



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Cílená a necílená metabolická
analýza krevní plazmy transgenních
potkanů s tauopatií**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Lenka Kocurová**
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Štěpán Kouřil**
Rok odevzdání práce: 2018

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Lenka Kocurová
Název práce	Cílená a necílená metabolomická analýza krevní plazmy transgenních potkanů s tauopatií
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Štěpán Kouřil
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Alzheimerova choroba patří mezi tauopatie, což je skupina neurodegenerativních onemocnění projevující se ukládáním hyperfosforylovaných a zkrácených tau proteinů ve formě neurofibrilárních klubek v neuronech a gliích. Cílem praktické části práce bylo analyzovat vzorky krevní plazmy transgenních potkanů s tauopatií a vzorky plazmy kontrolních potkanů. Byla využita metoda cílené metabolomické analýzy krevní plazmy technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií a metoda necílené lipidomické analýzy technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním analyzátozem Orbitrap. Cílenou analýzou bylo nalezeno 136 metabolitů. Mezi nejvíce diskriminujícími metabolity byly identifikovány především aminokyseliny a acylkarnitiny. Necílenou analýzou bylo detekováno 1507 neznámých, potencionálních metabolitů, jejichž identifikace není součástí této práce.</p>
Klíčová slova	Alzheimerova choroba, tauopatie, tau protein, metabolomika
Počet stran	60
Počet příloh	1
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's name and surname	Lenka Kocurová
Title of thesis	Targeted and untargeted metabolomic analysis of plasma samples from transgenic rats with tauopathy
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Štěpán Kouřil
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Alzheimer's disease is the most prevalent tauopathy. Tauopathies are neurodegenerative diseases characteristic by the deposition of hyperphosphorylated and truncated tau proteins in the form of neurofibrillary tangles located in neurons and glia. The aim of the practical part was to analyze blood plasma samples of transgenic rats with tauopathy and plasma samples of control rats. Targeted metabolomic analysis was performed using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and untargeted lipidomic analysis with the Orbitrap mass analyzer. 136 metabolites were identified by the targeted metabolomic analysis. Among the most discriminating metabolites, especially amino acids and acylcarnitines were identified. 1507 unknown metabolites were detected by untargeted analysis, whose identification is not aim of this work.</p>
Keywords	Alzheimer's disease, tauopathy, tau protein, metabolomics
Number of pages	60
Number of appendices	1
Language	Czech

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

V Olomouci dne 11. 5. 2018

.....

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Štěpánu Kouřilovi a stejně tak Mgr. Radaně Karlíkové za odbornou pomoc při práci v laboratoři, statistické vyhodnocení dat, vstřícnost, trpělivost a cenné rady při vyhotovení práce. Děkuji rovněž PharmDr. Andrejovi Kováčovi, PhD. za poskytnutí biologického materiálu.

OBSAH

Seznam zkratek	7
1 Úvod	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Tauopatie	10
2.2 Alzheimerova choroba	19
2.3 Metabolomika.....	21
2.4 Kapalinová chromatografie	24
2.5 Hmotnostní spektrometrie	24
3 Experimentální část	30
3.1 Chemikálie	30
3.2 Přístrojové vybavení.....	30
3.3 Biologický materiál	31
3.4 Postup cílené metabolomické analýzy	32
3.5 Postup necílené lipidomické analýzy.....	34
4 Výsledky a diskuze	37
4.1 Cílená metabolomická analýza	38
4.2 Necílená lipidomická analýza.....	46
5 Závěr.....	52
Použitá literatura	53
Přílohy.....	60

SEZNAM ZKRATEK

A β	β -amyloidní peptid
AD	Alzheimerova choroba
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
<i>APOE</i>	Gen kódující apolipoprotein E
APP	Amyloidní prekurzorový protein
<i>APP</i>	Gen kódující amyloidní prekurzorový protein
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
APP α	Velká aminokyselinová N-koncová doména
ATP	Adenosintrifosfát
CBD	Kortikobazální degenerace
CE	Kapilární elektroforéza
DESI	Desorpční ionizace elektrosprejem
EI	Elektronová ionizace
ESI	Elektrospejová ionizace
FAD	Familiární Alzheimerova choroba
FTDP17	Frontotemporální demence a parkinsonismus vázaný na chromozom 17
GC	Plynová chromatografie
GGT	Globulární gliální tauopatie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRAM	Hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením
ICR	Iontově cyklotronová rezonance
LC	Kapalinová chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MALDI	Ionizace laserovou desorpcí v přítomnosti matrice
MAP	Proteiny asociované s mikrotubuly
<i>MAPT</i>	Gen tau proteinu asociovaného s mikrotubuly
METLIN	Internetová databáze metabolitů a jejich hmotnostních spekter
MRM	Mód sledování produktu rozpadu iontu

MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
<i>m/z</i>	Poměr hmoty k náboji
NFT	Neurofibrilární klubka
NMR	Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie
OPLS-DA	Diskriminační analýza pomocí ortogonální projekce do latentních struktur
PCA	Metoda hlavních komponent
PDCG	Guamský parkinsonský demenční komplex
PEP	Postencefalický parkinsonismus
PHF	Párová helikální vlákna
<i>PSEN1</i>	Gen kódující presenilin 1
<i>PSEN2</i>	Gen kódující presenilin 2
PSP	Progresivní supranukleární obrna
QC	Vzorek kontroly kvality
QqQ	Trojité kvadrupól
Q-TOF	Kvadrupól s průletovým analyzátozem
RSD	Relativní standardní odchylka
RT	Retenční čas
SAD	Sporadická Alzheimerova choroba
SAM	S-adenosylmethionin
SF	Rovná vlákna
SHR 24	Kmen spontánně hypertenzních potkanů s mutací v genu <i>MAPT</i>
TIC	Celkový iontový proud
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1 ÚVOD

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění, které se řadí mezi tauopatie. Onemocnění provází charakteristické depozice amyloidu β a tau proteinů, které za fyziologického stavu zodpovídají za sestavení buněčných mikrotubulů v axonech. U tauopatií je však typické hromadění hyperfosforylovaných a zkrácených tau proteinů v neuronech a vznik nerozpustných, neurofibrilárních klubek. Práce se zabývá studiem metabolomu u vzorků krevní plazmy kontrolních (zdravých) potkanů a potkanů transgenních, kteří mají mutaci v genu *MAPT* způsobující dědičnou formu tauopatie. Cíle práce zahrnují vypracování literární rešerše na téma tauopatie a použité metabolomické metody, dále přípravu vzorků krevní plazmy transgenních potkanů s tauopatií, cílenou metabolomickou analýzu krevní plazmy technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, necílenou lipidomickou analýzu krevní plazmy technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním analyzátozem Orbitrap a v neposlední řadě vyhodnocení metabolomických dat a jejich srovnání s literaturou.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tauopatie

Termín tauopatie definuje skupinu patologických neurodegenerativních onemocnění, která jsou charakteristická ukládáním hyperfosforylovaných a zkrácených tau proteinů ve formě nerozpustných intracelulárních inkluzí neurofibrilárních klubek (NFT) v neuronech a gliích (Williams, 2006, Tacik a kol., 2016).

Tato onemocnění lze rozdělit do tří hlavních skupin: tauopatie spojené převážně s patologií tau proteinu, tauopatie související s depozicí amyloidu β a tauopatie sdružené s jinou patologií. První typ tauopatie zahrnuje například progresivní supranukleární obrnu či Pickovu nemoc. Mezi tauopatie související s výskytem amyloidu patří například Downův syndrom či Alzheimerova choroba (AD), což je nejčastější forma tauopatie. Příkladem onemocnění u tauopatie sdružené s jinou patologií je myotonická dystrofie. U všech těchto nemocí je společná přítomnost nerozpustných inkluzí tau a mechanismů, které vedou k poškození funkce mozkových buněk a následně k jejich smrti (Williams, 2006).

Tauopatie zahrnují více než 20 patologických stavů, jedny z nejčastějších jsou uvedeny v Tab. 1. Liší se výskytem inkluzí NFT, což je kompaktní vláknitá spleť, vznikající z párových helikálních vláken (PHF) tau proteinu. Patologické nálezy NFT se u jednotlivých forem tauopatií vyskytují v různých oblastech mozku (viz Tab. 1). Dále se tauopatie liší mírou patologie, odlišně tedy ovlivňují procesy v neuronech a gliích – astrocytech a oligodendrocytech (Josephs, 2015, Maccioni a kol., 2001, Coakeley a Strafella, 2017, Williams, 2006).

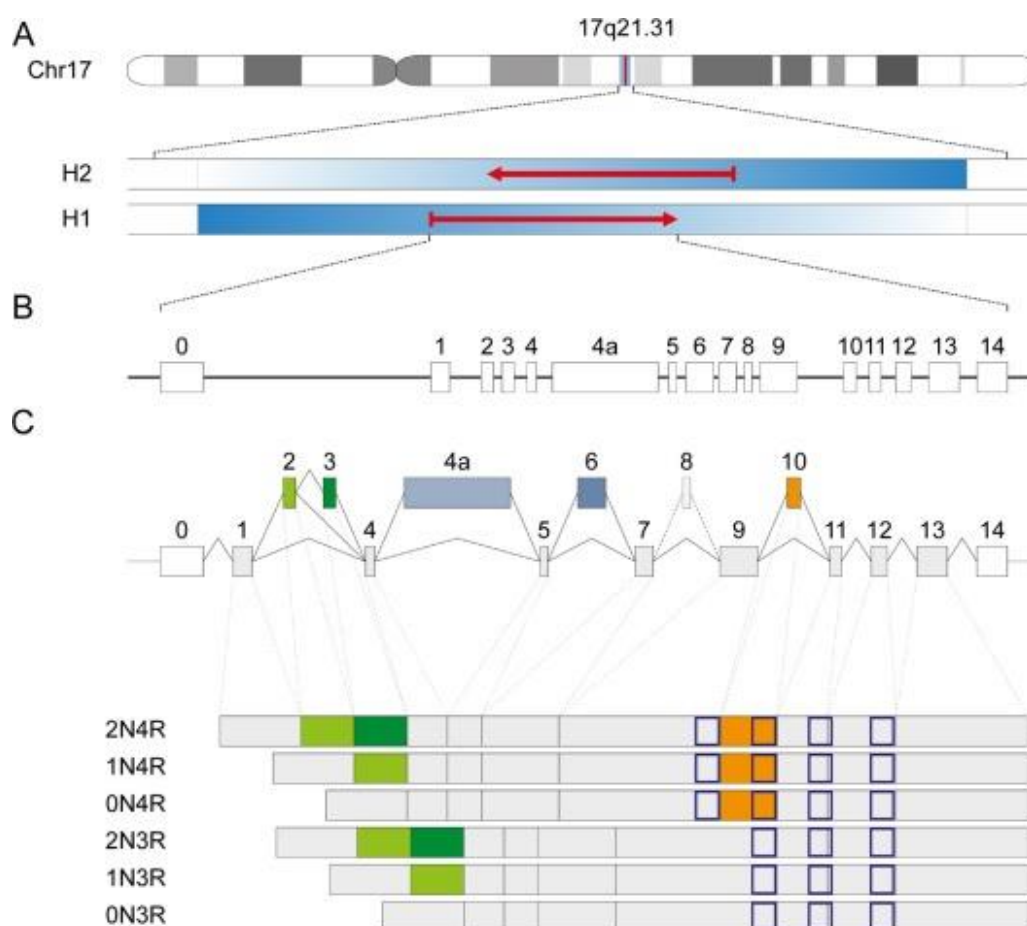
Tab. 1 Charakteristika šesti častých tauopatií

Tauopatie	Tau isoformy ^a	Znaky a symptomy	Rozšíření patologických inkluzí v mozku
Progresivní supranukleární obrna (PSP)	4R	Posturální nestabilita s pády, závratě, porucha koordinace očí, zpomalení pohybů, poruchy řeči	Bazální ganglia, subthalamické jádro, černá substance, mozeček
Kortikobazální degenerace (CBD)	4R	Porucha pohybových dovedností, ztuhlost, zpomalení pohybů, mimovolné stahování svalů, poruchy řeči	Kortex, bazální ganglia, mozkový kmen, hrbol mezimozkový
Frontotemporální demence a parkinsonismus vázaný na chromozom 17 (FTDP-17)	3R, 3 + 4R nebo 4R	Změny chování a osobnosti, ztuhlost, zpomalení pohybů, pozitivní rodinná anamnéza	Hipokampus, čelní a spánkové laloky, subkortikální jádra, mozeček
Guamský parkinsonský demenční komplex (PDCG)	3 + 4R	Demence, ztuhlost, zpomalení pohybů, zvýšené svalové napětí a slabost, záškuby	Čelní kůra
Postencefalický parkinsonismus (PEP)	3 + 4R	Zpomalení pohybů, třes, ztuhlost projevující se po letech od vzniku onemocnění	Černá substance, subthalamické jádro, bazální ganglia, mozkový kmen, amygdala
Globulární gliální tauopatie (GGT)	4R	Asymetrické zpomalení pohybů, ztuhlost, zvýšené svalové napětí, Babinského příznak, záškuby	Čelní lalok, subthalamické jádro, černá substance

^a R – počet vazebných domén na C-koncové oblasti proteinu (Upraveno podle: Josephs, 2015).

2.1.1 Gen *MAPT*

Gen *MAPT* je gen kódující tau protein. Nachází se na dlouhém raménku chromozomu 17 v pozici 17q21 a obsahuje 16 exonů (Sergeant a kol., 2005). Promotor zahrnuje exon 1, který může být přepisován, ale není překládán. Exony 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 a 13 jsou konstitutivní exony (trvale přepisované). Exony 2, 3 a 10 jsou alternativně sestřihovány. Exon 2 se může objevit sám, ale exon 3 se vždy objeví v závislosti na exonu 2. Exony 2, 3 a 10 se exprimují v dospělém mozku různě, za vzniku šesti tau isoformů (viz Obr. 1) (Irwin, 2016).



Obr. 1 Exprese genu *MAPT*, A: umístění genu *MAPT* na chromozomu 17 v pozici 17q21 a dva různé haplotypy označované H1 a H2; B: *MAPT* gen obsahující 16 exonů; C: Exony 2, 3 a 10 jsou alternativně sestřihovány, což má za následek vznik 6 isoformů tau proteinu lišící se přítomností N-koncových a C-koncových opakujících se oblastí (Převzato z: Arendt a kol., 2016).

Velikosti tau isoform se pohybují od 352 do 441 aminokyselin. Jejich molekulová hmotnost je v rozmezí od 37 do 65 kDa. Isoformy se liší přítomností tří (3R) nebo čtyř (4R) opakujících se oblastí v C-koncové (C-terminální) části molekuly (Sergeant a kol., 2005, Wang a Liu, 2008). Tyto sekvence jsou nezbytné pro vazbu na mikrotubuly. Ve zdravém dospělém mozku je vždy určitý poměr tau isoform, ale vlivem neurodegenerativního onemocnění je tento poměr často změněn (Williams, 2006). Isoformy se také liší přítomností či nepřítomností jednoho nebo dvou insertů (29 nebo 59 aminokyselin) v N-terminální části molekuly. Každá z isoform má pravděpodobně specifické fyziologické role. Například pouze jedna tau isoforma (bez N-terminálních insertů a se 3R C-terminálními oblastmi) je přítomna v průběhu fetální fáze, ale šest isoform (s jednou nebo dvěma N-terminálními inserty a 3R nebo 4R C-terminálními oblastmi) je přítomných v dospělosti (Buée a kol., 2000).

Genomová stavba genu *MAPT* v populacích evropského původu je charakterizována dvěma haplotypy, které pocházejí z inverzního (H1) nebo neinverzního (H2) polymorfismu (Arendt a kol., 2016).

Mutacemi v genu *MAPT* jsou způsobeny dědičné (familiární) formy tauopatie (Irwin, 2016). Příkladem dědičné formy tauopatie je FTDP-17 (Vandrovcova a kol., 2010).

Tauopatie jsou však ve většině případů sporadická onemocnění (Irwin, 2016), která nejsou spojena s mutacemi v genu *MAPT*. Příkladem je progresivní supranukleární obrna, kortikobazální degenerace či Pickova nemoc (Arendt a kol., 2016). V těchto případech však různé variace genu *MAPT* ovlivňují hladiny H1 a H2 haplotypu – tedy i riziko vzniku onemocnění (Vandrovcova a kol., 2010). Rizikovým faktorem pro výše zmíněná onemocnění je dědičnost haplotypu H1 a genotypu H1/H1. Zdá se, že haplotyp H1 vyvolává zvýšenou expresi tau (většinou 4R isoform). H2 haplotyp je spojen se zvýšenou expresí exonu 3 *MAPT* v šedé hmotě. Podle Arendta (2016) by mohla být přítomnost exonu 3 protektivní proti výše zmíněným onemocněním. U jedinců s genotypem H1 / H2, kteří trpěli Downovým syndromem, bylo zjištěno vyšší riziko vzniku demence před dosažením věku 45 let (Arendt a kol., 2016).

