopen (Anderch-Björkman a kol., 2007).

Jedním z oborů, který využívá výsledky MS studia proteinů v hlenu je forenzní chemie a kriminologie. Byly určeny proteiny - markery, které se

vyskytují pouze v cervikálním hlenu a ne v dalších lidských tělesných tekutinách (krev, sliny, moč, sperma). Tyto markery umožňují lehce identifikovat, zda se jedná o vzorek cervikálního hlenu, spermatu či slin. Kvůli nízkému množství často nalezeného neznámého vzorku, byly jako markery zvoleny často se vyskytující proteiny. Markery pro určení cervikálního hlenu jsou cornulin, involucrin a cornitin. Ve vysoké koncentraci se v cervikálním hlenu také vyskytují alfa-amylázy. Ty se však existují ve dvou izoformách, alfa-amyláza 1 je přítomná ve slinách a alfa-amyláza 2 ve spermatu a vaginálním sekretu. MS umožňuje identifikaci jednotlivé izoformy a lepší určení, zda vzorek pochází z vaginálního sekretu či slin. Cornulin je společně s hemoglobinem markerem menstruační krve. (Steendam a kol., 2013).

Nalezením markerů se otevřel nový směr zkoumání cervikálního hlenu a to zkoumání tkáňově specifických miRNA. Proteomická analýza tělních tekutin je náchylná k omezením (způsob skladování, teplota, vlhkost) a často dochází ke znehodnocení vzorku, mRNA markery taková omezení nemají. K analýze se využívají mikročipy, na které se vyizolovaná a naaplikovaná DNA ze vzorku nahybridizuje na sondu odpovídající danému markeru. K ověření markeru se využívají fluorescenční techniky, jako je použití TaqMan proby. Tímto způsobem se určily markery pro 5 tělních tekutin (sliny, sperma, vaginální tekutina, žilní a menstruační krev), které jsou tímto způsobem od sebe snadno rozeznatelné (Zubakov a kol., 2010). Identifikace se provádí na základě přítomnosti lidského beta-defensinu 1 a mucinu MUC4. Tyto geny byly identifikovány v menstruační krvi a vaginální tekutině, ale ne v cévní krvi, spermatu nebo slinách (Juusola a Ballantyne, 2003).

## 2. 2. Proteomika

V roce 1995 bylo poprvé použito profesorem Wilkinsem slovo proteomika a proteom jako obdoba pojmů genomika a genom. Proteom se skládá ze dvou slov, jimiž jsou **protein** a **genome**. Proteom je definován jako komplexní soubor všech proteinů exprimovaných genomem daného organismu, soubor proteinů exprimovaných určitou buňkou, tkání, orgánem. Na rozdíl od genomu, je proteom ovlivněn podmínkami, které jsou v jednotlivých buňkách, tkáních a orgánech odlišné (Wilkins a kol., 1995). Proteomika se věnuje studiu proteinů a genetickým analýzám. Studují se protein-proteinové interakce, lokalizace, modifikace a funkce proteinů. Proteomika nestuduje pouze proteom, ale snaží se identifikovat, kde se daný protein v buňce exprimuje. K tomu je nutné zapojit další vědecké disciplíny jako molekulární biologii, bioinformatiku a biochemii. Proteom je dynamický, neustále se mění a je reakcí na vnější prostředí (Graves a Haystead, 2002). Počet proteinů v buňce neodpovídá počtu genů, většinou tento počet přesahuje. To je způsobeno hlavně posttranslačními modifikacemi, které jsou nejčastější reakcí na měnící se vnější prostředí a alternativním sestřihem genů (Graves a Haystead, 2002; Wilkins a kol., 1995). Tvorba proteinů je přísně regulovaný proces od transkripce až po posttranslační modifikace (Collinsová a Jiráček, 2004). Proteomika se neustále vyvíjí a zasahuje do všech oblastí vědy. Mezi hlavní cíle patří vysvětlení role a popis bílkovin v metabolických drahách organismu. Identifikace a kvantifikace proteinů - určení sekvence aminokyselin, molekulové hmotnosti, S-S vazeb, posttranslačních modifikací. Studuje se interakce s jinými látkami a následné změny složení. Proteomika se velmi využívá v medicíně a to převážně ke studiu příčin a mechanismů chorob, nalezení markerů a ke studiu patologických chorob. Ve farmacii se využívá především k hledání a vývoji nových léčiv, v průmyslu jsou využívány především technické enzymy. Proteomika je také využívána v ochraně životního prostředí a to především k vývoji enzymů, jež by bezpečně likvidovaly škodlivé látky. Tento rychlý vývoj proteomiky byl umožněn převážně rozvojem bioinformatiky. Proteomika generuje velké množství dat, které je nutno informaticky a statisticky zpracovat (Chmelík, 2005).

### 2. 2. 1. Metody používané v proteomice

K separaci proteinů se používá gelová elektroforéza. Podle typu gelu rozlišujeme agarózovou a polyakrylamidovou, kde je tvořen polymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu, jež je zahájena volnými radikály vyskytujícími se ve vhodně zvoleném pufru (Voet a Voet, 1995). U SDS polyakrylamidové elektroforézy je do směsi proteinů přidán dodecyl-sulfát sodný, ten se váže na proteiny a jeho vysoký negativní náboj překryje náboj samotných proteinů. Ty dostanou uniformní náboj a separace probíhá pouze na základě velikosti (Laemmli, 1970; Voet a Voet, 1995).

Roku 1975 byla Patrikem O'Farrellem poprvé popsána další separační metoda a to dvoudimenzionální elektroforéza. Principem dělení je využití dvou na sobě nezávislých metod. První je izoelektrická fokusace, během které se proteiny rozdělí na základě izoelektrického bodu, tedy bodu ve kterém mají v daném pH nulový náboj. Druhou metodou je přidání SDS a rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti (O'Farrell, 1975).

