

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2015

Bc. Jakub Přichystal

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

IDENTIFIKACE TUMOR-SPECIFICKÝCH MUTOVANÝCH

FOREM K-RAS PROTEINU

POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Jakub Přichystal

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Petr Džubák, Ph.D

Konzultant:

Mgr. Dušan Holub

Olomouc 2015

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením pana MUDr. Petra Džubáka, PhD. a veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Děkuji MUDr. Petru Džubákovi, PhD. za odborné rady a připomínky při tvorbě diplomové práce a čas, který mi ochotně věnoval. Děkuji svému konzultantovi Mgr. Dušanu Holubovi za cenné rady při realizování experimentální části zejména v oblasti výběru metod, kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Děkuji mu hlavně i za trpělivost, ochotu a vstřícnost. Taktéž děkuji Mgr. Janě Václavkové za tipy a pomoc s SDS-PAGE elektroforézou a morální podporu; Mgr. Tomáši Oždiánovi za jeho přispění; Renatě Buriánové za výpomoc v laboratoři a vždy veselou náladu; pracovníkům laboratoře tkáňových kultur a dalším zaměstnancům Ústavu molekulární a translační medicíny za ochotu, vstřícnost a umožnění realizace experimentů praktické části mé diplomové práce.

Rád bych poděkoval i své rodině za trpělivost a podporu během tvorby diplomové práce ale i celého studia.

Abstrakt

K-ras protein je známým markerem rakovinových onemocnění, jelikož je nacházen u mnoha typů nádorů v mutované formě. Znalost typu mutace má význam pro cílenou léčbu, ale mohla by sloužit i jako prediktor prognózy pacienta. Existují metody pro zjištění mutace na genové úrovni. Přítomnost genu ale nemusí znamenat skutečnou přítomnost proteinu v buňce. Jedinou cestou pro zjištění přítomnosti proteinu v buňkách je proteomika.

Součástí práce je literární rešerše, která se zabývá vlastnostmi K-ras proteinu a jeho funkcí v buňce spolu s cílenou léčbou jak na samotný protein, tak jeho downstreamové cíle. Současně představuje proteomiku jako samostatný vědní obor a hmotnostní spektrometrii jako její hlavní nástroj.

V rámci praktické části byly navrženy čtyři přístupy pro zpracování proteinových vzorků za účelem identifikace mutací na K-ras proteinu pomocí LC-MS analýzy. Použité přístupy zahrnovaly využití SDS-PAGE, imunoprecipitace proteinů na magnetických kuličkách s imobilizovaným proteinem A nebo proteinem G a metodu FASPxFast, zahrnující filtraci přes membránové filtry. Na základě prvotních výsledků analýzy lyzátů buněčné linie CCRF-CEM, byl následně zvolen optimální přístup pro identifikaci mutace na K-ras proteinu u jiných buněčných linií. Imunoprecipitace na magnetických kuličkách s imobilizovaným proteinem A byla použita pro analýzu média, v kterém byly inkubována buněčná linie CCRF-CEM. Pouze dva přístupy se v navržené metodice ukázaly jako aplikovatelné – SDS-PAGE a imunoprecipitace na magnetických kuličkách s proteinem A. Návrhy pro další vylepšení jednotlivých metod jsou zahrnuty v diskuzi.

Abstract

K-ras protein is a well-known tumor-specific marker. Its mutated form is commonly found in many human cancers. Knowledge of the mutation type is important for the targeted therapy or it can be used as a prognosis predictor in patients. Genetic methods for determination of the K-ras mutations have been developed. The presence of the mutated gene does not always mean the presence of the protein in the cells. To confirmation of the presence of the protein can be done only by proteomics.

The properties of the K-ras protein and its function in the cell are presented in the Thesis. Therapies targeted against K-ras or its downstream targets are described as well. Concurrently, the proteomics is presented as an individual discipline with the mass spectrometry as its major tool.

In Diploma Thesis were designed four approaches for a protein sample processing method in order to identify the mutations of K-ras protein by LC-MS analysis. The designed approaches were comprised of the SDS-PAGE, the immunoprecipitation on the magnetic beads with immobilized protein A or protein G and the FASPxFASST method with the filtration through the membrane filters. Based on the results obtained by the analysis of the cell lysate of the CCRF-CEM cell line, the optimal approach for the identification of the K-ras protein mutation was selected for the analysis of other cell lines. The immunoprecipitation on the magnetic beads with immobilized protein A was used for the analysis of the cell medium in which the CCRF-CEM cells were incubated. Only two approaches were proven to be applicable - the SDS-PAGE and the immunoprecipitation on the magnetic beads with immobilized protein A. The suggestions for the next improvements for all protein sample processing methods are included in the discussion.