2.1.2 Tau protein a jeho funkce

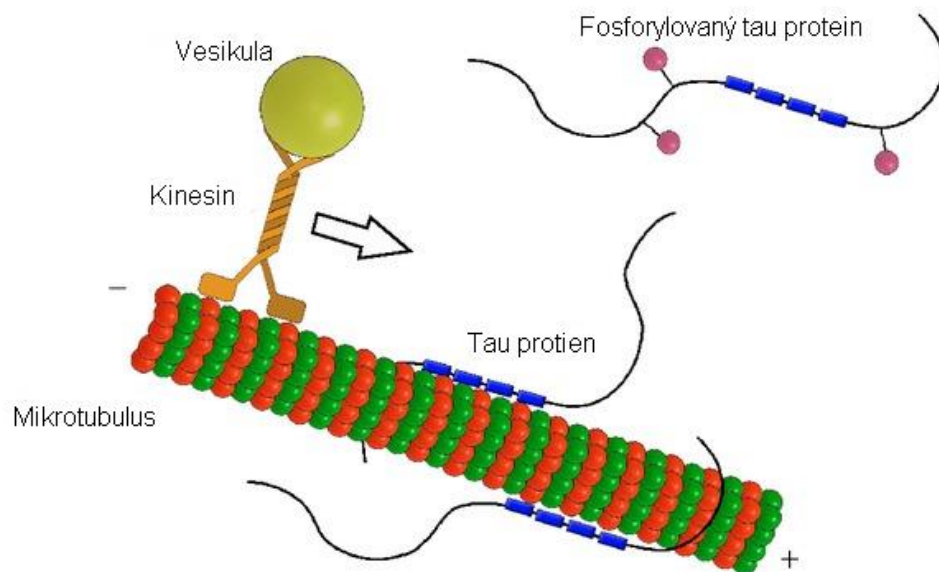
Tau protein (z anglického Tubulin Associated Unit), nazvaný řeckým písmenem τ (tau) byl objeven jako proteinový faktor podporující sestavení tubulinu do mikrotubulů (Weingarten a kol. 1975). Tau proteiny patří do rodiny bílkovin asociovaných s mikrotubuly (MAP). V mozku savců jsou přítomny proteiny MAP6, MAP4, MAP2, MAP1 a tau (viz Tab. 2), což jsou v této tkáni nejčastější typy MAP. Tau se nacházejí ve všech částech mozku a nejvíce se exprimují v neuronech. Naopak MAP4 se v neuronech vůbec neexprimují (Williams, 2006, Buée a kol., 2000, Dehmelt a Halpain, 2004, Deloulme a kol., 2015).

Tau je hlavní regulátor tvorby mikrotubulů v buňkách (Weingarten a kol. 1975). Mikrotubuly jsou dynamické, nestabilní proteinové polymery cytoskeletu (tvoří jednu z jeho hlavních složek) a patří mezi důležité strukturální prvky buňky. Podílejí se na intracelulárním transportu (pomocí motorických proteinů kinesinu a dyneinu), na udržování tvaru buňky a plní významnou funkci při mitóze (Kosik, 1993, Buée a kol., 2000, Mandelkow a Mandelkow, 2012, Dehmelt a Halpain, 2004). Nicméně tau proteiny mohou inhibovat motorickou aktivitu a transport vesikul podél mikrotubulů (Obr. 2), pokud se tau proteiny naváží na mikrotubuly (Dehmelt a Halpain, 2004) prostřednictvím své C-koncové domény. Váží se podél glutamylovaných částí mikrotubulů a zabraňují tak jejich depolymeraci (Chapin a Bulinski, 1992, Desai a Mitchison, 1997), kterou na kladném konci mikrotubulů indukuje katanin (Zhang D. a kol., 2011). Vazba tau proteinů na tubulin mikrotubulů je určena fosforylačním stavem (tau za fyziologického stavu obsahuje 2 až 3 fosfátové skupiny), který je regulován koordinovaným působením kinas a fosfatas na molekuly tau (Mandelkow a kol., 1995, Liu a kol., 2005, Lippens a kol., 2007).

Tab. 2 Rodina MAP nacházející se v mozku savců, příklady s nimi interagujících proteinů a význam interakcí

MAP protein	Lokus genu	Interagující protein	Funkce interakce
Tau	17q21	Tubulin	Stabilizace mikrotubulů; inhibice depolymerizace, zvýšení tuhosti mikrotubulů
		Fyn	Organizace mikrotubulů, patogeneze AD
		Presenilin 1	Spojuje tau s glykogensynthasa kinasou 3 β , patogeneze AD
		Apolipoprotein E	Regulace metabolismu tau, patogeneze AD
		Kalmodulin	Regulace sestavování mikrotubulů
MAP1A	15q13	Tubulin	Stabilizace mikrotubulů
MAP1B	5q13	Tubulin	Stabilizace mikrotubulů
MAP2	2q34	Tubulin	Stabilizace mikrotubulů, inhibice depolymerizace, zvýšení tuhosti mikrotubulů, neuronální morfogeneze
MAP4	3p21	Tubulin	Stabilizace mikrotubulů, inhibice depolymerizace
MAP6	11q13	Semaphorin 3E	Efektor při vývoji axonů

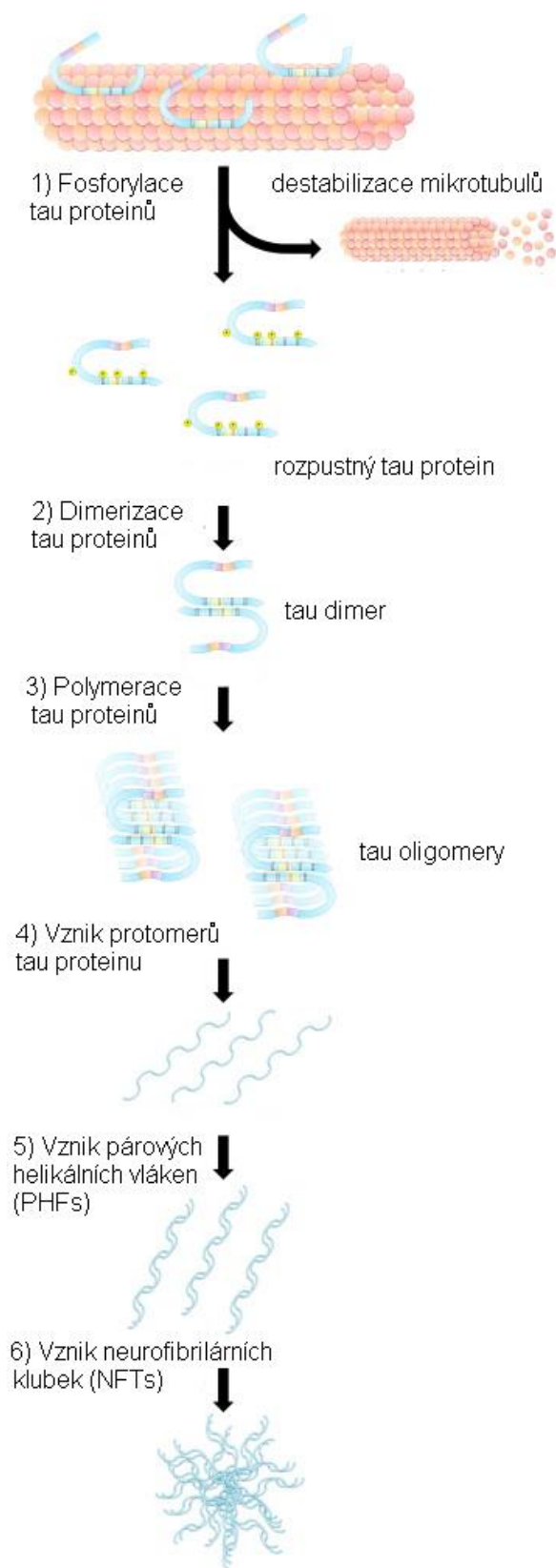
(Upraveno podle: Dehmelt a Halpain, 2004, Halpain a Dehmelt, 2006, Deloulme a kol., 2015, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4135>)



Obr. 2 Funkce tau proteinu za fyziologického stavu. Tau protein stabilizuje mikrotubuly přes čtyři domény vázající tubulin (modré obdélníky) v případě nejdelší tau isoformy. Fosforylací tau (růžové kuličky) se reguluje vazba proteinu tau na mikrotubuly. Tau po navázání na mikrotubuly může ovlivnit axonální transport a inhibovat transport vesikul kinesinem (Upraveno podle: Kolarova a kol., 2012).

2.1.3 Vznik tau agregátů

K akumulaci tau proteinu ve formě NTF vede mutace v *MAPT* genu, toxiny životního prostředí, poškození neuronů v důsledku traumatu, ukládání amyloidů nebo různé enzymové dysfunkce (Williams, 2006, Arendt a kol., 2016). Uvolnění tau z mikrotubulů (např. fosforylací) vede k destabilizaci mikrotubulů (viz Obr. 3). Stejného účinku je docíleno pseudofosforylací tau na specifických místech (S262, S293, S324 a S356), kdy jsou fosforylační místa nahrazena kyselinou glutamovou nebo kyselinou asparagovou. Vzniklé rozpustné proteiny tau, které jsou pozměněny posttranslačními modifikacemi, přímo nebo nepřímo mění svou konformaci. Tímto vznikají anti-paraletní dimery tau. Stabilní tau dimery tvoří tau oligomery, které pokračují v agregačním procesu a tvoří podjednotky vláken nazývané protomery. Dva protomery vytvářejí PHF nebo rovná vlákna (SF), která se dále shromažďují v NFT (Lippens a kol., 2007, Martin a kol., 2011).



Obr. 3 Proces vzniku tau agregátů: 1) Fosforylace vede k zabránění (zamezení) vazby tau na mikrotubuly a vznikají rozpustné tau. 2) Rozpustné monomerní formy tau se dimerizují. 3) Nově vytvořené tau dimery se shlukují do oligomerů. 4) Oligomery se organizují do protomerů. 5) Protomery se shromažďují v párová helikální vlákna. 6) Agregace párových helikálních vláken do neurofibrilárních klubek (Upraveno podle: Martin a kol., 2011).

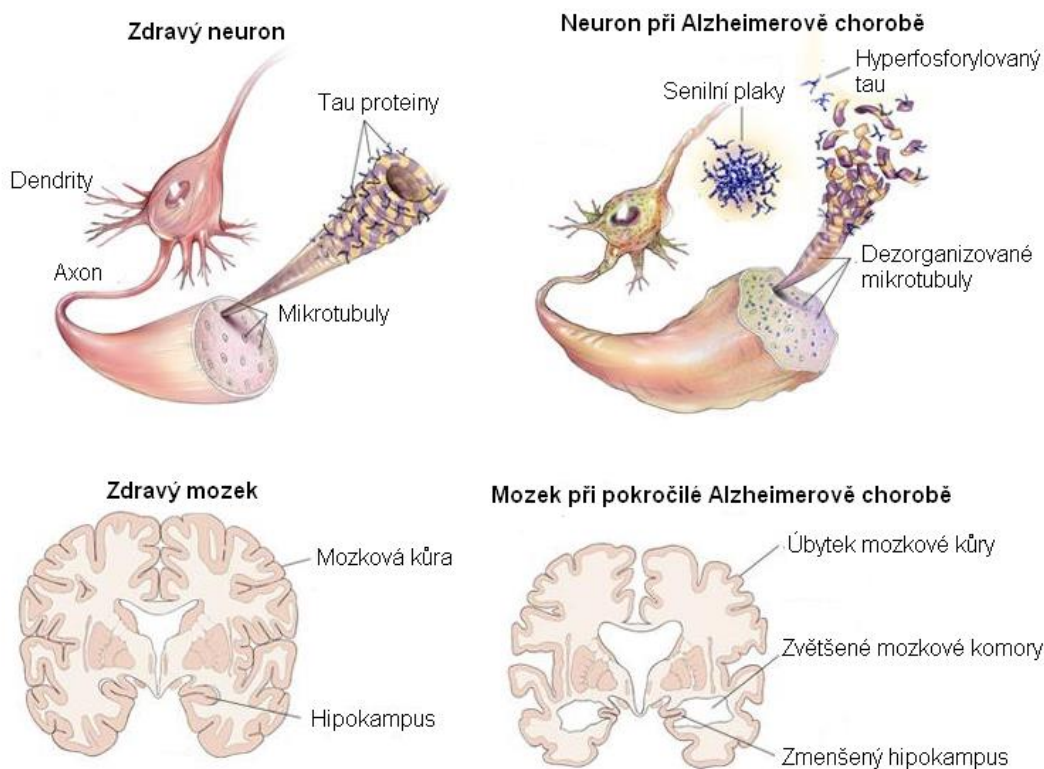
Na agregaci tau proteinů do PHFs se podílí několik posttranslačních mechanismů. Nejčastější posttranslační modifikací tau proteinu je fosforylace, při které mohou vznikat abnormality klíčové pro agregaci tau (Buée a kol., 2000, Martin a kol., 2011). Na abnormální fosforylaci se podílejí dvě hlavní proteinové kinasy: cyklin-dependentní kinasa Cdk5 a glykogensynthasa kinasa GSK3 β . Omezení regulace Cdk5, vyvolané například extracelulární akumulací amyloidu, má za následek tau hyperfosforylaci (Maccioni a kol., 2001). Samotná tau fosforylace však není dostatečná pro vyvolání agregace tau, pravděpodobně se na tomto ději podílejí i další posttranslační modifikace, například ubikvitinace, oxidace či glykosylace (Buée a kol., 2000, Martin a kol., 2011).

O-glykosylace je charakterizována přidáním O-vázaného N-acetylglukosaminového (O-GlcNAc) zbytku na serin nebo threonin v blízkosti prolinových zbytků tau proteinu pomocí N-acetylglukasamintransferasy. Reakce ovlivňuje interakci tau s tubulinem, reguluje transkripci, buněčný cyklus a je důležitá pro sestavení proteinových komplexů (Buée a kol., 2000). Fosforylace a O-glykosylace mohou mít ovšem i opačné účinky. Stechiometrické změny v N-acetylglukosaminovém zbytku mohou měnit funkci tau a vést k degradaci tau proteinů (Buée a kol., 2000).

Tau proteiny se za normálního stavu váží na mikrotubuly v axonech, což je regulováno několika mechanismy. Mezi jeden z těchto mechanismů patří mikrotubulární retrogradní záchranná bariéra (v počáteční části axonu), která udržuje tau v axonu. Bariéra zachycuje tau, který difunduje cytolem v axonální komoře. Hyperfosforylace tau může způsobit nesprávné zařazení rozpustného tau do somatodendritického prostoru (Arendt a kol., 2016). V takovém případě vznikají NFT a naruší se integrita buněčné membrány. Hyperfosforylace tau proteinu snižuje schopnost tau navázat se na tubulin, což vede k dezorganizaci mikrotubulů (Obr. 4). Poruchy transportu mikrotubulů v axonech ovlivňují mitochondrie, které se hromadí v somatodendritické části a nevzniká dostatek energie v axonech. Vznikají dysfunkční synapse, dochází k degeneraci axonu neuronů a ke ztrátě synapsí (Avila, 2008, Iqbal a Grundke-Iqbal, 2008, Voelzmann a kol., 2016, Kopeikina a kol., 2012).

2.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější tauopatií, vyznačující se poruchou paměti a kognitivních schopností. AD a příbuzné tauopatie jsou histopatologicky charakterizovány ztrátou synapsí a pomalou, progresivní neurodegenerací. Onemocnění je spojeno s akumulací intracelulárních NFT a také s extracelulárním ukládáním senilních plaků tvořených z vláken β -amyloidního peptidu ($A\beta$) (Obr. 4) (Maccioni a kol., 2001, Czech a kol., 2012, LaFerla a kol., 2007). Senilní plaků a NFT jsou přítomny hlavně v oblastech mozku, které jsou důležité pro učení, paměť a emoční chování – v entorinální kůře, hipokampu, předním mozku a amygdale (Mattson, 2011).



Obr. 4 Porovnání neuronu a mozku (zdravý/ovlivněný AD). Zdravý neuron má mikrotubuly stabilizované tau proteiny. Při onemocnění AD dochází k hyperfosforylaci tau proteinů, čímž se snižuje schopnost tau navázat se k tubulinu a dochází k dezorganizaci mikrotubulů. Tau proteiny se následně ukládají ve formě neurofibrilárních klubek. Dochází rovněž k extracelulárnímu ukládání plaků β -amyloidních peptidů. V mozku postiženém AD je patrný úbytek mozkové tkáně oproti zdravému mozku (Upraveno podle: Morreale, 2015).

Mozek postižený AD prochází řadou dalších strukturálních a funkčních změn, které vedou ke smrti neuronů. Dochází k zánětlivým reakcím a oxidativnímu stresu, který je charakterizován zvýšenou peroxidací membrán, zvýšenou oxidací proteinů a změnami hladiny antioxidantních enzymů. Kromě toho se akumulují vápenaté ionty a dochází k poruchám funkce transportního systému buňky (LaFerla a kol., 2007, Varadarajan a kol., 1999).

Vznik AD ovlivňují genetické (70 %) a environmentální (30 %) příčiny. Do první skupiny se řadí geny zodpovědné za sporadickou formu onemocnění (SAD) a geny spojené s rodinnou anamnézou onemocnění (familiární AD, FAD). FAD představuje asi 5 až 10 % všech případů AD s charakteristickými časnými projevy patogeneze a časným nástupem demence (přibližně 40 let). Je za ni zodpovědný gen *APP* (kódující amyloidní prekurzorový protein), lokalizován na 21. chromozomu, dále gen *PSEN1* (kódující presenilin 1) a *PSEN2* (kódující presenilin 2). Všechny výše uvedené geny ovlivňují metabolismus nebo stabilitu A β , dědí se autozomálně dominantně a jsou využívány k vytvoření transgenních myších modelů AD. Gen *APOE* (kódující apolipoprotein E) je zodpovědný za SAD. V současné době se předpokládá, že *APOE* je rizikovým faktorem jak pro SAD, tak pro FAD s pozdním nástupem projevů nemoci. Další faktory, které souvisí s příčinou vzniku onemocnění, jsou poruchy metabolismu lipidů, biotiolu a poruchy transportu metabolitů (Dorszewska a kol., 2016, Maccioni a kol., 2001, LaFerla a kol., 2007).