K separaci nabitých iontů se používá hmotnostní spektrometrie (MS). Zde je vzorek převeden na ionizovanou plynnou fázi, ionty jsou separovány v elektrickém a magnetickém poli na základě poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Analýza hmotnostní spektrometrií se skládá z pěti kroků: odpaření vzorku, ionizace, akcelerace do hmotnostního spektrometru, separace iontů a detekce. Ionizace probíhá za atmosférického tlaku nebo v prostředí s vakuem. Vznikají nabité ionty nebo dojde k rozpadu iontů na fragmenty vlivem vysoké ionizační energie (McDonald a kol., 2011).

Existují tvrdé ionizační techniky jako chemická a elektronová ionizace a měkké ionizační techniky (Zhu a kol., 2012). Mezi měkké techniky se řadí ionizace elektrosprejem (ESI - „Electrospray ionization“), kdy principem metody je rozprašování analytu z nabitě trubice inertním plynem, tím dochází k odpařování rozpouštědla, velikost rozprašovaných kapiček klesá. Jakmile velikost kapiček klesne pod určitou míru, vzniknou nabité ionty (Fenn a kol., 1989). Druhou měkkou technikou je laserem indukovaná desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI

- „matrix assisted laser desorption/ionization“) kdy k ionizaci analytu dochází spolu s vhodnou maticí a následuje desorpce a ionizace laserem (Karas a Hillenkampf, 1988).

Následně dochází k separaci iontů, fragmentaci a poté k analýze iontů v analyzátoru. Dopadající ionty na detektor jsou převedeny na hmotnostní spektrum, kde na ose x je vynesena hodnota  $m/z$  a na ose y ozvěny detektoru (relativní intenzita iontového proudu). Jednotlivé proteiny jsou zde znázorněny formou píků (McDonald a kol., 2011).

Podrobnou rešerši proteomických metod a zpracování jsem popsala ve své bakalářské práci: „Proteomický profil methylprednisolonem léčené leukemické buněčné linie a porovnání proteinových změn se známým účinkem léčiva“ (Rašková, 2013).

### **3. Cíl práce**

Vypracovat rešerši současného stavu problematiky analýzy cervikálního hlenu.

Vývoj a optimalizace proteomické hmotnostně-spektrometrické analýzy cervikálního hlenu pro budoucí rutinní analýzu.

Statistická analýza se zaměřením hledání markeru receptivity endometria.

## **4. Experimentální část**

### **4. 1. Materiál**

#### **4. 1. 1. Biologický materiál**

Pro veškeré experimenty byly použity vzorky cervikálního hlenu odebrané na porodnicko-gynekologické klinice fakultní nemocnice Olomouc.

#### **4. 1. 2. Přístrojové vybavení**

- kolona MacroTrap (Bruker-Michrom, USA)
- kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA) s HPLC předkolonou Acclaim PrepMap 100-C18 (Thermo Scientific, USA) a HPLC kolonou PrepMap RSLC-C18 (Thermo Scientific, USA) spojený s orbitrapem Elite (Thermo Scientific) s ionizačním zdrojem EASY-Spray (Thermo Scientific, USA)
- Milli-Q Direct Systém (Millipore, Francie)
- ultrazvuková lázeň RK 100 H (Bandelin electronics, Německo)
- třepačka vortex REAX control (Heidolph, Německo)
- odstředivka eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Termomixer comfort (Eppendorf, Německo)
- odstředivka centrifuge 5810R (Eppendorf, Německo)
- sonikátor Branson Digital Sonifier 450 (Emerson Industrial Automation, USA)
- vodní lázeň SUB Aqua 12 Plus (Grant, Velká Británie)
- Direct Detect spektrometr (Millipore, Francie)
- spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA)
- centrifugační filtrační mikrozkuřavky Microcon YM-30 (Millipore, Francie)
- Spektrofotometr PerkinElmer Envision (PerkinElmer, USA)

#### 4. 1. 3. Chemikálie

Voda pro MS (Milli-Q Direct System, Millipore, Francie); tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; Serva, Německo); kyselina chlorovodíková (Lach-ner, Česká republika); dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich, USA); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA); dodecylsulfát sodný (SDS; Sigma-Aldrich, USA); acetonitril (ACN; J. T. Baker, Nizozemí); jodacetamid (Sigma-Aldrich, USA); Trypsin Gold pro MS (Promega, USA); kyselina octová pro MS (AA; Fluka, Sigma-Aldrich, Německo); kyselina trifluoroctová (TFA; Sigma-Aldrich, USA); kyselina mravenčí (FA; Fluka, Sigma-Aldrich, Německo); methanol (Fluka; Sigma-Aldrich, USA); močovina (Sigma-Aldrich, Německo); kyselina fosforečná (Fluka; Sigma-Aldrich, USA); kyselina boritá (Sigma-Aldrich, USA); hydrogenuhličitan amonný (ABC; Fluka; Sigma-Aldrich, Německo), chlorid sodný (NaCl; Mikrochem, Česká republika); hydroxid sodný (NaOH; Lach-ner, Česká republika); Proteiny assay standards bovine serum albumin (BSA; Thermo Scientific, USA); Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, USA); trifluoroethanol (TFE, Fluka, Sigma-Aldrich, Německo)