OBSAH

OBSAH.....	1
I. TEORETICKÁ ČÁST.....	5
1. K-RAS PROTEIN	5
1.1. <i>Struktura a funkce</i>	5
1.1.1. Struktura	6
1.1.2. Posttranslační modifikace.....	7
1.1.3. Ras aktivace a deaktivace	8
1.1.4. Ras efekторы	9
1.2. <i>K-ras v lidských nádorech</i>	13
1.3. <i>Důvody pro léčbu rakoviny cílenou na K-ras</i>	15
1.4. <i>Přístupy v léčbě rakoviny zacílené na K-ras</i>	17
1.4.1. Inhibice exprese Ras proteinu.....	17
1.4.1.1. Antisense oligonukleotidy.....	17
1.4.1.2. RNA interference	18
1.4.2. Inhibice procesů zpracování K-rasu	19
1.4.2.1. Inhibice farnesyltransferázy	19
1.4.2.2. Jiné cíle v Ras procesech.....	21
1.4.3. Cílení mutovaného K-ras proteinu	22
1.4.3.1. Imunologické přístupy.....	22
1.4.3.2. Inhibitory mutovaných K-ras peptidů	23
1.4.4. Cílení Ras efektorů	23
1.5. <i>Klinické metody detekce K-ras mutací</i>	24
1.6. <i>Shrnutí</i>	25
2. PROTEOMIKA	26
2.1. <i>Definice pojmu</i>	26
2.2. <i>Původ proteomiky</i>	26
2.3. <i>Genomová informace</i>	27
2.4. <i>Proč proteomika?</i>	28
2.4.1. Anotace genomu	28
2.4.2. Studie proteinové exprese.....	28
2.4.3. Proteinová funkce	29
2.4.4. Modifikace proteinů	29
2.4.5. Lokalizace proteinů a jejich začlenění.....	29
2.4.6. Protein-proteinové interakce	30
2.5. <i>Členění proteomiky</i>	30
2.5.1. Expresní proteomika.....	30
2.5.2. Strukturní proteomika.....	30
2.5.3. Funkční proteomika	31
2.6. <i>Proteomické technologie</i>	31
2.6.1. Separace a izolace proteinů	31
2.6.1.1. Jednorozměrná a dvourozměrná elektroforéza.....	31
2.6.1.2. Alternativy elektroforézy	33

2.6.2. Stanovení strukturní informace proteinu	33
2.6.2.1. Edmanovo odbourání	33
2.6.2.2. Hmotnostní spektrometrie	34
2.7. Proteomika v České republice	35
3. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	36
3.1. Příprava vzorku	36
3.2. Ionizace vzorku	36
3.2.1. Ionizace elektrosprejem	37
3.2.2. Ionizace laserem za účasti matrice	37
3.3. Hmotnostní analyzátory	38
3.3.1. Kvadrupólový hmotnostní analyzátor	38
3.3.2. Analyzátor doby letu	38
3.3.3. Iontová past	39
3.4. Typy hmotnostních spektrometrů	39
3.4.1. Trojitý kvadrupól	39
3.4.2. MALDI-TOF	40
3.4.3. Kvadrupól-TOF	40
3.4.4. MALDI-QqTOF	40
3.4.5. FT-ICR	40
3.4.6. LTQ-Orbitrap	41
3.4.7. Orbitrap Fusion™ Tribrid™	41
3.5. Fragmentace peptidů	42
3.5.1. Kolizí indukovaná disociace (CID)	42
3.5.2. Disociace vyšší energií v C-trapu (HCD)	42
3.5.3. Disociace zachycením elektronu (ECD)	42
3.5.4. Disociace transferem elektronu (ETD)	43
3.5.5. Multifotonová disociace infračerveným zářením (IRMPD)	43
3.6. Využití databází	44
3.6.1. Databázové vyhledání pro peptidový fingerprinting	44
3.6.2. Databázové vyhledání pro sekvenování aminokyselin	45
3.6.3. Vyhledávání neinterpretovaných MS/MS dat	45
3.7. Přístupy k proteomickému studiu	46
3.7.1. Bottom-up proteomika	46
3.7.2. Top-down proteomika	46
II. PRAKTICKÁ ČÁST	47
1. POPIS METOD	47
1.1. Biologický materiál	47
1.1.1. CCRF-CEM	47
1.1.2. SNU-1	48
1.1.3. NCI-H358	48
1.1.4. Calu-1	48
1.2. Metody izolace K-ras proteinu / Příprava vzorků	49
1.3. LC/MS analýza	51
2. VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ	53