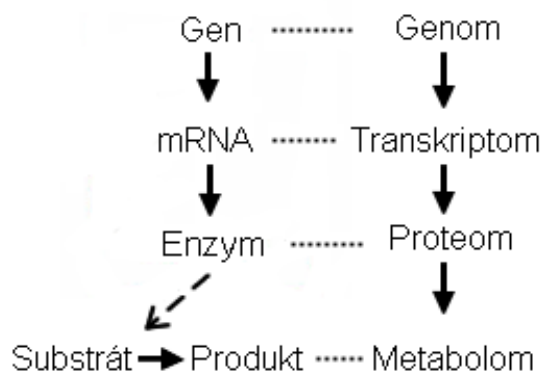
Proteolytickým štěpením amyloidního prekurzorového proteinu (APP) skupinou enzymů nazvaných α , β a γ -sekretasy může vznikat A β (LaFerla a kol., 2007, Dorszewska a kol., 2016) v závislosti na metabolické dráze – dělí se na amyloidogenní a neamyloidogenní (LaFerla a kol., 2007). A β je fibrilární peptid o délce 38 – 43 aminokyselin. Isoformy amyloidu β o délce 40 a 42 aminokyselin vykazují největší neurotoxické účinky (Varadarajan a kol., 1999, Zhang Y. a kol., 2011).

A β peptid byl v polovině osmdesátých let identifikován jako složka extracelulárních amyloidních plaků, později se však potvrdila existence intracelulárních A β a bylo prokázáno, že jejich akumulace předchází tvorbě extracelulárních plaků. Intracelulární akumulaci a produkci A β podněcuje vazba

A β na $\alpha 7$ nikotinový acetylcholinový nebo apolipoproteinový receptor. Intracelulární A β jsou tvořeny jako monomery, ale agregují se do komplexů, vyskytující se ve formě dimerů, trimerů, protofibril či fibril s vyšší molekulovou hmotností. Na transgenních myších modelech bylo zjištěno, že oligomery působí na vznik plaků nejvíce, jelikož narušují synaptické funkce v buňce. Mohou rovněž přispívat ke vzniku NFT a poškození DNA a RNA (LaFerla a kol., 2007, Dorszewska a kol., 2016).

2.3 Metabolomika

Metabolomika je vědní obor, který se zabývá analýzou nízkomolekulárních metabolitů (<1500 Da) v konkrétním čase (Wishart a kol., 2007). Lze analyzovat extracelulární metabolity (footprinting) a intracelulární metabolity (fingerprinting) (Pinu a Villas-Boas, 2017) v určitém orgánu či organismu. Podobný přístup komplexní analýzy existuje při zkoumání genů (genomika), transkribované RNA (transkriptomika) a proteinů (proteomika) (viz Obr. 5) (Hollywood a kol., 2006). Přípona "- om" označuje celistvost a vědy založené na těchto přístupech jsou seskupeny pod označením "omiky" (Amaro a kol., 2016).



Obr. 5 Centrální dogma molekulární biologie (v levé části) a zároveň schéma toku informací od genotypu k fenotypu v buňce, které odpovídá schématu v pravé části – zájmy omických věd (upraveno podle: Hollywood a kol. 2006).

2.3.1 Metabolomická analýza

Experiment se obvykle skládá z následujících kroků: sběru vzorků, extrakce, analýzy, redukce dat a statistického zpracování (Mushtaq a kol., 2014).

V prvním kroku jsou sbírány vzorky (např. plazma, mozkomíšni mok nebo tkáň) (Kaddurah-Daouk a kol., 2008). Odběr vzorků pro metabolomickou analýzu by měl proběhnout co nejrychleji. Metabolické změny se v živém organismu dějí neustále a po odběru vzorku také, což je nežádoucí (mohou změnit původní metabolický profil), měly by být tedy pohotově zastaveny veškeré metabolické procesy. Vzorky mohou být poté dlouhodobě uchovány při -80°C (Mushtaq a kol., 2014).

Pro dosažení účinné extrakce, což je další důležitý krok metabolomické analýzy, by měly být vzorky zhomogenizovány. Cílem extrakce je získání maximálního počtu metabolitů ze vzorku, čehož lze dosáhnout použitím různých kombinací rozpouštědel (Mushtaq a kol., 2014), rozmanitých metod a analytických technik. Používána je například kapalinová (LC) a plynová chromatografie (GC), kapilární elektroforéza (CE), nukleární magnetická rezonanční (NMR) spektroskopie a hmotnostní spektrometrie (MS). Žádná z těchto technik nemůže vystihnout všechny metabolomické informace ve vzorku, proto se k rozšíření poznatků o analytu využívají jejich kombinace (Kaddurah-Daouk a kol., 2008).

GC, LC nebo CE jsou separační techniky (Kaddurah-Daouk a kol., 2008), zajišťující vysokou citlivost metody a specifčnost. Separace pomocí GC je ideální pro sledování metabolitů s nízkou molekulovou hmotností a vyšší těkavostí, vyžaduje však komplexní úpravu vzorku před analýzou. Separace pomocí LC je vhodná pro analýzu hydrofilních i hydrofobních metabolitů (Zhou a Yin, 2016).

Po separaci následuje detekce například pomocí MS či NMR. Poté lze získaná data procesovat pomocí různých softwarů, například MathDAMP, MetAlign, MZMine nebo XCMS (Kaddurah-Daouk a kol., 2008, Patti a kol., 2012). Data se posléze vyhodnocují a statisticky zpracovávají.

2.3.2 Cílená metabolomická analýza

Postupy cílené metabolomické analýzy umožňují ve vzorku analyzovat konkrétní metabolity, které jsou předmětem zájmu (Patti a kol., 2013) a jejichž chemické složení je obvykle předem charakterizováno (Roberts a kol., 2012).

Tento přístup je založen na módu sledování produktu rozpadu iontu (MRM) u každého cílového metabolitu (Bajad a Shulaev, 2007). Jednotlivé metabolity jsou specifikovány určitými parametry. Molekuly analyzovaných metabolitů (nejčastěji desítky až stovky sloučenin) je nutné rozlišit od jiných interferujících sloučenin například na základě chemického posunu v NMR spektru, podle doby separace sloučeniny – tedy podle retenčního času (RT) v chromatografii nebo podle dělení analytů na základě poměru hmoty k náboji (m/z) v hmotnostním spektrometru (Kaddurah-Daouk a kol., 2008, Lu a kol., 2008). Obecně se používá chromatografická separace, následovaná citlivou MS (Dunn a Ellis, 2005).

2.3.3 Necílená metabolomická analýza

Záměr necílené metabolomické analýzy je detekce a komplexní zobrazení všech látek obsažených ve vzorku, což zahrnuje analýzu známých metabolitů a také metabolitů, které jsou opakovaně detekovány, ale nebyly dosud identifikovány. Není tedy známá identita a chemické složení analytů (Bajad a Shulaev, 2007, Kaddurah-Daouk a kol., 2008, Patti a kol., 2013).

Účelem necílené analýzy je vytvoření souhrnného profilu, což je zdroj velkého množství informací a je obtížně interpretovatelný. Existují proto databáze, do kterých jsou vkládány informace o spektrech z analýz různých vzorků (Patti a kol., 2013) a zahrnují identitu metabolitů nebo popis jejich vlastností. Příkladem je databáze METLIN, která je určena pro archivaci, vizualizaci a analýzu dat metabolitů. Poskytuje informace z více biologických zdrojů o struktuře a fyzikálních údajích známých endogenních metabolitů (velikosti 100 až 1200 daltonů). Databáze dále obsahuje vysoce přesné údaje spekter z Fourierovy transformační MS z různých tkání, spektra tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) známých metabolitů, profily LC-MS ze širokého spektra vzorků a metody jejich zpracování (Smith a kol., 2005).

2.4 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je analytická metoda, jejíž princip je založen na separaci látek v analyzovaném vzorku. Analyzované látky rozpuštěné v mobilní fázi interagují se stacionární fází (která je obsažena v separační koloně) a různou měrou jsou tak zadržovány. Složení a charakter mobilní a stacionární fáze ovlivňují retenci látek. Molekuly silně interagující se stacionární fází se zadrží v koloně déle než molekuly, které se stacionární fází interagují málo nebo vůbec (Jandera, 2011).

V současnosti je hojně využívaným typem vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (Jandera, 2011) a především ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), umožňující snížení spotřeby rozpouštědel ve srovnání s HPLC. Poskytuje rovněž lepší chromatografické rozlišení, vyšší citlivost a kratší čas analýzy (Cielecka-Piontek a kol., 2013).

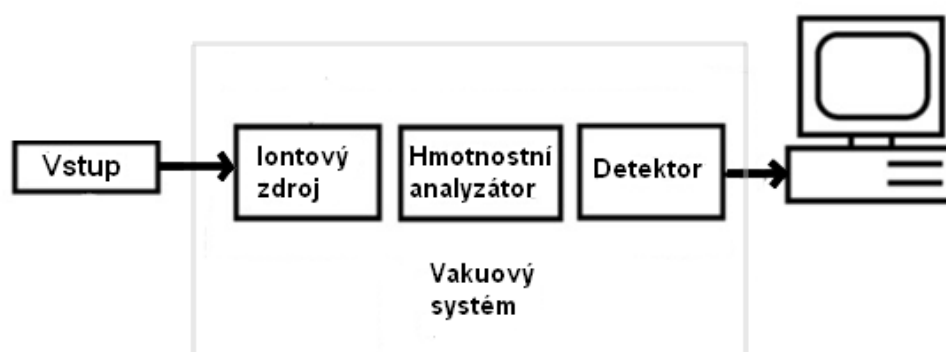
Při použití kombinovaného systému LC-MS/MS se nejdříve separují metabolity pomocí kapalinové chromatografie, která je následovaná jejich analýzou v hmotnostním spektrometru (Zhou a Yin, 2016). Výsledkem jsou chromatogramy závislosti intenzity signálu na čase. Kvantifikace složek je prováděna na základě plochy píků (Jandera, 2011).

2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, poskytující kvalitativní (strukturní) i kvantitativní informace o molekulách analytu ve formě iontů (Ho a kol., 2003), které jsou separovány podle poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z) v hmotnostním spektrometru. Následně jsou tyto nabitě částice detekovány (Grebe a Singh, 2011, Dunn a Ellis, 2005) a vytvořeny hmotnostní spektra, podle kterých může být analyt identifikován a dále charakterizován (Kaddurah-Daouk a kol., 2008).

Analýza biologických vzorků pomocí MS se skládá ze čtyř základních kroků (viz Obr. 6):

1. Pevný, kapalný nebo plynný vzorek (analyt) vstupuje do zařízení pro vstup vzorku společně s matricí (například mobilní fáze z LC).
2. Analyty jsou ionizovány v iontovém zdroji a přecházejí do plynné fáze. Vznikají kladně nebo záporně nabitě molekulární ionty (M^+ , M^-), aduktové ionty ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+CH_5]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ ap.) nebo fragmenty ionizované molekuly (v případech méně stabilních látek).
3. Ionty přecházejí do hmotnostního analyzátoru a oddělují se na základě m/z . Analyzátor je založen na různých principech. Prvním typem jsou analyzátor, které průběžně v čase oddělují ionty a vysílají je k detektoru (kvadrupólové analyzátor nebo sektorové přístroje). Druhou skupinu tvoří analyzátor s transmisí všech iontů současně do letové trubice. V trubici dochází k separaci iontů v důsledku rozdílné doby letu k detektoru (Quadropole Time of Flight, Q-TOF). Další skupinu tvoří analyzátor zachycující ionty v cele či pasti (elektrostatická iontová past – Orbitrap nebo iontově cyklotronová rezonance, ICR)
4. Ionty jsou detekovány a kvantifikovány pomocí detektoru. ICR a Orbitrap využívají Fourierovu transformaci a kombinují analyzátor a detektor v jedné měřicí cele (Grebe a Singh, 2011, Friedecký a Lemr, 2012).

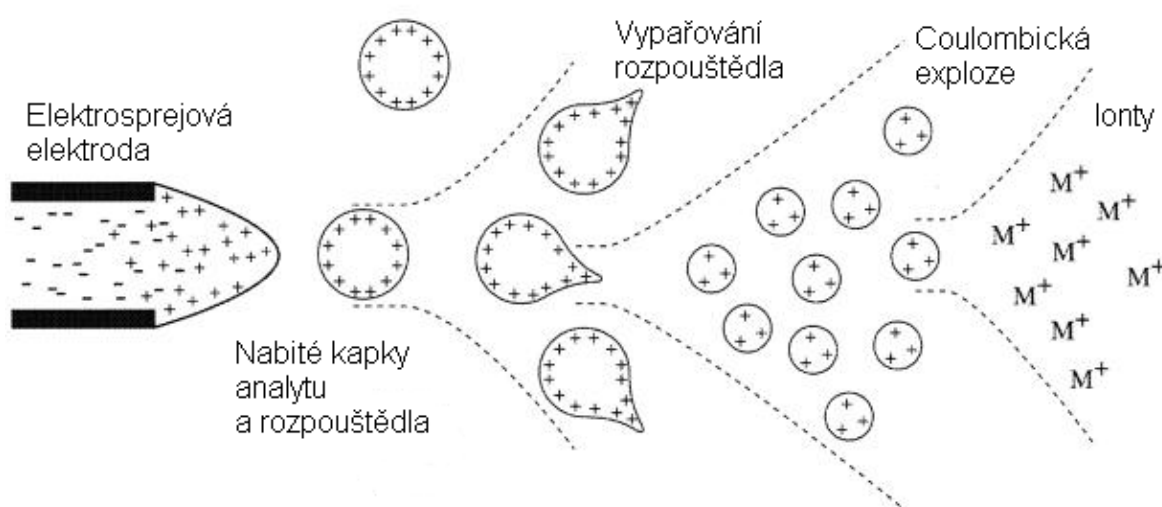


Obr. 6 Schéma postupu analýzy vzorku pomocí hmotnostní spektrometrie

2.5.1 Iontový zdroj

Iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k ionizaci analyzovaných molekul na kladně nebo záporně nabitě ionty, které poté pokračují do dalších částí přístroje (Ho a kol., 2003). Dělí se na zdroje s tvrdou a měkkou ionizací. Do první skupiny patří například elektronová ionizace (EI), druhá skupina zahrnuje například elektrosprej (ESI), APPI, APCI, MALDI nebo DESI (Friedecký a Lemr, 2012). Níže je popsána metoda ionizace pomocí ESI, jelikož byla využita jak při cílené, tak necílené analýze.

Při ESI (Obr. 7) je analyt rozpuštěn v rozpouštědle a tento roztok prochází přes kapiláru pod vysokým napětím (2-5 kV). Na hrotu elektrody (kapiláry) mají kapičky mobilní fáze i analyt stejnou polaritu, vytváří tzv. Taylorův kužel, který je následně rozprášen díky zmlžovacímu plynu o zvýšené teplotě. Vznikají nabitě kapičky (kladného nebo záporného náboje), jejichž povrchový náboj se zvyšuje vlivem proudu plynu o zvýšené teplotě, který z nich odpařuje rozpouštědlo. Dochází takto ke zmenšení povrchové velikosti kapiček (počet nábojů v nich se však nemění). Coulombické odpuzování v určitém okamžiku překoná povrchové napětí, dochází k explozi nabitých kapiček a vznikají ionty v plynné fázi (Lu a kol., 2008, Friedecký a Lemr, 2012). ESI pracuje v pozitivním nebo negativním iontovém režimu, kdy je k iontu přidán proton nebo je naopak proton z iontu odtržen (Dunn a Ellis, 2005).

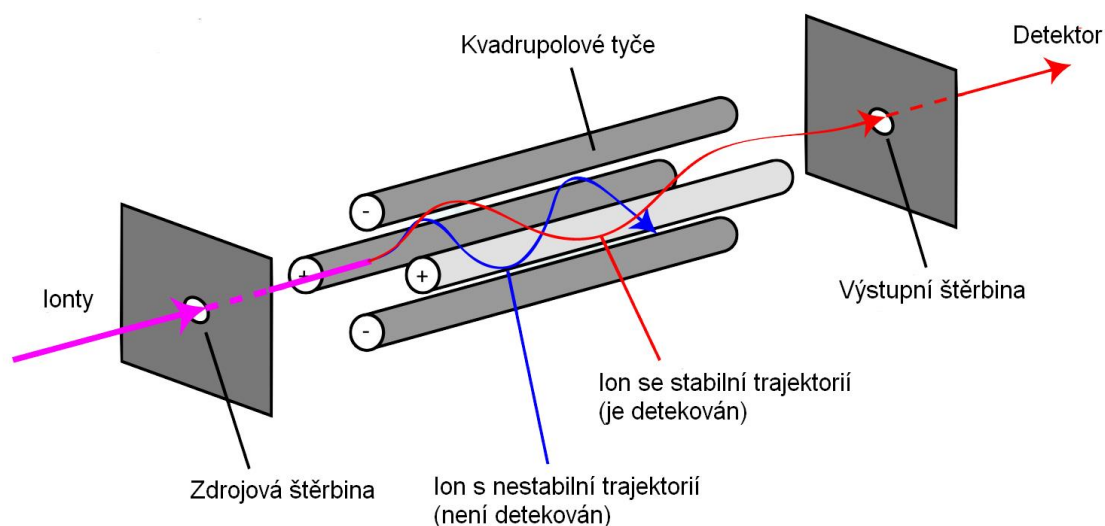


Obr. 7 Mechanismus elektrosprejové ionizace (upraveno podle: Ho a kol., 2003).