#### 4. 1. 4. Roztoky

##### *FASP lyzační pufr*

pH = 7,6

4% SDS

0,1M dithiothreitol v 0,1M Tris-HCl

##### *SILAC lyzační pufr*

pH = 6,6

20mM Tris-HCl

7M močovina

10mM dithiothreitol



1% Triton X-100

0,5% SDS

### ***BRUB pufr***

0,02M kyselina octová

0,02M kyselina fosforečná

0,02M kyselina boritá

### **4. 1. 5. Software**

Direct Detect verze 2.0.0.28 (Millipore, USA), EnVision Manager verze 1.13.3009.1401 (PerkinElmer, USA), NanoDrop ND-1000 verze 3.8.1 (Thermo Scientific, USA), MaxQuant verze 1.4.1.2 (Max Plank Institute of Biochemistry 2012, Německo), Perseus verze 1.4.0.6 (Max Plank Institute of Biochemistry 2012, Německo), MS Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA), Bioconductor R Project verze 3.2.1 (R Development Core Team, Rakousko)

## **4. 2. Metodika**

### **4. 2. 1. Zpracování odebraného vzorku cervikálního hlenu**

Vzorek cervikálního hlenu byl odebrán do předem zvážené mikrozkušavky, tato zkumavka se vzorkem byla znovu zvážena, při laboratorní teplotě stočena v centrifuze Eppendorf mini (Eppendorf, Německo) na 2 minuty při 12 100 g a zamražena na -80 °C.

#### **4. 2. 2. Optimalizace rozpouštění**

Vzorky byly vytaženy z mrazícího boxu, nechaly se při laboratorní teplotě rozmrazit. V první fázi experimentu bylo ke vzorku přidáno 100  $\mu$ l pufru, kdy jako pufr posloužila 4% kyselina octová, 50mM ABC pH8, FASP lyzační pufr a SILAC lyzační pufr. Po přidání pufru byly mikrozkušavky zvortexovány a při laboratorní teplotě stočeny v centrifuze Eppendorf mini (Eppendorf, Německo) na 2 minuty při  $12\ 100 \times g$ . Dále byly nechány 10 minut sonikovat v ultrazvukové lázni a opět byly zvortexovány a stočeny na centrifuze. Naposledy byly mikrozkušavky vloženy na 10 minut do Thermomixeru comfort (Eppendorf, Německo) při  $95^{\circ}\text{C}$ , zvortexovány a stočeny na centrifuze.

Během rozpouštění ve 4% kyselině octové a 50mM ABC vznikala ve vzorku sraženina a vzorek nešel zcela rozpustit, proto byl způsob rozpouštění vzorku změněn. Ke vzorku bylo přidáno dvojnásobné množství jejich hmotnosti FASP pufru a dále byl vzorek sonikován na ledě sonikátorem Branson Digital Sonifier 450 (Emerson Industrial Automation, USA). Sonikace probíhala 30 sekund, amplituda byla nastavena na 15 %, vypnutí a zapnutí pulzu na 0,5 sekundy.

#### **4. 2. 3. Měření obsahu proteinů**

Pro další zpracování vzorků bylo nutné znát koncentraci proteinů, ta byla měřena třemi různými způsoby, které se následně porovnály, pro optimalizaci metody byl vybrán ten nejpřesnější.

##### **4. 2. 3. 1. Direct Detect spektrometr**

Na spektrofotometru Direct Detect byla změřená koncentrace proteinů ve vzorcích, kdy se na polytetrafluorethylenovou membránu měřící destičky nanasly 2  $\mu$ l pufru, ve kterém byl vzorek rozpuštěn, ty sloužily při měření jako blank a 2  $\mu$ l vzorku v daném pufru. Destička se po uschnutí nanesených vzorků vložila do přístroje a pomocí měřící metody NIST BSA AM1.q3 a NIST BSA AM2.q3 byla změřena koncentrace proteinů ve vzorku.

#### 4. 2. 3. 2. Pierce Assay

Pomocí kitu Pierce Assay byla změřena koncentrace proteinů ve vzorku. Na 96 jamkovou desku bylo napipetováno 10  $\mu$ l BSA standardů, voda pro MS, 10  $\mu$ l pufru a 10  $\mu$ l vzorku rozpuštěném v daném pufru. Postup pipetování je znázorněna na obr. 5. Do všech jamek bylo přidáno 150  $\mu$ l reagentie pro Pierce Assay. Deska byla změřena při 660 nm na spektrofotometru PerkinElmer Envision (PerkinElmer, USA) a vyhodnocena softwarem EnVision Manager. V programu MS Excel byla vytvořena kalibrační křivka, ze které odečtením změřené absorbance byla vypočtena koncentrace proteinů.

	1	2	3	4
A	voda	voda	AA	AA
B	125	125	ABC	ABC
C	250	250	SILAC	SILAC
D	500	500	FASP	FASP
E	750	750	vz 1	vz 1
F	1000	1000	vz 2	vz 2
G	1500	1500	vz 3	vz 3
H	2000	2000	vz 4	vz 4

Obr. 5: Na 96 jamkovou desku byla do pozice A1, A2 napipetována MS voda, jež sloužila jako blank pro kalibrační řadu. Do pozice B1, B2 - H1, H2 byly napipetovány BSA kalibranty o dané koncentraci [ $\mu$ g/ml]. Do pozice A3, A4 - D3, D4 byly napipetovány pufrы, v nichž byly vzorky rozpuštěny, ty soužily jako blank pro samotné vzorky. Dále byly na desku napipetovány samotné vzorky.

#### **4. 2. 3. 3. Spektrofotometr NanoDrop**

Spektrofotometrem NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) byla změřena koncentrace proteinů vzorků po jejich digesci, kdy na NanoDrop byly nanесeny 2  $\mu$ l vzorku a pomocí softwaru ND-1000 byla změřena koncentrace při vlnové délce 280 nm. V programu MS Excel byla vytvořena kalibrační křivka, ze které odečtením změřené absorbance byla vypočtena koncentrace proteinů.