2.1.	<i>Optimalizace</i>	53
2.1.1.1.	Sekvenční homologie	69
2.1.1.2.	Parametry vytvořené LC/MS metody.....	70
2.1.1.3.	Určení limitu detekce a kvantifikace.....	72
2.1.2.	SDS-PAGE	74
2.1.3.	Imunoprecipitace - magnetické kuličky protein A	77
2.1.4.	Imunoprecipitace – magnetické kuličky protein G.....	78
2.1.5.	FASP _x FAST	80
2.2.	<i>Analýza buněčných lyzátů</i>	83
2.2.1.	SDS-PAGE	83
2.2.1.1.	Linie s mutací G12D	83
2.2.1.2.	Linie s mutací G12C.....	86
2.2.2.	Imunoprecipitace – magnetické kuličky protein A.....	86
2.2.2.1.	Linie s mutací G12D	87
2.2.2.2.	Linie s mutací G12C.....	87
2.3.	<i>Analýza buněčného média</i>	89
2.3.1.	Imunoprecipitace – magnetické kuličky proteinem A.....	89
III.	DISKUZE	91
1.	PROTEINOVÉ LYZÁTY.....	91
2.	SROVNÁNÍ METOD PRO IZOLACI K-RAS PROTEINU	92
IV.	ZÁVĚR	96
V.	POUŽITÁ LITERATURA	97
VI.	POUŽITÉ VYBAVENÍ	109
1.	SEZNAM BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	109
2.	SEZNAM SYNTETICKÝCH PEPTIDŮ.....	109
3.	SEZNAM CHEMIKÁLÍ	110
4.	SEZNAM PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ.....	112
5.	SEZNAM POMŮCEK.....	114
6.	SEZNAM SOFTWARE.....	114
VII.	PŘÍLOHY	I
	PŘÍLOHA Č. 1	
	PŘÍPRAVA STERILNÍHO MÉDIA A PBS PUFRU	I
	PŘÍLOHA Č. 2	
	PASÁŽOVÁNÍ BUNĚČNÝCH LINIÍ	III
	PŘÍLOHA Č. 3	
	POČÍTÁNÍ BUNĚK A STANOVENÍ JEJICH ŽIVOTNOSTI.....	V
	PŘÍLOHA Č. 4	
	PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ.....	VII
	PŘÍLOHA Č. 5	
	STANOVENÍ PROTEINOVÉ KONCENTRACE POMOCÍ BICINCHONINOVÉ KYSELINY	IX

PŘÍLOHA Č. 6	
SDS-PAGE.....	XI
PŘÍLOHA Č. 7	
IMUNOPRECIPITACE NA MAGNETICKÝCH KULIČKÁCH.....	XVIII
PŘÍLOHA Č. 8	
FASPxFast (FILTER AIDED SAMPLE PREPARATION X FILTER AIDED SAMPLE TRYPSINIZATION)	XXV
PŘÍLOHA Č. 9	
PRECIPITACE PROTEINŮ ACETONEM	XXVIII
PŘÍLOHA Č. 10	
PURIFIKACE (ODSOLENÍ) PEPTIDOVÉ SMĚSI NA KOLONCE MACROTRAP	XXIX
PŘÍLOHA Č. 11	
PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO LC/MS ANALÝZU A SPIKOVÁNÍ	XXX
PŘÍLOHA Č. 12	
PŘEHLED KÓDOVANÝCH AMINOKYSELIN A JEJICH ZKRATEK	XXXI