2.5.2 Hmotnostní analyzátořy

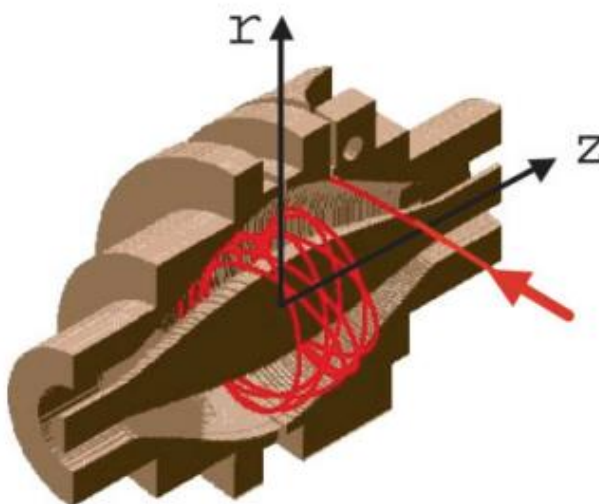
Hmotnostní analyzátořy běžně používané pro studium metabolomu se dělí na analyzátořy s nízkým rozlišením a vysokým rozlišením. Trojitý kvadrupól (QqQ) je příkladem techniky s nízkým rozlišením. Mezi techniky s vysokým rozlišením (HRAM) patří Q-TOF, Orbitrap nebo ICR (Zhou a Yin, 2016).

Kvadrupólový analyzátoř (viz Obr. 8) je sestaven ze čtyř paralelních kovových tyčí. Každá dvojice protilehlých tyčí je elektricky spojena. V určitém čase mají stejnosměrné napětí o stejné velikosti a na diagonálně umístěný pár tyčí je aplikováno střídavé napětí. Výsledné elektrické pole způsobuje, že se ionty pohybují dopředu a v rovině x-y. Amplituda kmitání je závislá na poměru m/z , který je ovlivněn změnou napětí (Ho a kol., 2003)



Obr. 8 Kvadrupólový hmotnostní analyzátoř. Ion se pohybuje ze zdroje a osciluje v prostoru mezi 4 tyčemi směrem k detektoru. (Upraveno podle: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml>)

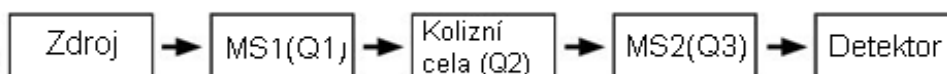
Orbitrap se skládá z tenkovrstvé centrální elektrody, elektricky izolované vnější válcové elektrody a dvou koncových elektrod. Mezi speciálně tvarovanými vnějšími a vnitřními elektrodami vzniká stejnosměrné napětí. Stabilní trasy iontů zahrnují oběžný pohyb kolem centrální elektrody. Současně ionty kmitají ve směru z a frekvence kmitů je úměrná poměru m/z (Ho a kol., 2003, Ho a kol., 2005).



Obr. 9 Hmotnostní analyzátor Orbitrap. Ionty jsou vstříkovány do Orbitrapu v bodě označeném červenou šipkou kolmo na osu z a pohybují se kolem elektrody (osa r) (Převzato z: Ho a kol., 2005).

Tandemový hmotnostní spektrometr (MS/MS) umožňuje identifikaci a především kvantifikaci metabolitů (Dunn a Ellis, 2005). Kombinuje hmotnostní analyzátoři, což poskytuje řadu výhod. Příkladem je již zmíněný QqQ, Q-TOF nebo kvadrupól s Orbitrapem. Trojitý kvadrupól může pracovat v režimu skenu produktových iontů, skenu prekurzorových iontů, skenu neutrální ztráty nebo MRM (Friedecký a Lemr, 2012).

QqQ v režimu MRM obsahuje dva kvadrupólové hmotnostní analyzátoři, které jsou odděleny kolizní celou (viz Obr. 10). První kvadrupól (Q1) slouží jako filtr. Ze vzorku je vybrán specifický molekulární ion podle hodnoty m/z , vstupuje do kolizní cely (druhý kvadrupól, Q2), v níž dochází k interakci s kolizním plynem (argonem nebo dusíkem) a ion se fragmentuje na produktové ionty. Třetí kvadrupól (Q3) funguje jako Q1 a propouští pouze vybrané ionty vytvořené v Q2, které jsou následně detekovány v detektoru (Ho a kol., 2003, Lu a kol., 2008).



Obr. 10 Schéma analyzátoři tandemového hmotnostního spektrometru (Upraveno podle: Grebe a Singh, 2011).

2.5.3 Detektor

Detektory lze rozdělit do dvou skupin podle schopnosti záznamu iontů. V první skupině jsou zařazeny detektory, které zaznamenávají všechny ionty bez ohledu na velikosti m/z . Tyto detektory měří elektrický proud, který vzniká při srážce iontu s dynodou a poté je proud zesílen pomocí elektronového násobiče. Do druhé skupiny patří detektory, které jsou schopny zaznamenat ionty i ve vztahu k velikosti m/z . V této skupině je zařazena ICR a Orbitrap. Ionty jsou detekovány jako komplexní obraz všech přítomných iontů s různými hodnotami m/z . Příčinou je indukce proudu v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátoři a signál je poté zpracován Fourierovou transformací (Friedecký a Lemr, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Acetonitril (LC-MS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), amoniak 25% (LC-MS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), isopropylalkohol (IPA) (LC-MS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), kyselina octová (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), terc-buthyl(methyl)ether (MTBE) (LC-MS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), voda (LC-MS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.2 Přístrojové vybavení

Magnetická míchačka (MSH-300, Biosan, Lotyšsko), pH metr (Cyberscan pH 510; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), chlazená centrifuga (Rotina 410; Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo), třepačka (PSU-10i, Biosan, Lotyšsko), vortex (IKA Works, USA), lyofilizátor (FreeZone; Labconco, USA), kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), tandemový hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA) a hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA).

3.3 Biologický materiál

V experimentu byla použita plazma potkanů speciálního kmene SHR24 (spontánně hypertenzní křisy) s mutací v genu *MAPT* kódující lidský zkrácený tau, konkrétně isoformu 3R (Levarska a kol., 2013). Z celkového počtu 17 transgenních zvířat bylo 15 samic (F) a 2 samečci (M) o stáří 14 až 15 měsíců. Šestnáct zdravých potkanů neboli kontrol (C) se lišili stářím, kdy byla zvířeti plazma odebrána. Kontroly C1 až C4 (F) byly při odběru vzorku staré 14 měsíců, C5, C6 (F) i C7 a C8 (M) 15 měsíců a C9 až C16 (F) 16 měsíců. Odběr vzorků C9 až C16 proběhl téměř o rok později ve srovnání s ostatními vzorky (Tab. 3). Veškeré vzorky plazmy byly poskytnuty PharmDr. Andrejem Kováčem, PhD. z Institutu neuroimunologie Slovenské akademie věd. Zvířata byla chována ve standardních laboratorních podmínkách s volným přístupem k vodě i potravě a měla 12 hodinový cyklus světla (začínající v 7:00) s následujícím 12 hodinovým cyklem tmy. Ze srdce potkana byly odebrány vždy přibližně 4 ml krve, a to po anestezii směsí tiletaminu/zolazepamu a xylazinu. Krev byla odstředěna (10 minut, 5000 rcf, 4 °C), vzorky plazmy byly následně zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80 °C v hlubokomrazícím boxu.

Tab. 3 Počet, označení a stáří transgenních (SHR24) a kontrolních (SHR) potkanů.

	Počet F ^a	Označení F ^a	Počet M ^b	Označení M ^b	Stáří (měsíce)	Datum narození	Datum odběru
SHR24	13	T1 – T13	0	-	14	9/2015	11/2016
	2	T14, T15	2	T16, T17	15	10/2015	1/2017
SHR	4	C1 – C4	0	-	14	9/2015	11/2016
	2	C5, C6	2	C7, C8	15	10/2015	1/2017
	8	C9 – C16	0	-	16	8/2016	12/2017

^a – samička

^b – sameček

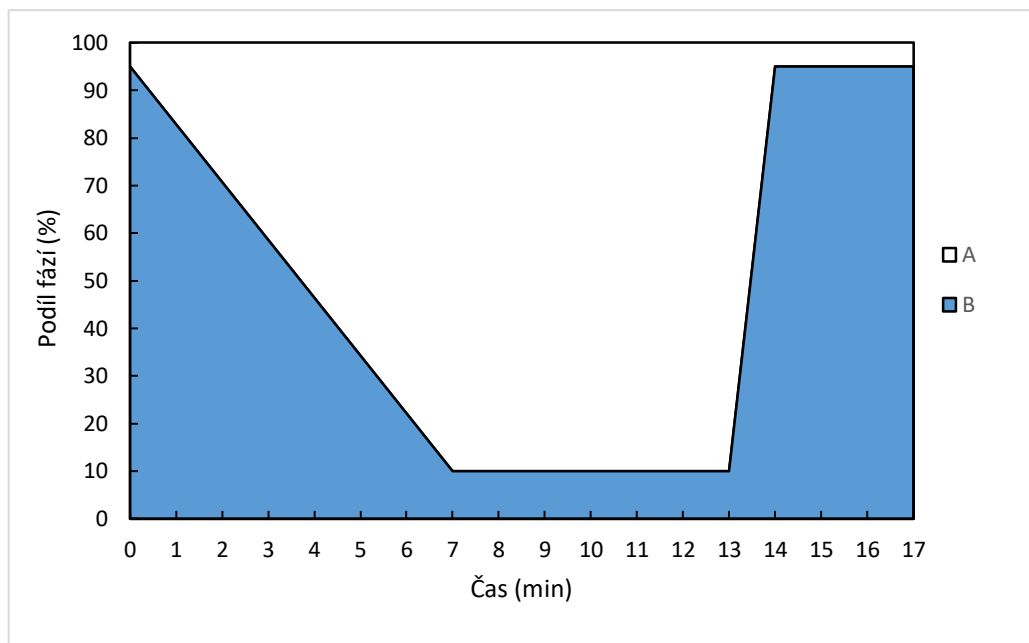
3.4 Postup cílené metabolické analýzy

3.4.1 Extrakce metabolitů

Vzorky plazmy byly rozmražovány při 4 °C cca 60 minut, následně byly krátce zvortexovány a poté bylo z každé mikrozkušavky odebráno 40 µl plazmy. Následovala precipitace plazmatických proteinů 80% methanolem temperovaným na -80 °C (v poměru 1:4 – 40 µl plazmy a 160 µl methanolu). Vzorky byly znovu protřepány na vortexu a inkubovány do následujícího dne v hlubokomrazícím boxu při -80 °C. Další den byly vzorky centrifugovány 10 min při 4 °C a 14 000 rcf. Z každého vzorku bylo odebráno 130 µl supernatantu do čisté vialky. Vzorek kontroly kvality (QC) byl připraven smícháním 6 µl supernatantu jednotlivých vzorků.

3.4.2 LC-MS/MS

Chromatografická separace byla provedena na přístroji UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) s použitím kolony Luna s aminopropyllovou stacionární fází (NH₂) (Phenomenex, CA, USA), která byla temperována na teplotu 35 °C, její délka byla 100 mm, průměr 2 mm a částice stacionární fáze měly velikost 3 µm. Nástřik vzorku/QC byl 2 µl. QC vzorek, byl měřen opakovaně za každým třetím vzorkem plazmy. Mobilní fázi A tvořil roztok octanu amonného koncentrací 20 mmol/l. Jeho příprava byla následující: do 0,5 l vody bylo přidáno 0,572 ml kyseliny octové a titrováno amoniakem na pH 9,75. Mobilní fázi B byl acetonitril. Pro eluci byl aplikován gradient o průtokové rychlosti mobilní fáze 0,3 ml/min. Průběh eluce z vodné do acetonitrilové fáze je znázorněn v Obr. 11. Chromatograf byl spojen s tandemovým hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA). Trojitý kvadrupól pracoval v režimu MRM. Iontový zdroj byl typu ESI s parametry napětí na kapiláře +5500 V a -4500 V. Tlak sušícího plynu byl 40 psi, zmlžovací plyn měl tlak rovněž 40 psi a jeho teplota byla 400 °C.



Obr. 11 Průběh gradientové eluce vysokoúčinné chromatografie u cílené metabolické analýzy. Mobilní fáze A: 20 mmol/l octan amonný o pH 9,75 (oblast nad křivkou), mobilní fáze B: acetonitril (oblast pod křivkou). Na počátku analýzy byl podíl zmíněných mobilních fází 95 % B a 5 % A, následovalo lineární snížení mobilní fáze B na hodnotu 10 % a zvýšení mobilní fáze A na 90 %. Do čtrnácté minuty analýzy byl podíl mobilních fází navrácen na počáteční stav, který zůstal neměnný až do konce analýzy.

3.4.3 Zpracování dat a statistická analýza

Naměřená data byla procesována v softwaru MultiQuant™ 3.0 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Identifikace byla provedena podle specifických m/z přechodů a RT každého analytu. Jejich relativní kvantifikace proběhla integrací ploch zaznamenaných píků. Výsledná tabulka metabolitů byla exportována ze softwaru MultiQuant do softwaru R (verze 3.1.2) ke zpracování dat a statistickému vyhodnocení. Metodou LOESS „locally weighted regression“ byla nejdříve provedena interpolace dat, sloužící k odstranění systematické chyby. Z QC vzorků byly vypočteny variační koeficienty (CV) a metabolity s CV vyššími než 30 % byly vyřazeny z dalšího statistického zpracování. Na data byla následně aplikována clr transformace (centred log ratio) a poté byla centrována na nulu. Pomocí t-testu byla vypočtena hodnota p a následovala Bonferroniho korekce. K vizualizaci dat byla provedena analýza hlavních komponent (PCA), dále byla na data aplikována diskriminační analýza pomocí ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS-DA) a rovněž byly zhotoveny boxploty neboli krabicové grafy.

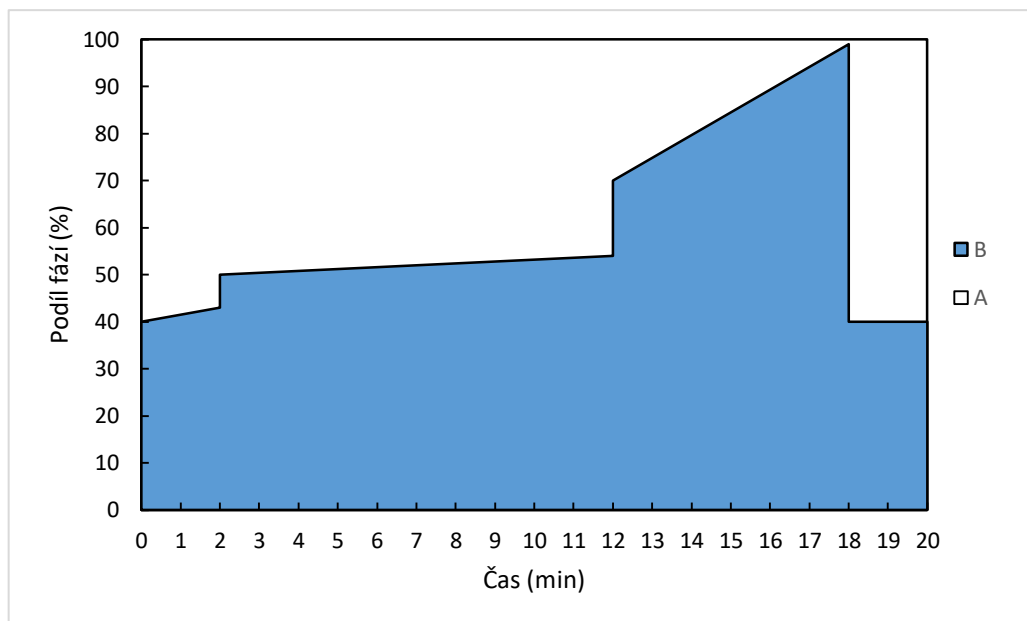
3.5 Postup necílené lipidomické analýzy

3.5.1 Extrakce lipidů

Vzorky plazmy byly rozmražovány při 4 °C cca 60 minut, následně byly krátce zvortexovány a poté bylo z každé mikrozkušavky odebráno 40 µl plazmy. Následně bylo přidáno ke každému vzorku 320 µl směsi terc-butyl(methyl)etheru a methanolu v poměru 5:1 a vzorky třepány na třepačce 60 minut při laboratorní teplotě a 240 RPM. Po přidání 80 µl LC-MS vody do každé mikrozkušavky byly vzorky znovu umístěny na třepačku na 10 minut. Následovala centrifugace (10 min při 4 °C a 14 000 rcf), poté byly vzorky lyofilizovány a inkubovány do následujícího dne v hlubokomrazícím boxu při -80 °C. Další den byl každý vzorek rozpuštěn v 50 µl směsi isopropylalkoholu, acetonitrilu a LC-MS vody v poměru 2:1:1. Poté byly vzorky protřepány na vortexu a přepipetovány do vialek. QC byl připraven smícháním 12 µl extraktu z jednotlivých vzorků.