#### **4. 2. 4. Optimalizace digesce**

Pro digesci proteinů byly navrženy 3 metody: in solution digesce (Havliš a Schevchenko, 2004), štěpení proteinů na membráně s frakcionací peptidové směsi (Wisniewski a kol., 2009) a štěpení proteinů na membráně s přečištěním na C18 ve špičkách (Wiśniewski a kol., 2009). Z nichž se nakonec vybrala ta, která byla pro měření většího počtu vzorků nejvhodnější.

##### **4. 2. 4. 1. In solution digesce**

Do nové mikrozkuhavky bylo napipetováno 10  $\mu$ g roztoku proteinů ze vzorku. Dále bylo přidáno 20  $\mu$ l acetonitrilu, 20  $\mu$ l 50mM ABC, 5  $\mu$ l 65mM DTT a vzorky se nechaly inkubovat 30 minut v termobloku při 57 °C. Následně bylo napipetováno 5  $\mu$ l 135mM jodacetamidu a vzorky se nechaly inkubovat jednu hodinu ve tmě. Po inkubaci bylo přidáno 20  $\mu$ l 50mM ABC a 2  $\mu$ l 50 $\mu$ g/ $\mu$ l trypsinu. Po přidání trypsinu byly vzorky nechány 2 hodiny při 37 °C v Thermomixeru Comfort (Eppendorf, Německo).

Dle návodu výrobce byla sestavena kolona C18 (MacroTRAP, Bruker-Michrom), na níž došlo k purifikaci proteinů. Proteiny byly na kolonu nanесeny pomocí 0,5ml stříkačky Hamilton. Stříkačku Hamilton byla dvakrát promyta 100% acetonitrem a jednou 0,1% TFA v 80% acetonitrilu. Tímto krokem se stříkačka připravila k použití.

Kolona MacroTRAPu byla ekvilibrována 500  $\mu$ l 0,1% TFA, následně byl nanесen všechny obsah mikrozkuhavky se vzorkem, jenž byl dále odsolen 500  $\mu$ l

0,1% TFA. Peptidy byly z kolony eluovány 200  $\mu$ l 0,1% TFA v 80% acetonitrilu do nové mikrozkušavky.

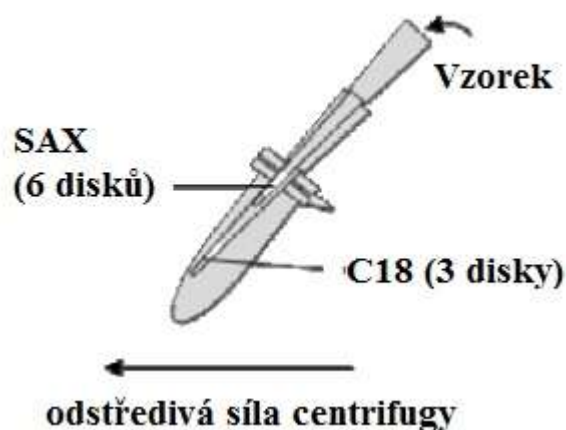
Obsah mikrozkušavek byl odpařen a peptidy byly rozpuštěny v 60  $\mu$ l 5% acetonitrilu v 0,1% FA a veškerý obsah zkkušavky byl přenesen do inzertu, jenž byly následně umístěny do vialek.

#### 4. 2. 4. 2. Štěpení proteinů na membráně

Štěpení proteinů probíhalo ve filtrační zkkušavce Microcon YM-30 („Filter Aided Sample Preparation“, FASP). Do centrifugační mikrozkušavky byl vložen filtr a na něj bylo nanášeno 100  $\mu$ l vzorku a 200  $\mu$ l 8M močoviny v 0,1M Tris/HCl pH 8,5 (UA). Zkušavky byly na 15 minut stočeny v centrifuze (centrifuge 5810R Eppendorf, Německo) při 14 000  $\times$  g. Dále bylo přidáno 200  $\mu$ l UA a zkkušavky byly stočeny v centrifuze při 14 000 $\times$  g, 15 minut. Z mikrozkušavky byl vylit obsah, jenž prošel během točení skrz filtr, bylo přidáno 100  $\mu$ l 0,05M jodacetamidu, zkkušavky se nechaly 1 minutu míchat v Thermomixeru Comfort při 600 rpm a dále se nechaly inkubovat 20 minut ve tmě bez třepání. Mikrozkušavky byly stočeny při 14 000 $\times$  g, 15 minut. Bylo přidáno 100  $\mu$ l UA a mikrozkušavky byly stočeny při 14 000 $\times$  g, 15 minut. Tento krok byl opakován ještě dvakrát. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l 50mM ABC mikrozkušavky byly stočeny při 14 000 $\times$  g, 15 minut. Tento krok se opakoval dvakrát. Ke zkkušavkám bylo přidáno 38  $\mu$ l 50mM ABC a 2  $\mu$ l 50 ng/ $\mu$ l trypsinu, zkkušavky byly 1 minutu v Thermomixeru Comfort při třepání 600 rpm. Filtr byl přenesen do nové centrifugační zkkušavky a ta byla umístěna přes noc do vodní lázně SUB Aqua 12 Plus (Grant, Velká Británie), ve které byla teplota 37  $^{\circ}$ C. Druhý den byly mikrozkušavky z vodní lázně vytaženy a byly stočeny v centrifuze při 14 000 $\times$  g, 10 minut. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l 50mM ABC. Koncentrace peptidů byla změřena spektrofotometrem NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

#### 4. 2. 4. 3. Frakcionace peptidové směsi

Frakcionace peptidové směsi byla provedena na iontoměničce („Post-FASP Strong Anion Exchange Separation“, SAX). Byl připraven BRUB pufr („Britton and Robinson Universal Buffer“; 0,02M kyselina octová; 0,02M kyselina fosforečná; 0,02M kyselina boritá), kdy bylo pomocí NaOH upraveno pH tohoto roztoku na pH 3, 4, 5, 6, 8 a 11. K roztoku o pH 3 bylo přidáno NaCl s konečnou koncentrací 0,25 M. Peptidová směs byla po FASPu upravena na pH vyšší než 11. Podle protokolu pro SAX byly připraveny špičky („Stage Tips“), na nichž se provedla frakcionace peptidové směsi (obr. 6.) Bylo připraveno 1 SAX „Stage Tip“ a 6 C18 „Stage Tip“ pro každý vzorek.