3.5.2 Orbitrap LC-MS

Vzorky byly analyzovány pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) s použitím kolony BEH C18 (Waters, Milford, MA, USA), která byla temperována na teplotu 55 °C. Kolona měla částice stacionární fáze o velikosti 1,7 µm, délku 100 mm a průměr 2,1 mm. Objem jednoho nástřiku vzorku byl 2 µl a stejně tak nástřiku QC, který byl měřen opakovaně za každým třetím vzorkem. Mobilní fázi A tvořila směs acetonitrilu a vody v poměru 6:4 s přídávkem 10 mM mravenčanu amonného (377,2 µl kyseliny mravenčí a 188,6 µl amoniaku). Mobilní fází B byla směs isopropanolu a acetonitrilu v poměru 9:1, rovněž s přídávkem 10 mM mravenčanu amonného. Pro eluci byl aplikován gradient o průtokové rychlosti mobilní fáze 0,4 ml/min. Průběh eluce mobilních fází je znázorněn v Obr. 12. Chromatograf byl spojen s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA). Měření probíhalo v pozitivním módu, skenovací rozsah byl 100 – 1600 *m/z* a rozlišení 120 000 FWHM. Iontový zdroj (typu ESI) byl nastaven na tyto parametry: teplota zdrojové kapiláry 350 °C, teplota sprejovací kapiláry 300 °C, průtok „sheath“ plynu 40 AU, průtok pomocného plynu 15 AU a zdrojové napětí na kapiláře 3 kV.

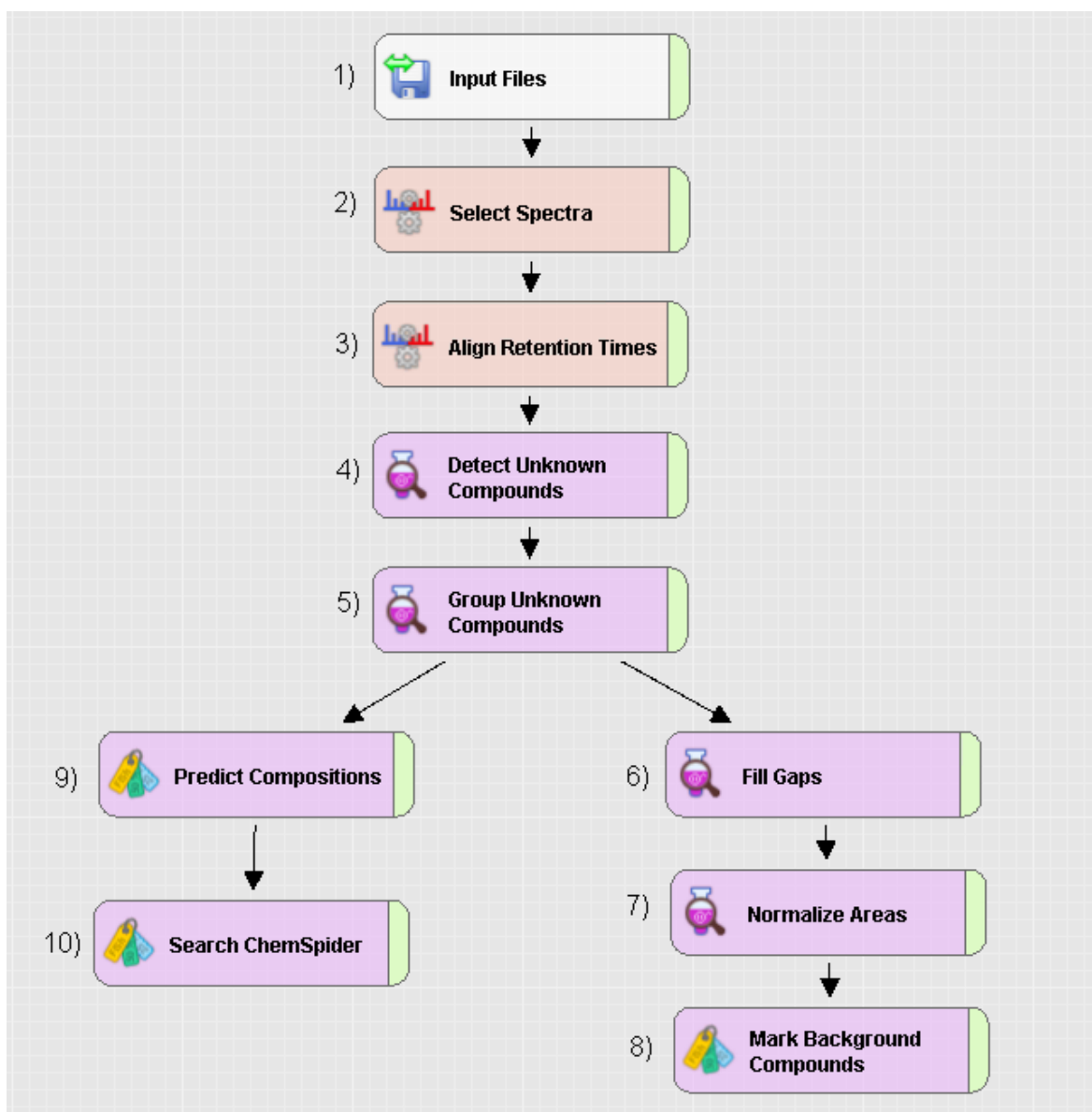


Obr. 12 Průběh gradientové eluce vysokoúčinné chromatografie u necílené lipidomické analýzy. Mobilní fáze A: směs acetonitrilu a vody v poměru 6:4 s přidavkem 10 mM mravenčanu amonného (oblast nad křivkou), mobilní fáze B: směs isopropanolu a acetonitrilu v poměru 9:1, rovněž s přidavkem 10 mM mravenčanu amonného (oblast pod křivkou). Na počátku analýzy byl podíl mobilních fází 40 % B a 60 % A, následovalo zvyšování fáze B až na hodnotu 100 % a zároveň snížení mobilní fáze A na 0 %. V osmnácté minutě analýzy byl poměr fází prudce navrácen na počáteční stav, který zůstal neměnný až do konce analýzy.

3.5.3 Zpracování dat a statistická analýza

Naměřená data byla procesována v softwaru Compound Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Schéma procesovacího postupu (workflow) je znázorněno v Obr. 13. Po načtení dat do softwaru byla vybrána hmotnostní spektra, byly srovnány RT mezi jednotlivými analýzami (s maximálním posunem RT 0,5 min). Následovala detekce neznámých sloučenin o minimální hodnotě intenzity iontů 1000, hmotnostní toleranci 10 ppm a 30% tolerancí intenzit izotopů. Mezi povolenými aduktovými ionty v analýze byly ionty $[2M+ACN+H]^+$, $[2M+ACN+Na]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+K]^+$, $[2M+Na]^+$, $[2M+NH_4]^+$, $[M+ACN+H]^+$, $[M+ACN+Na]^+$, $[M+H]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$ a $[M+NH_4]^+$. V dalším kroku procesu byly sloučeny adukty patřící jedné neznámé sloučenině (hmotnostní tolerance 10 ppm, RT tolerance 0,5 min). Následně byly vyplněny mezery nulovou hodnotou – pokud nebyla sloučenina v určitém vzorku detekována (a v jiné analýze ano), byly integrovány také píky pod nastavenými limity. Dále byly normalizovány plochy píků na základě QC vzorků (lineární regresní model, s 30% minimální QC coverage a maximální 50% QC area RSD – relativní standardní odchylka). Poté byly označeny sloučeniny obsažené v pozadí vzorků (blank). Zároveň bylo predikováno

složení sloučenin (s hmotnostní tolerancí 10 ppm a 30% tolerancí intenzit izotopů). Na závěr byla softwarem využita databáze ChemSpider, která poskytuje informace o chemické struktuře sloučeniny. Výsledná tabulka sloučenin byla exportována ze softwaru Compound Discoverer do softwaru RStudio (verze 1.0.143) ke statistickému zpracování. Postup statistického zpracování je shodný s postupem u cílené metabolické analýzy.



Obr. 13 Schéma pracovního postupu v softwaru Compound Discoverer: 1) načtení dat, 2) výběr hmotnostních spekter, 3) srovnání retenčních časů mezi jednotlivými analýzami, 4) detekce neznámých sloučenin, 5) sloučení aduktů patřící jedné neznámé sloučenině (hmotnostní tolerance 10 ppm, RT tolerance 0,5 min), 6) doplnění nulových hodnot – integrace píků pod nastavenými limity, není-li sloučenina v určitém vzorku detekována, 7) normalizace ploch píků, 8) označení sloučenin z pozadí (blanku), 9) predikce složení, 10) prohledání databáze ChemSpider.

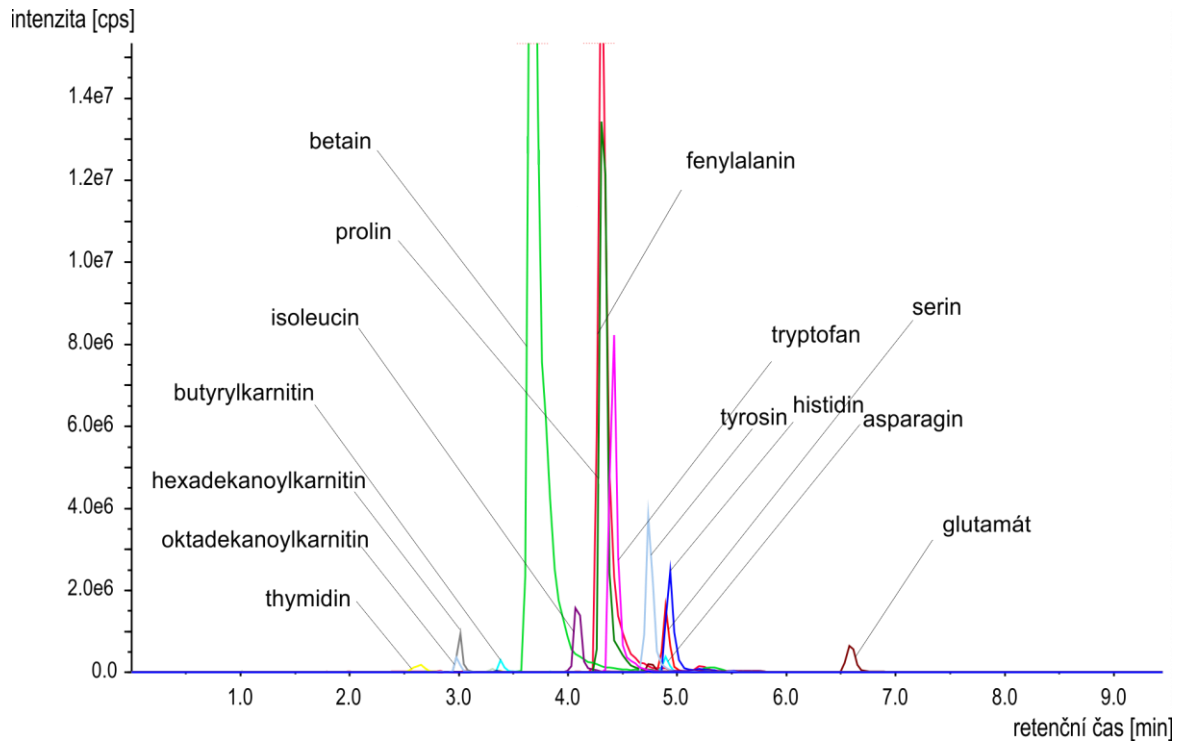
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce bylo provedení cílené a necílené metabolomické analýzy krevní plazmy transgenních potkanů s tauopatií a kontrol, s následným vyhodnocením naměřených dat. K cílenému metabolomickému přístupu byla využita technika HPLC ve spojení s MS/MS, k necílenému přístupu technika HPLC ve spojení s Orbitrap MS. Bylo analyzováno sedmnáct transgenních a šestnáct kontrolních vzorků krevní plazmy.

V rámci statistického vyhodnocení byla použita metoda PCA, která spočívá v transformaci dat. Lineární kombinací původních proměnných jsou získány hlavní komponenty znázorňující variabilitu (proměnlivost) původního souboru (Meloun a kol., 2002). Metoda je důležitá při určování obecného chování vzorků bez znalosti příslušnosti vzorků ke skupině (Karlíková a kol., 2017). Boxplot umožňuje vizualizaci dolního kvartilu, mediánu, horního kvartilu a případně odlehlých hodnot datového souboru (Spitzer a kol., 2014).

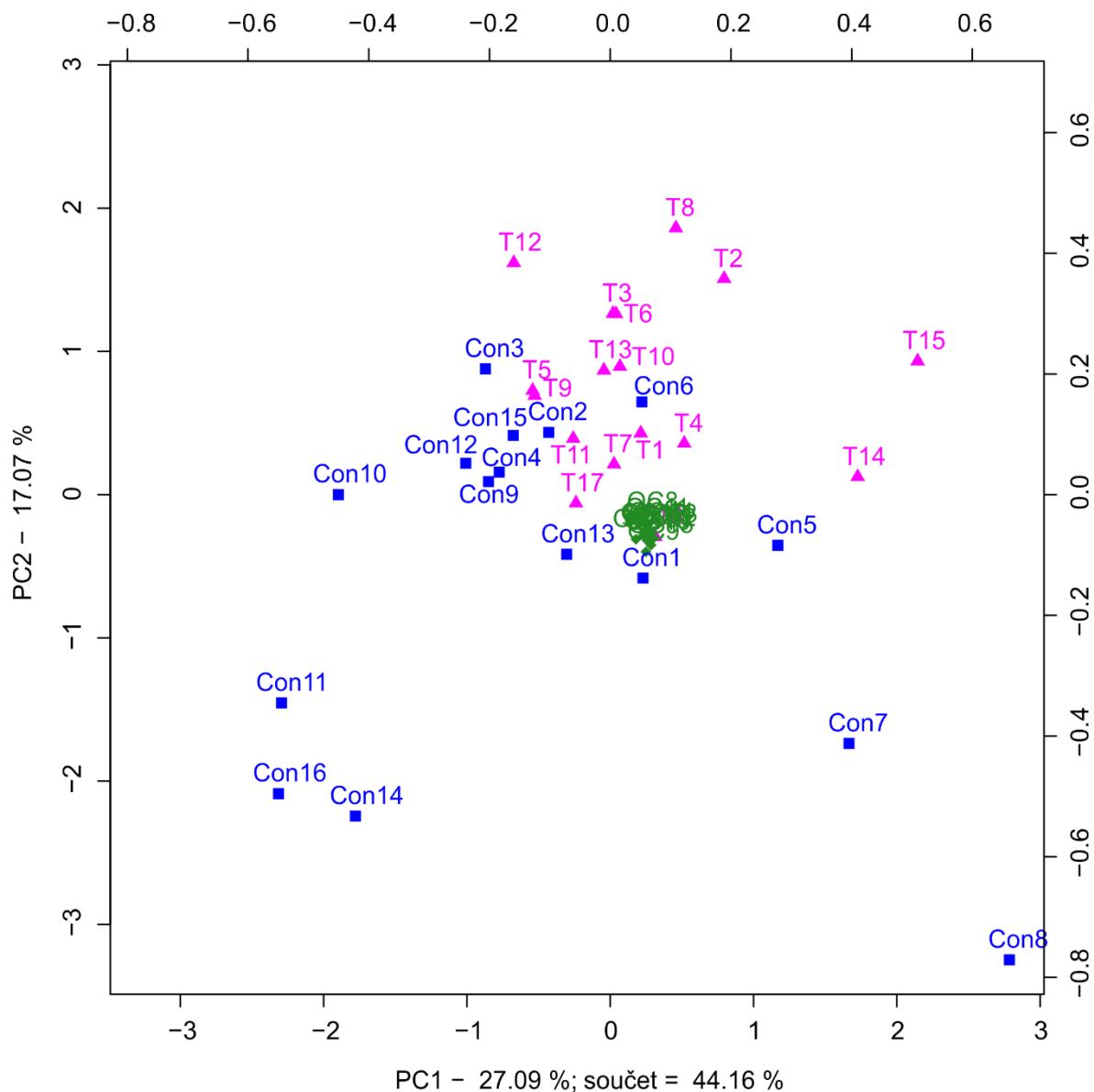
4.1 Cílená metabolická analýza

Pomocí cílené metabolické analýzy bylo identifikováno celkem 136 metabolitů. Na Obr. 14 je zobrazen eluční profil vybraných acylkarnitinů, aminokyselin a jejich derivátů ve vzorku transgenního potkana s tauopatií. Vysoká intenzita je patrná u betainu, fenylalaninu, prolinu a tryptofanu.



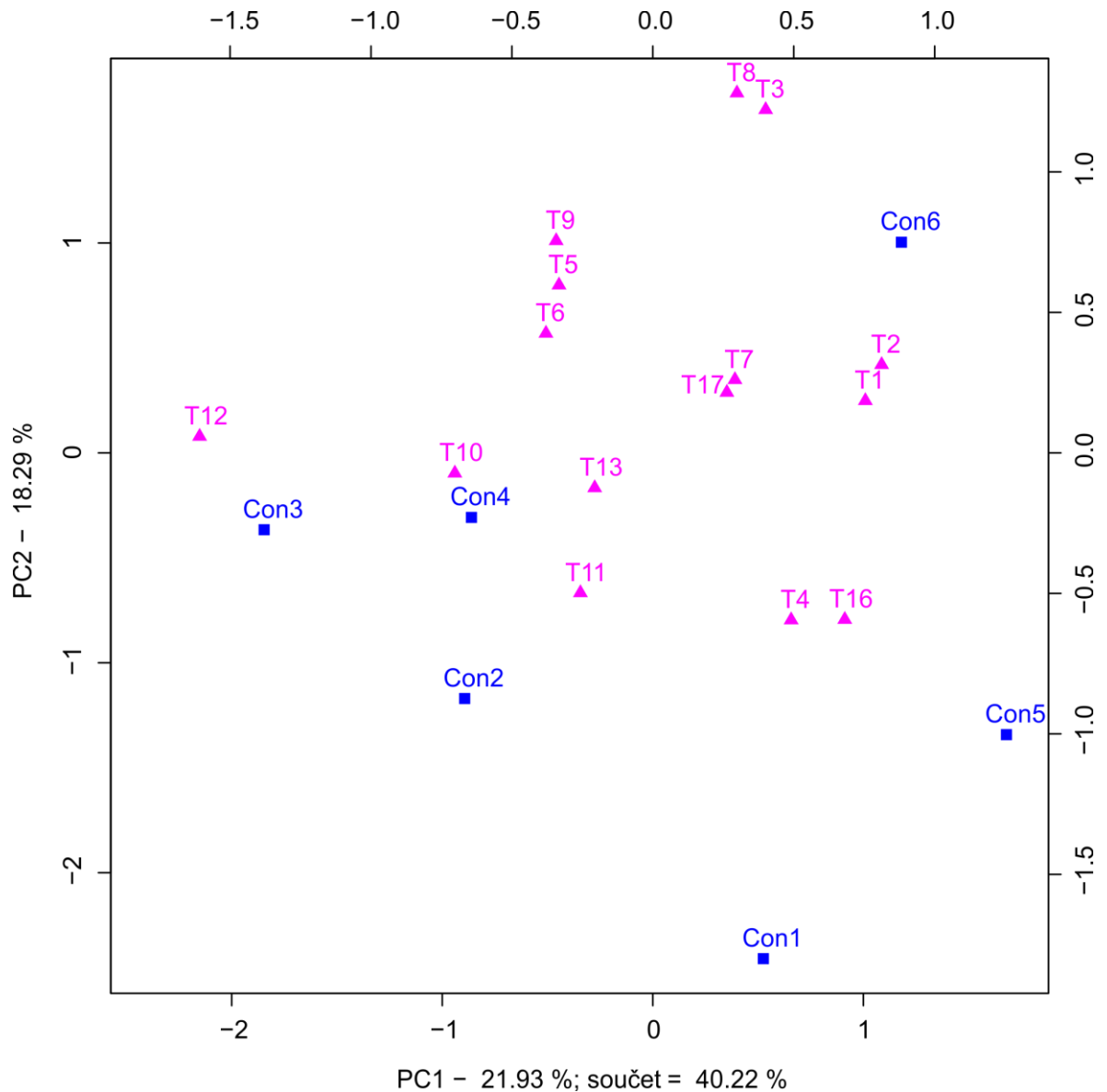
Obr. 14 Chromatogram z cílené analýzy vzorku plazmy transgenního potkana

V rámci statistického vyhodnocení byla provedena PCA (Obr. 15). Od hlavní skupiny vzorků se oddělují vzorky C7 a C8 – samečci, kteří mají odlišný metabolismus než samičky. Tuto skutečnost prokázal například Nakatomi a kol. (1979) ve studii zabývající se měřením cerebrálního laktátu, pyruvátu a ATP u samců a samic kmene SHR. Oddělují se rovněž vzorky C10, C11, C14 a C16, které pocházejí z kontrolních potkanů, od nichž byla krevní plazma odebrána téměř o rok později než od ostatních zvířat (Tab. 3). Vzorky byly uchovávány v mrazicím boxu kratší dobu a zároveň stáří zvířat při odběru plazmy bylo nejvyšší v porovnání s ostatními. Preanalytické vlivy jako odběr, transport a uchování vzorků významně působí na výsledky analýzy (Yin a kol., 2015). Ishikawa a kol. (2014) zjistili při studiu plazmatických lipidových profilů mužů a žen různého věku, že rozdílné pohlaví i věk jsou důležitým faktorem v metabolomických studiích.



Obr. 15 PCA aplikovaná na data získaná ze všech 33 vzorků krevní plazmy u cílené metabolické analýzy. Růžové trojúhelníky znázorňují vzorky transgenických potkanů, modré čtverce vzorky kontrolních potkanů a zelené kosočtverce představují vzorky kontroly kvality. Součet hodnot pod osami grafu (44,16 %) udává procento vysvětlené variability souboru.

Vzorky nových kontrol (C9 až C16) a samečeků (C7, C8, T14 a T15) byly odstraněny ze statistického vyhodnocení, jelikož rozdělení vzorků způsobené preanalytickými vlivy či rozdílným pohlavím nejsou předmětem zájmu. Rozdělení zbývajících vzorků transgenních potkanů vůči kontrolám metodou PCA při cílené metabolické analýze je patrné na Obr. 16.



Obr. 16 PCA aplikovaná na data po odstranění skupiny samečeků a nových kontrol ze statistického zpracování u cílené metabolické analýzy. Růžové trojúhelníky znázorňují vzorky transgenních potkanů a modré čtverce vzorky kontrolních potkanů. Součet hodnot pod osami grafu (40,22 %) udává procento vysvětlené variability souboru.

Na data byla aplikována metoda OPLS-DA (k určení nejvíce rozdílných metabolitů) pro zjištění kovariance a korelace. Podle absolutní hodnoty korelace je v Tab. 4. sestupně seřazeno deset metabolitů nejvíce diskriminující transgenní a kontrolní vzorky, mezi které patří methionin, kreatinin, hydroxyoktadecenoylkarnitin, 2-hydroxyisobutyryát, 3-methylhistidin/N-methylhistidin, dodekanoylkarnitin, oktadekanoylkarnitin, hydroxytetradecenoylkarnitin, fenylalanin a tetradekanoylkarnitin. Čtyři výše uvedené metabolity: kreatinin, 3-methylhistidin/N-methylhistidin, dodekanoylkarnitin a hydroxytetradecenoylkarnitin byly rovněž nalezeny mezi deseti nejvíce diskriminujícími metabolity ve studii Karlíková a kol. (2017), kde byla zkoumána plazma transgenních potkanů kmene SHR72. Karnitin má zásadní význam pro beta-oxidaci mastných kyselin, což je jedna ze základních metabolických drah. Přenáší aktivované mastné kyseliny přes vnitřní mitochondriální membránu do mitochondrie. Uvedený proces je využíván pro mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, ze kterých vznikají deriváty karnitinu – acylkarnitiny (estery karnitinu). V těchto formách jsou rovněž z buňky odstraňovány akumulované acyl-CoA pro následné vyloučení ledvinami (Cibulka, 2005).

Tab. 4 Přehled 10 metabolitů nejvíce diskriminující skupiny transgenních a kontrolních potkanů po odstranění vzorků samečků a nových kontrol ze statistického zpracování u cílené metabolické analýzy.

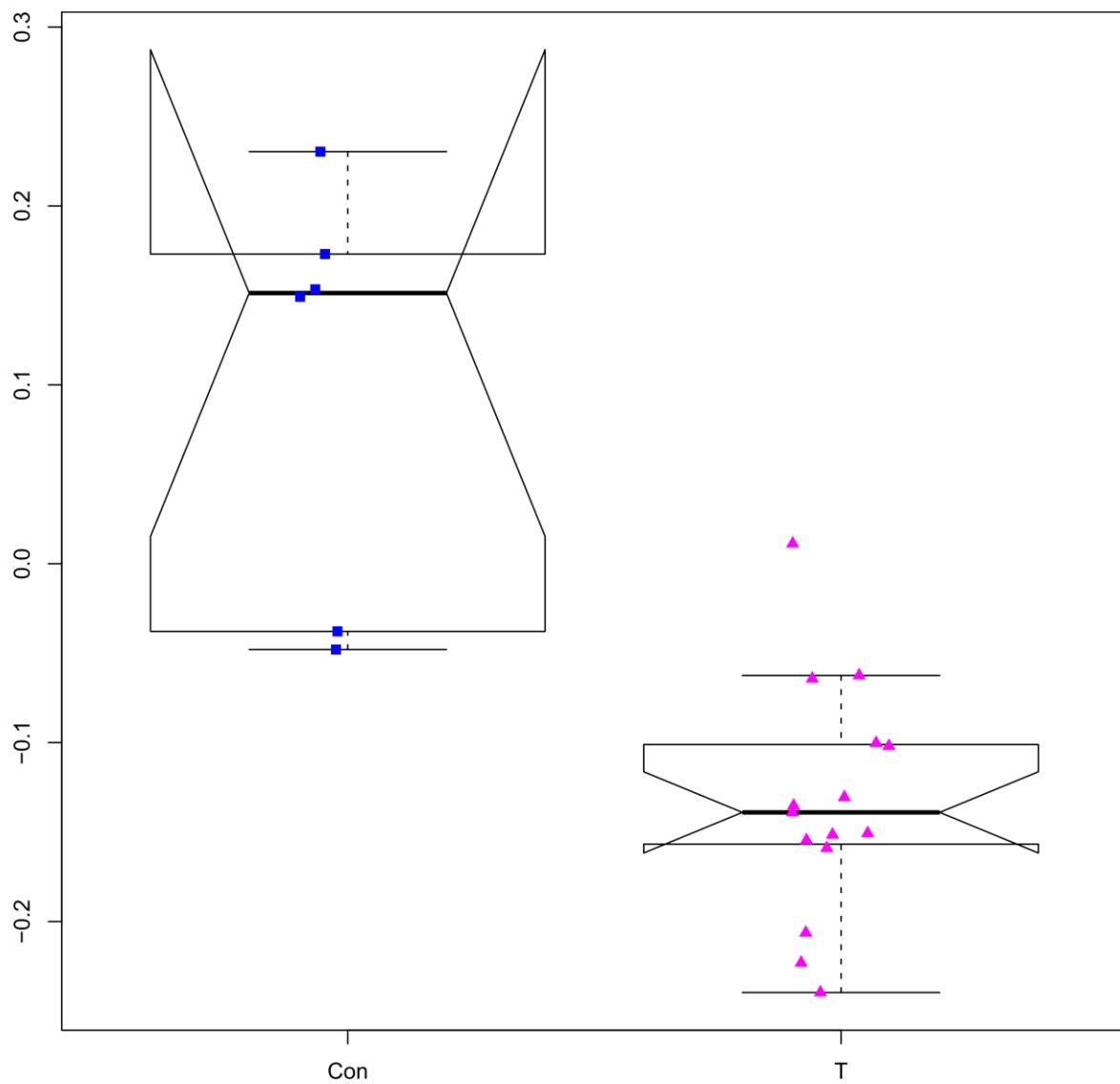
Metabolit	p1 ^a	pcorr1 ^b
methionin	0,628189	0,798587
kreatinin	1,006505	0,78751
hydroxyoktadecenoylkarnitin	-1,05378	-0,75835
2-hydroxyisobutyrát	-0,71094	-0,7483
3-methylhistidin/N-methylhistidin	0,692803	0,702286
dodekanoylkarnitin	-0,68478	-0,68659
oktadekanoylkarnitin	-0,66303	-0,68157
hydroxytetradecenoylkarnitin	-0,81563	-0,68101
fenylalanin	0,548591	0,669236
tetradekanoylkarnitin	-0,71332	-0,66453

^a Kovariance (příspěvek velikosti výsledků modelových komponent) reprezentovaná osou x

^b Korelace (spolehlivost výsledků modelových komponent) je reprezentována osou y

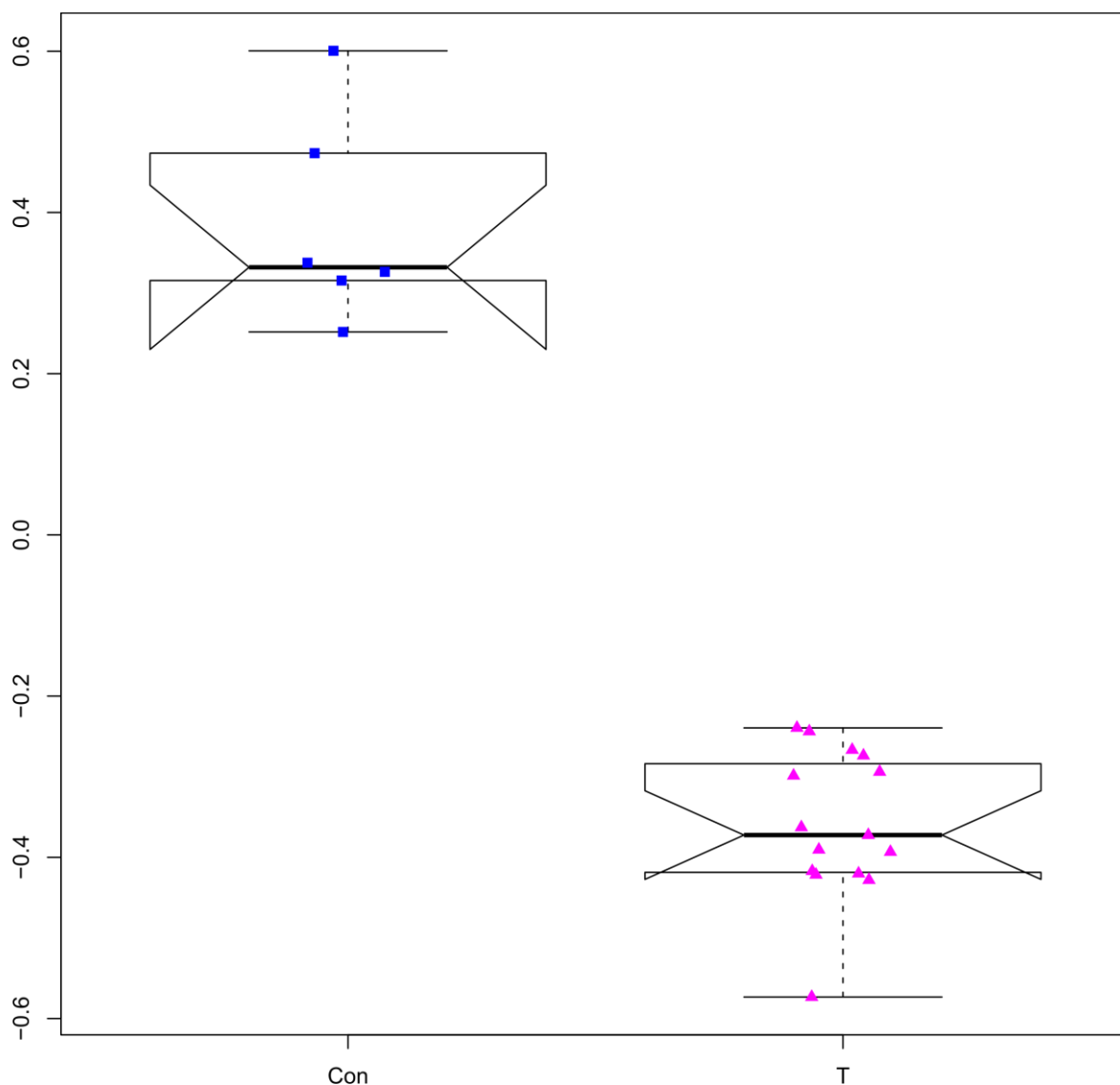
Pro ukázkou distribuce naměřených dat byly vybrány boxploty prvních dvou metabolitů, které byly nejvíce diskriminující v OPLS-DA analýze.

Prvním z metabolitů je methionin (Obr. 17), což je esenciální proteinogenní aminokyselina, která se získává ze stravy. Má velký význam v řadě buněčných funkcí, například metabolit vznikající z methioninu – glutathion je důležitý pro ochranu buňky proti oxidačnímu poškození. Methionin se může také měnit na S-adenosylmethionin (SAM) pomocí L-methionin-S-adenosyltransferasy. SAM je donorem methylové skupiny při methylaci fosfolipidů, proteinů a DNA, což jsou reakce ovlivňující kupříkladu regulaci genů (histonová methylace) či axonální transport (methylace mikrotubulů). Změny v methylaci substrátu histonů a buněčné DNA přispívají k rozvoji chronické neurodegenerace. Rovněž snížení plazmatických hladin methioninu nebo jeho metabolitů může přispívat k patologickému poškození mozku (Dash a kol., 2016).



Obr. 17 Boxplot metabolitu methioninu u cílené metabolické analýzy. Růžové trojúhelníky znázorňují vzorky transgenických potkanů a modré čtverce vzorky kontrolních potkanů.

Druhou látkou diskriminující analyzované transgené a kontrolní vzorky je kreatinin (Obr. 18). Kreatinin vzniká nevratnou konverzí kreatinu a kreatinfosfátu. Zvýšená koncentrace kreatinu v plazmě nebo moči (a snížené vylučování kreatininu) bylo zaznamenáno u některých neurosvalových poruch a u živočichů s nedostatkem vitamínu E (Spencer, 1986). Snížená hladina tohoto vitamínu byla zaznamenána v plazmě pacientů s AD (Zaman a kol., 1992). Tyto nálezy korespondují s hladinou kreatininu, která byla pozorována u transgených potkanů s tauopatií SHR72 (Karlíková a kol., 2017).