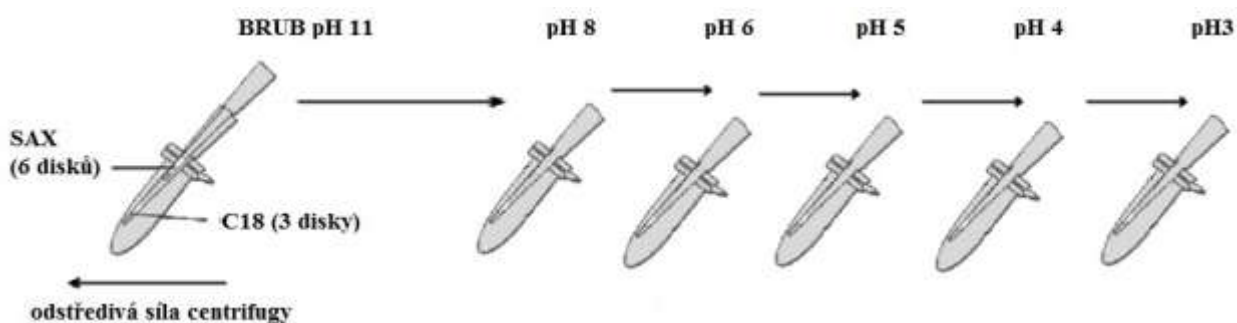


Obr. 6: „Stage Tip“ pro frakcionaci peptidové směsi (převzato Wisniewski a kol., 2009)

Nejdříve byly aktivovány SAX „Stage Tips“ do nichž bylo napipetováno 100  $\mu$ l methanolu, mikrozkuhavky byly stočeny při teplotě 23  $^{\circ}$ C a 4 000 $\times$  g, na 4 minuty v centrifuze 5810R (Eppendorf, Německo). Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l 1 M NaOH a mikrozkuhavky byly při stejných podmínkách stočeny. Naposledy se přidalo 100  $\mu$ l BRUB pufru pH 11, mikrozkuhavky byly opět stočeny. Tento krok byl opakován dvakrát.

Dále se provedla aktivace C18 „Stage Tips“ do nichž bylo přidáno 100  $\mu$ l methanolu, mikrozkuřavky byly stočeny při teplotě 23 °C a 3 000 $\times$  g, na 3 minuty. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l 80% ACN v 0,5% AA, mikrozkuřavky byly při stejných podmínkách stočeny. Naposledy bylo přidáno 100  $\mu$ l 0,5% AA a mikrozkuřavky se opět nechaly stočit. Tento krok byl opakován dvakrát.

Takto připravená SAX „Stage Tips“, byla vložena do C18 „Stage Tips“ (viz obr. 6). Bylo přidáno 20  $\mu$ g vzorku peptidů, mikrozkuřavky byly stočeny 3 000 $\times$  g, 3 minuty. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l BRUB puřru pH 11, mikrozkuřavky byly stočeny 3 000 $\times$  g, 5 minut. SAX „Stage Tip“ přenesena do další C18 „Stage Tip“. Následně bylo postupováno podle obr. 7, kdy bylo přidáno 100  $\mu$ l BRUB puřru, u kterého s každým dalším přenesením SAX „Stage Tip“ do následující C18 „Stage Tip“ snižovalo pH BRUB puřru (8, 6, 5, 4, 3).



Obr. 7: Schéma přenosu SAX „Stage Tips“ do C18 „Stage Tip“ během snižování pH BRUB puřru (převzato Wisniewski a kol., 2009, upraveno: Rašková)

Po přidání puřru byly mikrozkuřavky vždy stočeny 3 000 $\times$  g, 5 minut. Poté byly SAX „Stage Tips“ odstraněny a do C18 „Stage Tips“ bylo přidáno 100  $\mu$ l 0,5% AA, mikrozkuřavky byly stočeny 3 000 $\times$  g, 5 minut a následně byly tyto C18 „Stage Tips“ přeneseny do nové prázdné mikrozkuřavky, bylo přidáno 100  $\mu$ l 80% ACN v 0,5% AA a mikrozkuřavky byly opět stočeny v centrifuzi.

Obsah mikrozkuvek byl odpařen a peptidy byly rozpuštěny v 60  $\mu$ l 5% acetonitrilu v 0,1% FA a veškerý obsah zkumavky byl přenesen do inzertu, jenž byly následně umístěny do vialek. Koncentrace peptidů byla změřena spektrofotometrem NanoDrop ND-1000, kdy na NanoDrop byly nanесeny 2  $\mu$ l vzorku a pomocí softwaru ND-1000 byla změřena koncentrace při vlnové délce 280 nm.