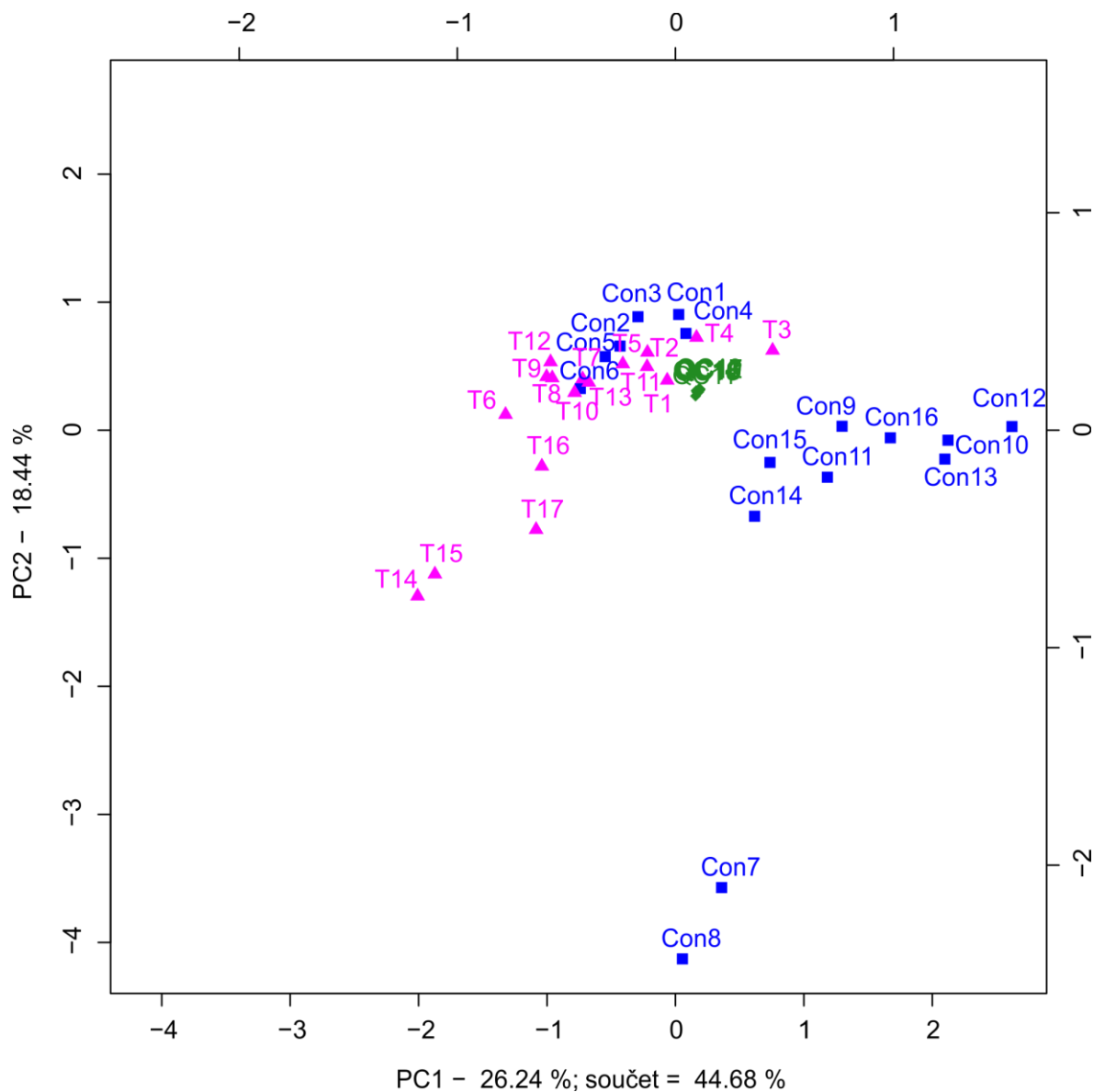


Obr. 18 Boxplot metabolitu kreatininu u cílené metabolické analýzy. Růžové trojúhelníky znázorňují vzorky transgených potkanů a modré čtverce vzorky kontrolních potkanů.

4.2 Necílená lipidomická analýza

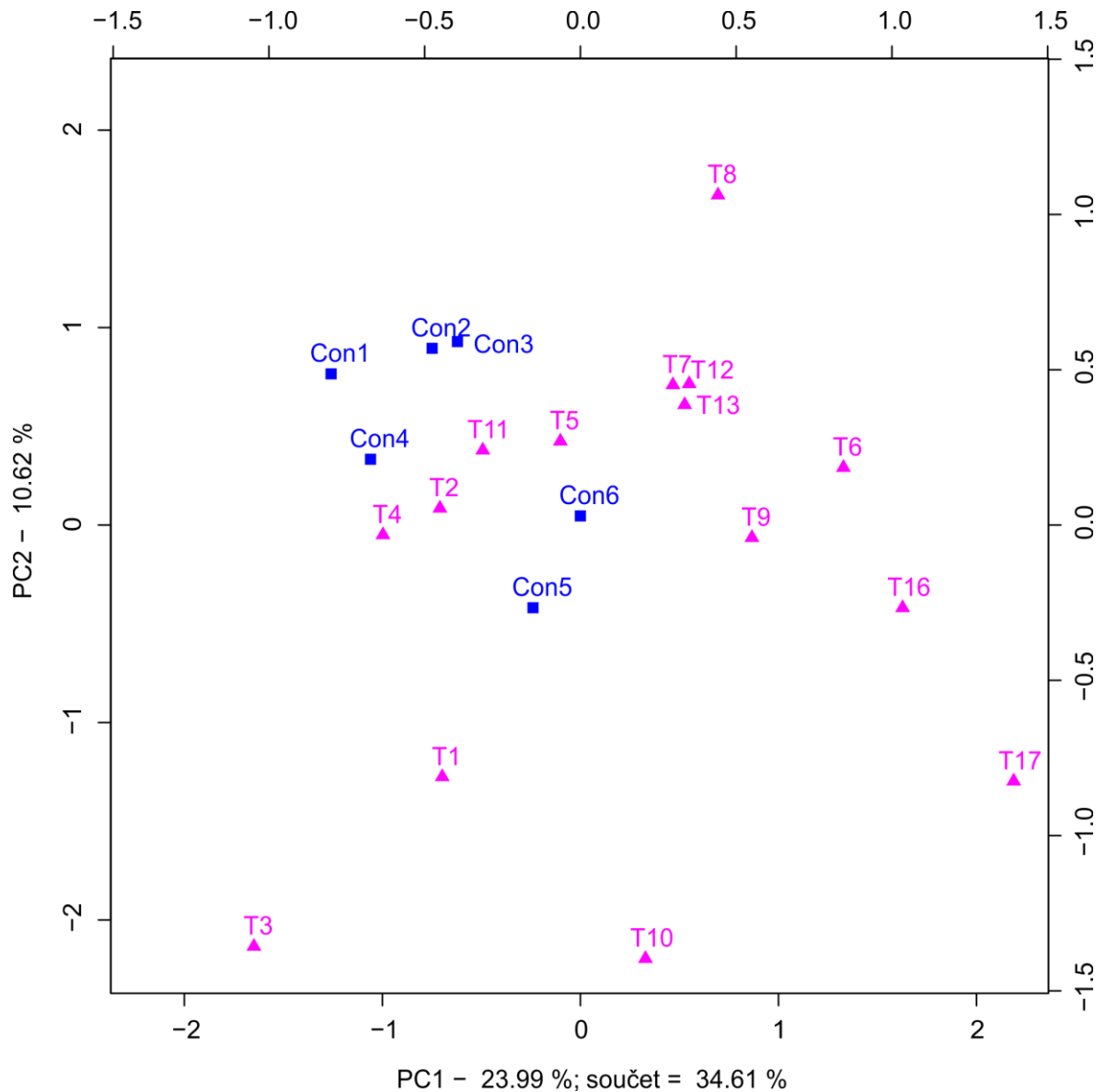
Pomocí necílené metabolické analýzy bylo detekováno celkem 1507 neznámých, potencionálních metabolitů. Závislost sumy intenzit iontových proudů všech m/z ve spektru na čase zobrazuje TIC chromatogram (Příloha A).

V rámci statistického vyhodnocení byla provedena PCA (Obr. 19). Od hlavní skupiny vzorků se oddělují vzorky C7, C8, T14 a T15, což jsou kontrolní a transgenní samečci, kteří mají odlišný metabolický profil než samičky. Dále se odděluje skupina vzorků C9 až C16, tedy vzorky kontrolních potkanů, od nichž byla krevní plazma odebrána téměř o rok později než od ostatních zvířat (Tab. 3). Možné vysvětlení pro toto pozorování již bylo zmíněno u cílené metabolické analýzy.



Obr. 19 PCA aplikovaná na data získaná ze všech 33 vzorků krevní plazmy u necílené lipidomické analýzy. Růžové trojúhelníky znázorňují vzorky transgenních potkanů, modré čtverce vzorky kontrolních potkanů a zelené kosočtverce představují vzorky kontroly kvality. Součet hodnot pod osami grafu (44,68 %) udává procento vysvětlené variability souboru.

Vzorky nových kontrol (C9 až C16) a sameček (C7, C8, T14 a T15) byly odstraněny ze statistického vyhodnocení, jelikož výše uvedené rozdělení vzorků, způsobené preanalytickými vlivy či rozdílným pohlavím nejsou předmětem zájmu. Rozdělení zbývajících vzorků transgenních potkanů vůči kontrolám metodou PCA při necílené lipidomické analýze je patrné na Obr. 20.



Obr. 20 PCA aplikovaná na data po odstranění skupiny sameček a nových kontrol ze statistického zpracování u necílené lipidomické analýzy. Růžové trojúhelníky znázorňují vzorky transgenních potkanů a modré čtverce vzorky kontrolních potkanů. Součet hodnot pod osami grafu (34,61 %) udává procento vysvětlené variability souboru.

Na data byla aplikována OPLS-DA (k určení nejvíce rozdílných metabolitů) a následně byla zjištěna kovariance a korelace. Tyto hodnoty jsou uvedeny spolu s jejich absolutními hodnotami v Tab. 5. Podle absolutní hodnoty korelace je sestupně seřazeno deset metabolitů nejvíce diskriminující transgenní a kontrolní vzorky.

Tab. 5 Přehled 10 neznámých metabolitů, které nejvíce diskriminují skupiny transgenních a kontrolních potkanů po odstranění vzorků sameček a nových kontrol ze statistického zpracování u necílené lipidomické analýzy.

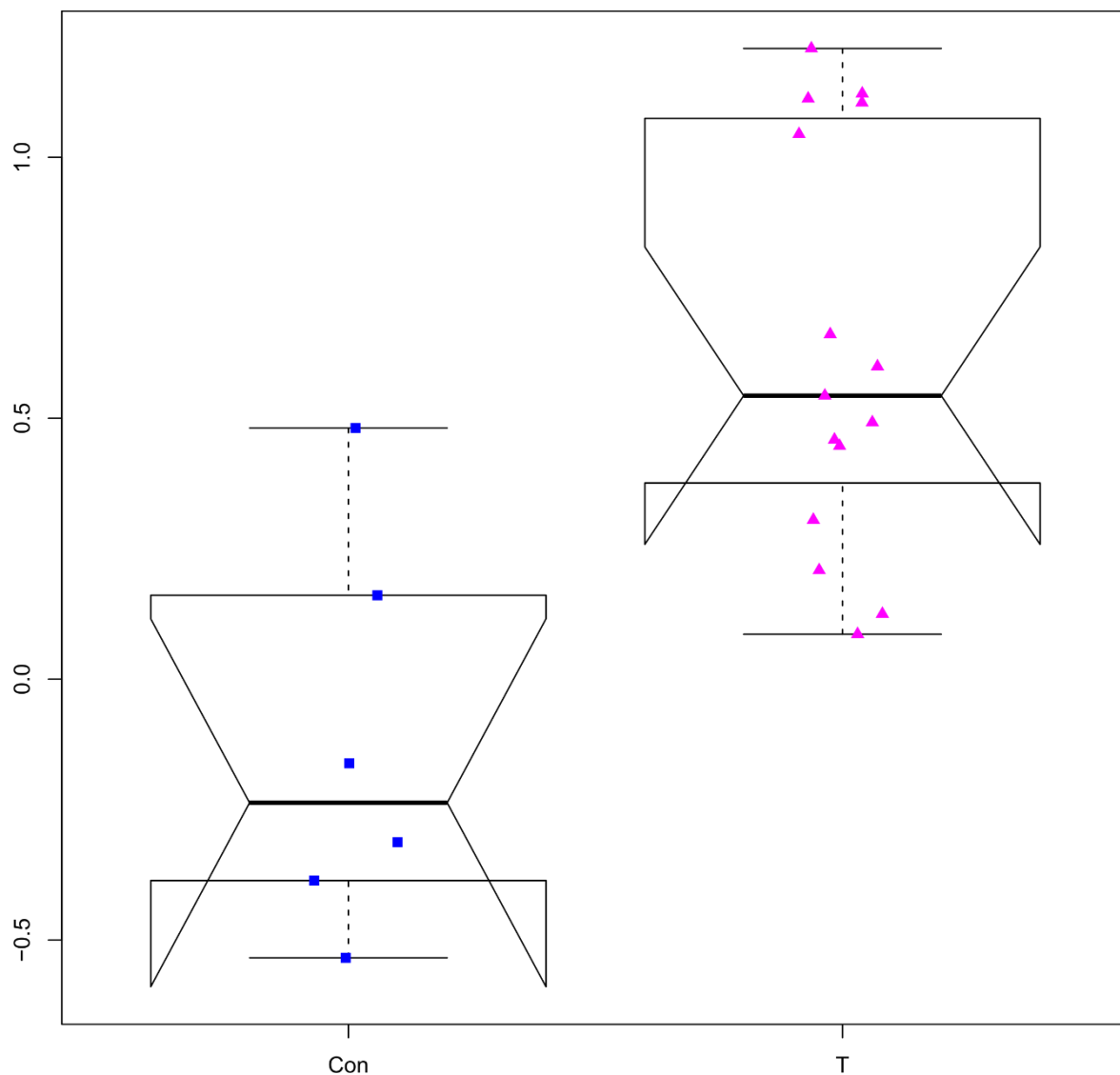
m/z^a	$p1^b$	$pcorr1^c$
992,71848	-6,10354	-0,92803
1250,17733	-4,98883	-0,91222
1589,14385	7,374877	0,90219
369,35203	-4,50855	-0,90008
870,03537	-4,63491	-0,8979
997,72544	-5,39094	-0,89391
784,53952	7,212744	0,880067
104,10737	-5,7653	-0,8711
267,65144	-5,09269	-0,86934
1587,64127	5,901132	0,86612

^a Přesná hmotnost neznámé látky

^b Kovariance (příspěvek velikosti výsledků modelových komponent) reprezentovaná osou x

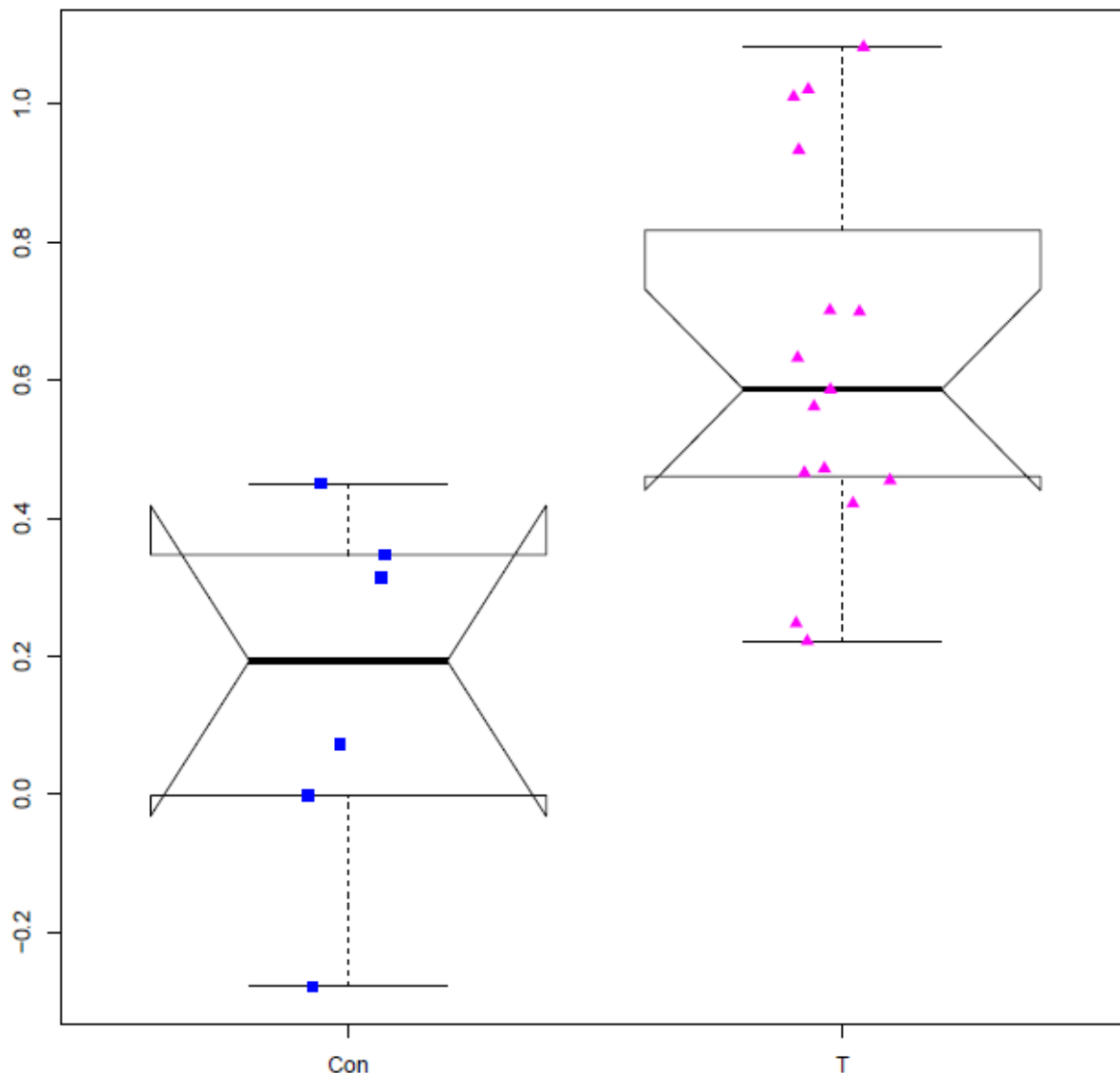
^c Korelace (spolehlivost výsledků modelových komponent) je reprezentována osou y

Pro ukázkou distribuce dat byly vybrány boxploty prvních dvou potenciálních metabolitů, které nejvíce odlišují vzorky plazmy transgenních a kontrolních potkanů při necílené lipidomické analýze. Distribuce prvního neznámého metabolitu s hmotou m/z 992,71848 u analyzovaných vzorků je znázorněna na Obr. 21.