#### 4. 2. 5. Analýza na Orbitrapu Elite

Vzorky byly analyzovány kapalinovým chromatografem Dionex Ultimate 3000 spojeným s Orbitrap Elite s ionizačním zdrojem EASY-Spray. Separace HPLC probíhala na předkoloně Acchaim PrepMap 100 (100  $\mu$ m x 2 cm, C18, 5  $\mu$ m, 100 A) a koloně PerpMap RSLC (75  $\mu$ m x 50 cm, C18, 2  $\mu$ m, 100 A), kdy mobilní fáze na loadovací pumpě protékala rychlostí 5  $\mu$ l/min. Zde byl nastaven vícekrokový gradient, kdy se mísila Milli-Q voda s 0,1% TFA s 0,1% TFA v 80% acetonitrilu v 10% TFE. Na nano pumpě byl nastaven nelineární gradient mobilní fáze, která protékala rychlostí 0,275  $\mu$ l/min, kdy se mísila voda s 2% acetonitrilem v 0,1% FA (roztok A) a voda v 80% acetonitrilu s 10% TFE s 0,08% FA (roztok B; tab. 2). Na kolonu se nastříkoval 1  $\mu$ g vzorku.

Tab. 2: Gradient mobilní fáze během chromatografické separace na koloně

čas (min)	roztok A (%)	roztok B (%)
0 - 10	98 %	2 %
10 - 125	60 %	40 %
125 - 135	10 %	90 %
135 - 165	98 %	2 %



Výsledná hmotnostní spektra byla zpracována softwarem MaxQuant (Cox a Mann, 2008) a data byla následně odeslána do softwaru Perseus (Castaneda a kol., 2005). V tomto softwaru došlo k identifikaci proteinů pomocí vyhledávacích algoritmů

#### **4. 2. 6. Statistické zpracování výsledků**

Statistické vyhodnocení proběhlo v programu Bioconductor R Project (R Development Core Team, Rakousko). Hodnoty intenzit byly měřeny u každého vzorku třikrát. Z těchto tripletů se stanovil průměr (byly použity pouze nenulové hodnoty) a tato průměrná hodnota se transformovala funkcí logaritmus při základu 2 ( $\log_2$  transformace). Takto získané hodnoty se dále srovnávaly ve skupině žen s těhotenstvím a bez něj prostřednictvím Wilsonova exaktního dvouvýběrového testu. Pro analýzu bylo vybráno 51 proteinů (s nenulovou intenzitou), které se vyskytly u všech pacientek. Každý protein se hodnotil samostatně (univariální analýza).

## **5. Výsledky**

Výsledky nejsou z důvodu utajení zveřejněny.

## **6. Diskuse**

Diskuse není z důvodu utajení výsledků zveřejněna.

## **7. Závěr**

Vypracovala jsem literární rešerši o cervikálním hlenu s důrazem na studium jeho složení a funkce proteomickými metodami.

Vyvinuli jsme a optimalizovali hmotnostně-spektrometrickou metodu pro budoucí rutinní analýzu cervikálního hlenu.

Nestanovili jsme markery receptivity endometria. Tato studie vyžaduje mnohem více času a další studium již identifikovaných proteinů.

## 8. Literatura

Andersch-Björkman, Y., Thomsson, K.A., Holmén Larsson, J.M., Ekerhovd, E., Hansson, G.C. (2007): Large scale identification of proteins, mucins, and their O-glycosylation in the endocervical mucus during the menstrual cycle. *Molecular & cellular proteomics*. 6(4): 708-716.

Andersson, S., Minjarez, D., Yost, N.P., Word, R.A. (2008): Estrogen and progesterone metabolism in the cervix during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*. 93(6): 2366-74.

Argüeso, P., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Gipson, I.K. (2002): Variation in the amount of T antigen and N-acetyllactosamine oligosaccharides in human cervical mucus secretions with the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 87(12):5641-8.

Becher, N., Hein, M., Danielsen, C.C., Uldbjerg, N. (2004): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the cervical mucus plug at term of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 191(4): 1232-9.

Becher, N., Hein, M., Uldbjerg, N., Danielsen, C.C. (2008): Balance between matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in the cervical mucus plug estimated by determination of free non-complexed TIMP. *Reproductive biology and endocrinology*. 6(45): doi:10.1186/1477-7827-6-45.

Brunelli, R., Papi, M., Arcovito, G., Bompiani, A., Castagnola, M., Parasassi, T., Sampaolese, B., Vincenzoni, F., De Spirito, M. (2007): Globular structure of human ovulatory cervical mucus. 21(14): 3872-3876. doi: 10.1096/fj.07-8189com.

Carlstedt, I., Lindgren, H., Sheehan, J.K., Ulmsten, U., Wingerup, L. (1983): Isolation and characterization of human cervical-mucus glycoproteins. *Biochem J.* 211(1): 13-22.

Castaneda, R., Plaz, A., Marquez, M.E., Abad, P. (2005): Centered reduced moments and associate density functions applied to alkaline comet assay. *J Biomed Opt.* 10(3): 034004.

Cof, J., Mann, M. (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 26(12): 1367-72. doi: 10.1038/nbt.1511.

Collinsová, M., Jiráček, J. (2004): Současný vývoj v proteomice. *Chem. Listy*, 98: 1112-1118.

ČIHÁK, Radomír. *Anatomie. 3., upr. a dopl. vyd.* Editor Miloš Grim. Praha: Grada, 2013, 497 s. ISBN 978-802-4747-880.

Dasari, S., Pereira, L., Reddy, A.P., Michaels, J.E., Lu, X., Jacob, T., Thomas, A., Rodland, M., Roberts, C.T. Jr., Gravett, M.G., Nagalla, S.R. (2007): Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid. *J Proteome Res.* 6(4): 1258-68.

de Hemptinne, V., Rondas, D., Toepoel, M., Vancompernelle, K. (2009): Phosphorylation on Thr-106 and NO-modification of glyoxalase I suppress the TNF-induced transcriptional activity of NF-kappaB. *Mol Cell Biochem.* 325(1-2): 169-78.

Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large bioolecules. *Science*, 246(4926): 64-71.

Gournier, H., Goley, E.D., Niederstrasser, H., Trinh, T., Welch, M.D. (2001): Reconstitution of human Arp2/3 complex reveals critical roles of individual subunits in complex structure and activity. *Mol Cell*. 8(5): 1041-52.

Graves, P.R, Haystead, T.A.J. (2002): *Molecular Biologist's Guide to Proteomics*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(1): 39-63.

Habte, H.H., de Beer, C., Lotz, Z.E., Tyler, M.G., Schoeman, L., Kahn, D., Mall, A.S. (2008): The inhibition of the Human Immunodeficiency Virus type 1 activity by crude and purified human pregnancy plug mucus and mucins in an inhibition assay. *Virology*. 5(59): doi: 10.1186/1743-422X-5-59.

Hari Kishore, A., Li. X.H., Word. R.A. (2012): Hypoxia and PGE(2) regulate MiTF-CX during cervical ripening. *Mol Endocrinol*. 26(12): 2031-45.

Havlis, J., Shevchenko, A. (2004): Absolute quantification of proteins in solutions and in polyacrylamide gels by mass spectrometry. *Anal Chem*. 76(11): 3029-36.

Hawkins, M., Pope, B., Maciver, S.K., Weeds, A.G. (1993): Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry*. 32(38): 9985-93.

Hevir, N., Vouk, K., Sinkovec, J., Ribič-Pucelj, M., Rižner, T.L. (2011): Aldo-keto reductases AKR1C1, AKR1C2 and AKR1C3 may enhance progesterone metabolism in ovarian endometriosis. *Chem Biol Interact.* 191(1-3): 217-26.

Hitti, J., Lapidus, J.A., Lu, X., Reddy, A.P., Jacob, T., Dasari, S., Eschenbach, D.A., Gravett, M.G., Nagalla, S.R. (2010): Noninvasive diagnosis of intraamniotic infection: proteomic biomarkers in vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 203(1): 32.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2010.03.037.

Chiarotto, J.A., Hill, R.P. (1999): A quantitative analysis of the reduction in oxygen levels required to induce up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in cervical cancer cell lines. *Br J Cancer.* 80(10): 1518-24.

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

Iris, N., Carraway, K.L. (1999): Sialomucin complex (Muc4) expression in the rat female reproductive tract. *Biol Reprod.* 61(6):1431-8.

Johnston, C.A., Kimple, A.J., Giguère, P.M., Siderovski, D.P.(2008): Structure of the parathyroid hormone receptor C terminus bound to the G-protein dimer Gbeta1gamma2. *Structure.* 16(7): 1086-94.

Juusola, J., Ballantyne, J. (2003): Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci. Int.,* 152. 1–12.

Karas, M., Hillenkamp, F. (1988): Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem.* 60(20): 2299 – 2301.



KUDELA, Milan. *Základy gynekologie a porodnictví: pro posluchače lékařské fakulty*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2008, 273 s. ISBN 978-802-4419-756.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.

LANGMAN, Jan a T SADLER. *Langman's medical embryology*. 7th ed./.. Baltimore: Williams, c1995, xi, 460 p. ISBN 06-830-7489-X..

Lee, D.Ch., Hassan, S.S., Romeo, R., Garda, A.L., Bhatti, G., Gervasi, M.T., Causo, J.A., Stemmer, P.M., Kim, Ch.J., Hansen, L.K., Becher, N., Uldbjerg, N. (2011): Protein Profiling Underscores Immunological Functions of Uterine Cervical Mucus Plug in Human Pregnancy. *J Proteomics*. 74(6): 817–828.

Mantel, A., Carpenter-Mendini, A.B., Vanbuskirk, J.B., De Benedetto, A., Beck, L.A., Pentland, A.P. (2012): Aldo-keto reductase 1C3 is expressed in differentiated human epidermis, affects keratinocyte differentiation, and is upregulated in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*.132(4): 1103-10.

Matena, K., Boehm, T., Dear, N. (1998): Genomic organization of mouse *Capn5* and *Capn6* genes confirms that they are a distinct calpain subfamily. *Genomics*. 48(1): 117-20.

McDonald, J.G., Matthew, S., Auchus R.J. (2011): Steroid Profiling by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Adrenal Diseases. *Horm Cancer*. 2(6): 324-332.

Menárguez, M., Pastor, L.M., Odeblad, E. (2003): Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy. *Hum Reprod.* 8(9): 1782-9.

Moriyama, A., Shimoya, K., Ogata, I., Komára, T., Nakanuta, T., Wada, H., Ohashi, K., Azuma, C., Saji, F., Murata, Y. (1999): Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 5(7): 656-61.

Münnich, S., Taft, M.H., Manstein, D.J. (2014): Crystal structure of human myosin 1c--the motor in GLUT4 exocytosis: implications for Ca<sup>2+</sup> regulation and 14-3-3 binding. *J Mol Biol.* 426(10): 2070-81. doi: 10.1016/j.jmb.2014.03.004.

Nakamura, Y., Hornsby, P.J., Casson, P., Morimoto, R., Satoh, F., Xing, Y., Kennedy, M.R., Sasano, H., Rainey, W.E. (2009): Type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) contributes to testosterone production in the adrenal reticularis. *J Clin Endocrinol Metab.* 4(6): 2192-8.

Nishi, N., Abe, A., Iwaki, J., Yoshida, H., Itoh, A., Shoji, H., Kamitori, S., Hirabayashi, J., Nakamura, T. (2008): Functional and structural bases of a cysteine-less mutant as a long-lasting substitute for galectin-1. *Glycobiology.* 18(12): 1065-73.

O'Farrell PH. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250(10): 4007-21.

Okumura, C.Y., Baum, L.G., Johnson, P.J. (2008): Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol.* 10(10): 2078-90.