Obr. 21 Neznámý metabolit s poměrem m/z rovným 992,71848 detekovaný metodou necílené lipidomické analýzy. Růžové trojúhelníky znázorňují vzorky transgenních potkanů a modré čtverce vzorky kontrolních potkanů.

Distribuce dalšího neznámého metabolitu s hmotou m/z 1250,17733 u analyzovaných vzorků je znázorněna na Obr. 22.



Obr. 22 Neznámý metabolit s poměrem m/z rovným 1250,17733 detekovaný metodou necílené lipidomické analýzy. Růžové trojúhelníky znázorňují vzorky transgenických potkanů a modré čtverce vzorky kontrolních potkanů.

Identifikace metabolitů detekovaných metodou necílené lipidomické analýzy bude provedena v budoucnu a není součástí této bakalářské práce. Proběhne na základě fragmentace jednotlivých analytů.

5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byly charakterizovány tauopatie a spojitost těchto onemocnění s hyperfosforylovaným tau proteinem. Pozornost byla věnována rovněž Alzheimerově chorobě, což je nejčastější forma tauopatie. Dále byly shrnuty základní poznatky o metabolomice a použitých separačních a analytických metodách. V experimentální části byla provedena analýza krevní plazmy kontrolních potkanů SHR a plazmy transgenních potkanů SHR24. Analýza proběhla metodou cílené metabolické analýzy, kdy byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Další použitou metodou byla necílená lipidomická analýza pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním analyzátozem Orbitrap. Cílenou metabolickou analýzou bylo v krevní plazmě potkanů identifikováno 136 metabolitů. Po statistickém zpracování a aplikaci metody hlavních komponent se oddělovali samečci a vzorky kontrolních potkanů u nichž byla plazma odebrána později. Toto rozdělení nebylo žádoucí, proto byly tyto skupiny odebrány z dalšího vyhodnocování. Mezi nejvýznamnějšími metabolity oddělujícími jednotlivé skupiny podle OPLS-DA byly především aminokyseliny a acylkarnitiny. Metabolitem nejvíce diskriminujícím skupinu transgenních a kontrolních potkanů byl methionin. Necílenou lipidomickou analýzou bylo detekováno celkem 1507 potencionálních, neznámých metabolitů. Po statistickém zpracování a aplikaci metody hlavních komponent došlo k oddělení stejných skupin vzorků podobně jako u cílené metabolické analýzy. Látka nejvíce diskriminující skupinu transgenních a kontrolních potkanů měla poměr m/z rovný 992,71848. Identifikace metabolitů detekovaných metodou necílené lipidomické analýzy bude provedena v budoucnu a není součástí této bakalářské práce.

POUŽITÁ LITERATURA

- Amaro, A., Petretto, A., Angelini, G., & Pfeffer, U. (2016). Chapter 4 - Advancements in Omics Sciences. In A. Shahzad (Ed.), *Translational Medicine* (s. 67–108). Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803460-6.00004-0>
- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*, 126, 238–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Avila J. (2008). Tau kinases and phosphatases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(1), 258–259. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00214.x>
- Bajad, S., & Shulaev, V. (2007). Highly-parallel metabolomics approaches using LC-MS2 for pharmaceutical and environmental analysis. *Trends in analytical chemistry: TRAC*, 26(6), 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.009>
- Buée, L., Bussièrre, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders¹¹These authors contributed equally to this work. *Brain Research Reviews*, 33(1), 95–130. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00019-9)
- Cibulka, R. (2005). Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně. *Klinická biochemie a metabolismus*: 13 (34), 24–28.
- Cielecka-Piontek, J., Zalewski, P., Jelińska, A., & Garbacki, P. (2013). UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 76(21–22), 1429–1437. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2434-6>
- Coakeley, S., & Strafella, A. P. (2017). Imaging tau pathology in Parkinsonisms. *Npj Parkinson's Disease*, 3(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41531-017-0023-3>
- Czech, C., Berndt, P., Busch, K., Schmitz, O., Wiemer, J., Most, V., ... Senn, H. (2012). Metabolite Profiling of Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. *PLOS ONE*, 7(2), e31501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031501>
- Dash, P. K., Hergenroeder, G. W., Jeter, C. B., Choi, H. A., Kobori, N., & Moore, A. N. (2016). Traumatic Brain Injury Alters Methionine Metabolism: Implications for Pathophysiology. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fnsys.2016.00036>

- Dehmelt, L., & Halpain, S. (2004). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 6, 204. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-6-1-204>
- Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., ... Andrieux, A. (2015). Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nature Communications*, 6, 7246. <https://doi.org/10.1038/ncomms8246>
- Desai, A., & Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, 83–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83>
- Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M., & Kozubski, W. (2016). Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 13(9), 952–963.
- Dunn, W. B., & Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(4), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>
- Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*: 20(41), 152–157.
- Grebe, S. K., & Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here? *The Clinical Biochemist Reviews*, 32(1), 5–31.
- Halpain, S., & Dehmelt, L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology*, 7(6), 224. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-6-224>
- Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., ... Tai, H. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 24(1), 3–12.
- Hollywood, K., Brison, D. R., & Goodacre, R. (2006). Metabolomics: Current technologies and future trends. *PROTEOMICS*, 6(17), 4716–4723. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600106>
- Chapin, S. J., & Bulinski, J. C. (1992). Microtubule stabilization by assembly-promoting microtubule-associated proteins: A repeat performance. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 23(4), 236–243. <https://doi.org/10.1002/cm.970230403>

- Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2008). Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(1), 38–55. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00225.x>
- Irwin, D. J. (2016). Tauopathies as clinicopathological entities. *Parkinsonism & Related Disorders*, 22 Suppl 1, S29-33. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.020>
- Ishikawa, M., Maekawa, K., Saito, K., Senoo, Y., Urata, M., Murayama, M., ... Saito, Y. (2014). Plasma and Serum Lipidomics of Healthy White Adults Shows Characteristic Profiles by Subjects' Gender and Age. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091806>
- Jandera, P. (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>
- Josephs, K. A. (2015). Chapter 53 - Tauopathies: Classification, Clinical Features, and Genetics. In M. S. LeDoux (Ed.), *Movement Disorders (Second Edition)* (s. 815–828). Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405195-9.00053-6>
- Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B. S., & Weinshilboum, R. M. (2008). Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48(1), 653–683. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715>
- Karlíková, R., Mičová, K., Najdekr, L., Gardlo, A., Adam, T., Majerová, P., ... Kováč, A. (2017). Metabolic status of CSF distinguishes rats with tauopathy from controls. *Alzheimer's Research & Therapy*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0303-5>
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., & Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 731526. <https://doi.org/10.1155/2012/731526>
- Kopeikina, K. J., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2012). Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease. *Translational neuroscience*, 3(3), 223–233. <https://doi.org/10.2478/s13380-012-0032-y>
- Kosik, K. S. (1993). The Molecular and Cellular Biology of Tau. *Brain Pathology*,

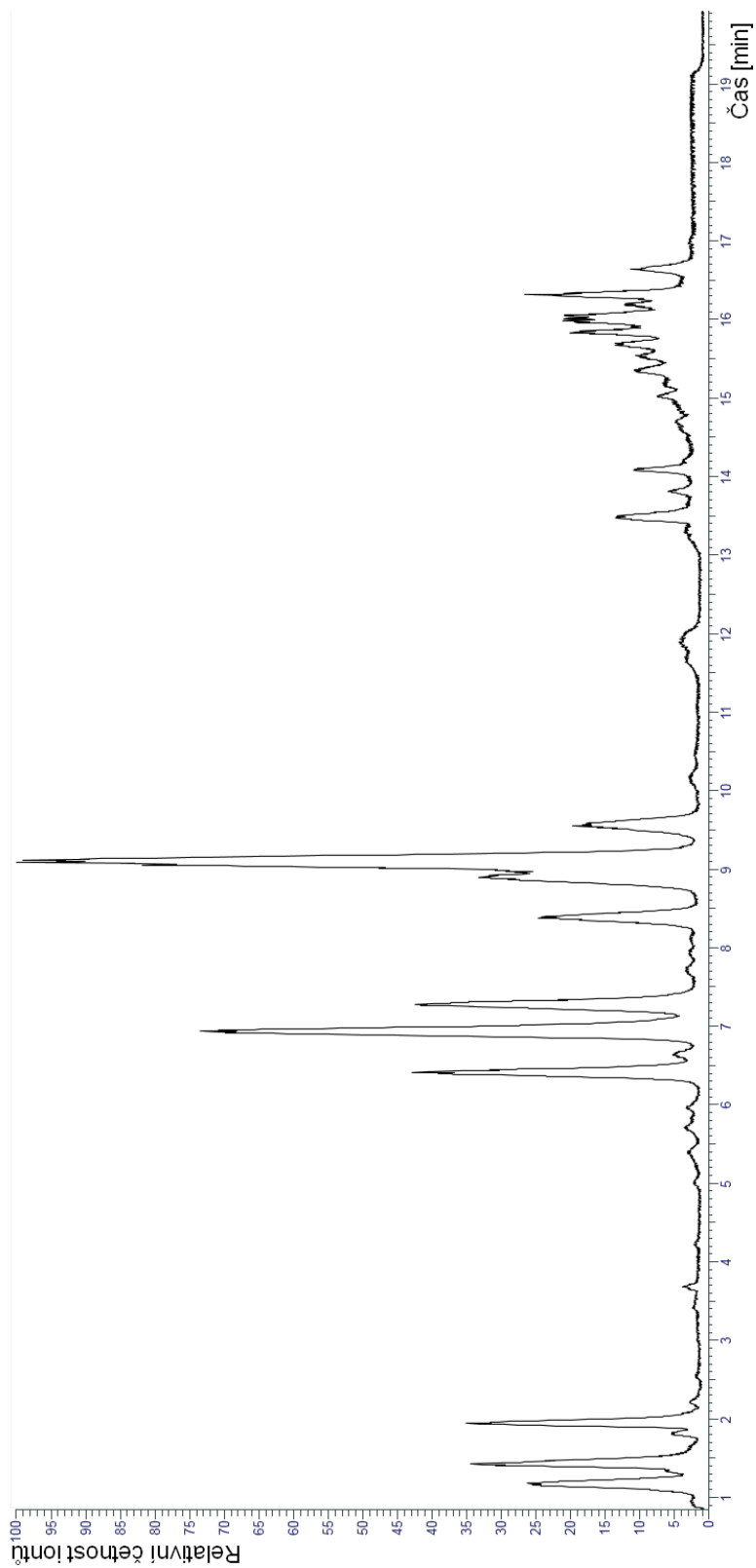
- 3(1), 39–43. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1993.tb00724.x>
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease, *8*, 499.
- Levarska, L., Zilka, N., Jadhav, S., Neradil, P., & Novak, M. (2013). Of rodents and men: the mysterious interneuronal pilgrimage of misfolded protein tau in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *37*(3), 569–577. <https://doi.org/10.3233/JAD-131106>
- Lippens, G., Sillen, A., Landrieu, I., Amniai, L., Sibille, N., Barbier, P., ... Wieruszeski, J.-M. (2007). Tau Aggregation in Alzheimer's Disease. *Prion*, *1*(1), 21–25.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Rossie, S., & Gong, C.-X. (2005). Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(3), 1790–1796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410775200>
- Lu, W., Bennett, B. D., & Rabinowitz, J. D. (2008). Analytical strategies for LC–MS-based targeted metabolomics. *Journal of Chromatography B*, *871*(2), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.031>
- Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., & Barbeito, L. (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research*, *32*(5), 367–381.
- Mandelkow, E. M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., & Mandelkow, E. (1995). Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiology of Aging*, *16*(3), 355–362; discussion 362–363.
- Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>
- Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, *58*(4), 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.023>
- Mattson, M. P. (2004). Pathways Towards and Away from Alzheimer's Disease. *Nature*, *430*(7000), 631–639. <https://doi.org/10.1038/nature02621>

- Meloun, M., Militký, J., Hill, M., & Brereton, R. G. (2002). Crucial problems in regression modelling and their solutions. *Analyst*, 127(4), 433–450. <https://doi.org/10.1039/B110779H>
- Morreale, B. (2015). The Progression of Alzheimer's Disease. *Bright Focus Foundation* [online]. Získáno 7. březen 2018, z <https://www.brightfocus.org/alzheimers/infographic/progression-alzheimers-disease>
- Mushtaq Mian Yahya, Choi Young Hae, Verpoorte Robert, & Wilson Erica G. (2014). Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. *Phytochemical Analysis*, 25(4), 291–306. <https://doi.org/10.1002/pca.2505>
- Nakatomi, Y., Fujishima, M., Tamaki, K., Ishitsuka, T., Ogata, J., & Omae, T. (1979). Influence of sex on cerebral ischemia following bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive rats: a metabolic study. *Stroke*, 10(2), 196–199. <https://doi.org/10.1161/01.STR.10.2.196>
- Patti, G. J., Tautenhahn, R., Rinehart, D., Cho, K., Shriver, L. P., Manchester, M., ... Siuzdak, G. (2013). A view from above: cloud plots to visualize global metabolomic data. *Analytical Chemistry*, 85(2), 798–804. <https://doi.org/10.1021/ac3029745>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pinu, F. R., & Villas-Boas, S. G. (2017). Extracellular Microbial Metabolomics: The State of the Art. *Metabolites*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/metabo7030043>
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, CHAPTER, Unit30.2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
- Sergeant, N., Delacourte, A., & Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), 179–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.020>
- Smith, C. A., O'Maille, G., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., ... Siuzdak, G. (2005). METLIN: a metabolite mass spectral database. *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(6), 747–751.

- Spencer, K. (1986). Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. *Ann Clin Biochem*; 23(Pt 1):1-25.
- Spitzer, M., Wildenhain, J., Rappsilber, J., & Tyers, M. (2014). BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. *Nature methods*, 11(2), 121–122. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2811>
- Tacik, P., Sanchez-Contreras, M., Rademakers, R., Dickson, D. W., & Wszolek, Z. K. (2016). Genetic disorders with tau pathology: a review of the literature and report of two patients with tauopathy and positive family histories. *Neuro-degenerative diseases*, 16(0), 12–21. <https://doi.org/10.1159/000440840>
- Vandrovcova, J., Anaya, F., Kay, V., Lees, A., Hardy, J., & de Silva, R. (2010). Disentangling the Role of the Tau Gene Locus in Sporadic Tauopathies. *Current Alzheimer Research*, 7(8), 726–734. <https://doi.org/10.2174/156720510793611619>
- Varadarajan, S., Yatin, S., Kanski, J., Jahanshahi, F., & Butterfield, D. A. (1999). Methionine residue 35 is important in amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress. *Brain Research Bulletin*, 50(2), 133–141. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00093-3)
- Voelzmann, A., Hahn, I., Pearce, S. P., Sánchez-Soriano, N., & Prokop, A. (2016). A conceptual view at microtubule plus end dynamics in neuronal axons. *Brain Research Bulletin*, 126, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.006>
- Wang, J.; & Liu, F. (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in neurobiology*, 85(2), 148-175.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1858–1862.
- Williams, D. R. (2006). Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Internal Medicine Journal*, 36(10), 652–660. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2006.01153.x>

- Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., ... Querengesser, L. (2007). HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D521–D526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl923>
- Yin, P., Lehmann, R., & Xu, G. (2015). Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(17), 4879–4892. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8565-x>
- Zaman, Z., Roche, S., Fielden, P., Frost, P. G., Niriella, D. C., & Cayley, A. C. (1992). Plasma concentrations of vitamins A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. *Age and Ageing*, 21(2), 91–94.
- Zhang, D., Grode, K. D., Stewman, S. F., Diaz-Valencia, J. D., Liebling, E., Rath, U., ... Sharp, D. J. (2011). Drosophila katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration. *Nature Cell Biology*, 13(4), 361–370. <https://doi.org/10.1038/ncb2206>
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4, 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zhou, J., & Yin, Y. (2016). Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *The Analyst*, 141(23), 6362–6373. <https://doi.org/10.1039/c6an01753c>

PŘÍLOHY



Příloha A Celkový iontový chromatogram znázorňující závislost součtu intenzit iontových proudů všech m/z ve spektru na čase u necílené lipidomické analýzy.