Panicker, G., Lee, D.R., Unger, E.R. (2009): Optimization of SELDI-TOF protein profiling for analysis of cervical mucous. *J Proteomics.* 71(6): 637-46. doi: 10.1016/j.jprot.2008.11.004

Pengfei, L., Youming, G., Bledsoe G., Yang, Z.R., Fan, H., Chao, L., Chao, J. (2015): Kallistatin treatment attenuates lethality and organ injury in mouse models of established sepsis. *Crit Care.* 19(1): 200.

Penning, T.M., Burczynski, M.E., Jez, J.M., Lin, H.K., Ma, H., Moore, M., Ratnam, K., Palackal, N. (2001): Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Mol Cell Endocrinol.* 171(1-2): 137-49.

Rašková, V. (2013): Proteomický profil methylprednisolonem léčené leukemické buněčné linie a porovnání proteinových změn se známým účinkem léčiva. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Roberson, A.E., Hyatt, K., Kenkel, C., Hanson, K., Myers, D.A. (2012): Interleukin 1 $\beta$  regulates progesterone metabolism in human cervical fibroblasts. *Reprod Sci.* 19(3): 271-81.

Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., Inui, K. (2007): Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol.* 74(2): 359-71.

Than, N.G., Romero, R., Erez, O., Weckle, A., Tarca, A.L., Hotra, J., Abbas, A., Han, Y.M., Kim, S.S., Kusanovic, J.P., Gotsch, F., Hou, Z., Santolaya-Forgas, J., Benirschke, K., Papp, Z., Grossman, L.I., Goodman, M., Wildman, D.E. (2008): Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placental mammals: implication in maternal-fetal immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(41): 15819-24.

UNIPROT CONSORTIUM. *UniProt* [online]. 2015 [cit. 2015-07-18]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/>

Van Steendam, K., De Ceulneer, M., Dhaenens, M., Van Hoofstat, D., Deforce, D. (2013): Mass spectrometry-based proteomics as a tool to identify biological matrices in forensic science. *Int J Legal Med*. 127(2): 287–298. doi: 10.1007/s00414-012-0747-x.

Voet, D., Voet, J.G.. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995, s. 98-99, 102-103, 118. ISBN 80-85605-44-9.

Wakamatsu, A., Kimura, K., Yamamoto, J.I, Nishikawa, T., Nomura, N., Sugano, S., Isoga, T. (2009): Identification and Functional Analyses of 11 769 Full-length Human cDNAs Focused on Alternative Splicing. *DNA Res*. 16(6): 371–383.

Wang, Y.Y., Kannan, A., Nunn, K.L., Murphy, M.A., Subramani, D.B., Moench, T., Cone, R., Lai, S.K. (2014): IgG in cervicovaginal mucus traps HSV and prevents vaginal herpes infections. *Mucosal Immunol*. 7(5): 1036-44. doi: 10.1038/mi.2013.120.

Wilkins, M.R., Pasquali, Ch., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J-Ch., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1996): From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nature Biotechnology*, 14: 61 - 65.

Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Naqaraj, N., Mann, M. (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 6(5): 359-62. doi: 10.1038/nmeth.1322.

Wu, C.H., Ko, J.L., Chen, S.C., Lin, Y.W., Han, C.P., Yang, T.Y., Chien, M.H., Wang, P.H. (2014): Clinical implications of aldo-keto reductase family 1 member C3 and its relationship with lipocalin 2 in cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 132(2): 474-82.

Zhou, G.X., Chao, L., Chao, J. (1992): Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *J Biol Chem*. 267(36): 25873-80.

Zhu, W., Yuan, Y., Zhou, P., Zeng, L., Wang, H., Tang, L., Guo, B., Chen, B. (2012): The Expanding Role of Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Probing Reactive Intermediates in Solution, *Molecules*, 17(10): 11507-11537.

Zubakov, D., Boersma, A.W., Choi, Y., van Kuijk, P.F, Wiemer, E.A., Kayser, M. (2010): MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*. 124(3): 217-26. doi: 10.1007/s00414-009-0402-3.

## 9. Seznam použitých zkratek

Zkratky jsou řazeny dle jejich výskytu v textu

FSH	folikuly stimulující hormon
LH	luteinizační hormon
PTS	velká mucinová doména
MUC	mucin
ELISA	„Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“
MMP	matrix metaloproteinázy
MS	hmotnostní spektrometrie
2D-LC	dvoudimenzionální elektroforéza spojená s kapalinovou chromatografií
HSP90	„heat shock protein 90“
SELDI	„Surface-enhanced laser desorption/ionization“
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
miRNA	mikro ribonukleová kyselina
mRNA	„messenger RNA“ - informační/mediátorová RNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
S-S vazba	disulfidová vazba
SDS	dodecylsulfát sodný
ESI	„Electrospray ionization“ - ionizace elektrosprejem
MALDI	„matrix assisted laser desorption/ionization“ - laserem indukovaná desorpce/ionizace za přítomnosti matrice

<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
DTT	dithiothreitol
ACN	acetonitril
AA	kyselina octová
TFA	kyselina trifluoroctová
FA	kyselina mravenčí
ABC	hydrogenuhličitan amonný
NaOH	hydroxid sodný
TFE	trifluorethanol
BRUB	„Britton and Robinson Universal Buffer“
HCl	kyselina chlorovodíková
BSA	„bovine serum albumine“ - hovězí sérový albumin
FASP	„Filter Aided Sample Preparation“ - štěpení proteinů na membráně
SAX	„Post-FASP Strong Anion Exchange Separation“ - frakcionace peptidové směsi na iontoměničích
UV	ultrafialové záření
CD molekula	„cluster of differentiation“ - diferenční skupina
NF-κB	jaderný transkripční faktor
HIF-1α	hypoxia inducible factor-1α
AKR	aldo-keto reductasa
HSD	hydroxysteroid dehydrogenáza