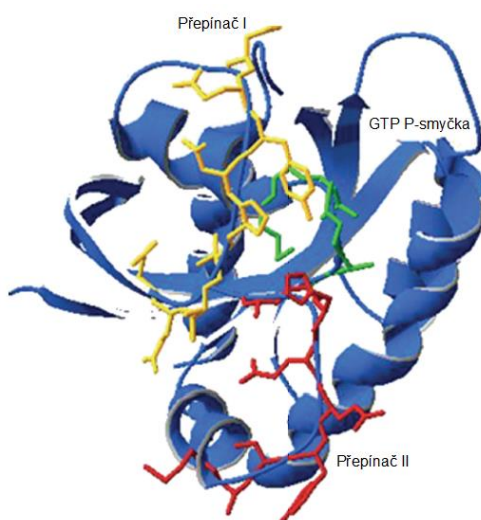
I. TEORETICKÁ ČÁST

1. K-ras protein

1.1. Struktura a funkce

K-ras protein se řadí do vysoce homologní skupiny přibližně 21 *kDa* velkých, monomerních a membránově vázaných GTPás. Skupina proteinů p21 Ras (Ras proteiny ve frakci 21 *kDa*) zahrnuje H-, N- a K-ras protein (obr. 1), který je tvořen dvěma alternativně stříženými isoformami 4A a 4B s různými C-koncovými sekvencemi, významnými pro posttranslační modifikace. Ras proteiny mezi sebou sdílí přibližně 85 % sekvenční homologie. Na základě sekvenční homologie byla vyčleněna i širší Ras superrodina, kam patří R-ras, M-ras, TC21, Rap1A, Rap1B, RalA a RalB, které sdílí 40 – 50 % homologie (Ehrhardt A., 2002). Celkově ras superrodina zahrnuje přes 150 malých GTPás. Ras geny mají jednu společnou vlastnost a to potenciální schopnost transformovat buňky. Jsou analogií onkogenům viru Harveyho a Kirstenova sarkomu (H- a K-ras) (Chang E. H., 1982) a onkogenu izolovaného z neuroblastomu (N-ras) (Shimizu K., 1983). Tyto proteiny fungují jako molekulární přepínače, vysílající signály z mimobuněčného prostředí do nitrobuněčného.

Obr. 1: Trojrozměrná struktura K-ras proteinu (Jancik, S., 2010)



(Přepínač I, aminokyseliny 30 – 38 – zvýrazněn žlutě, přepínač II, aminokyseliny 59 – 67 – zvýrazněn červeně, GTP P-smyčka, aminokyseliny 10 – 16 – zvýrazněna zeleně)

1.1.1. Struktura

Ras proteiny jsou tvořeny 188 aminokyselinami (H-, N-ras a K-ras4A), zatímco K-ras4B má jednu dodatečnou aminokyselinu (Barbacid M., 1987) a je v lidských buňkách více exprimovaný (Jančík, S., 2010). V celé skupině jsou aminokyseliny 1-165 vysoce konzervativní, kdežto koncových 25 aminokyselin je výrazně proměnných. Konzervativní část zahrnuje motivy důležité pro funkci proteinu včetně GTP vazebné domény, domény pro navázání efektoru a smyček přepínače I a II, odpovědných za interakci s guaninnukleotidovým výměnným faktorem a GTPásu aktivujícím proteinem. Protein zaujímá různé konformace podle toho, zdali váže GDP nebo GTP. Tento fakt potvrdila i rentgenová krystalová difrakce (Dykes D. C., 1993; Dykes D. C., 1992). Konformační změny jsou pravděpodobně důležité pro interakci s GDP/GTP výměnnými faktory a aktivujícími proteiny (Margarit S. M, 2003; Boriak-Sjodin P. A., 1998). Variabilní C-konec nese sekvenci významnou pro posttranslační modifikace. Zejména seskupení CAAX je odpovědné za lipidovou modifikaci, která určuje lokalizaci proteinu v buňce. K-ras4A a 4B se v tomto seskupení liší, a proto u nich pozorujeme odlišné modifikace (Jackson J. H., 1994).

Řada mutací genu pro ras protein jej trvale aktivuje. U lidských nádorů se nejčastěji vyskytují bodové mutace na kodonu 12, 13 a 61. Mutace na těchto místech vede k netečnosti Ras proteinů k hydrolýze GTP na GDP, iniciované GTPásu aktivujícími proteiny. Ras tedy „zamrzá“ v aktivovaném stavu (Jančík, S, 2010). Na pozici 12 dochází k záměně glycinu za asparagovou kyselinu, alanin, arginin, serin, valin nebo cystein a na pozici 13 za asparagovou kyselinu (Jančík, S., 2010). Nalezeny byly i mutace na jiných místech – 10, 11, 15, 18 a 22, ale jejich biologický význam není dosud jasný (Friday B. B., 2005).

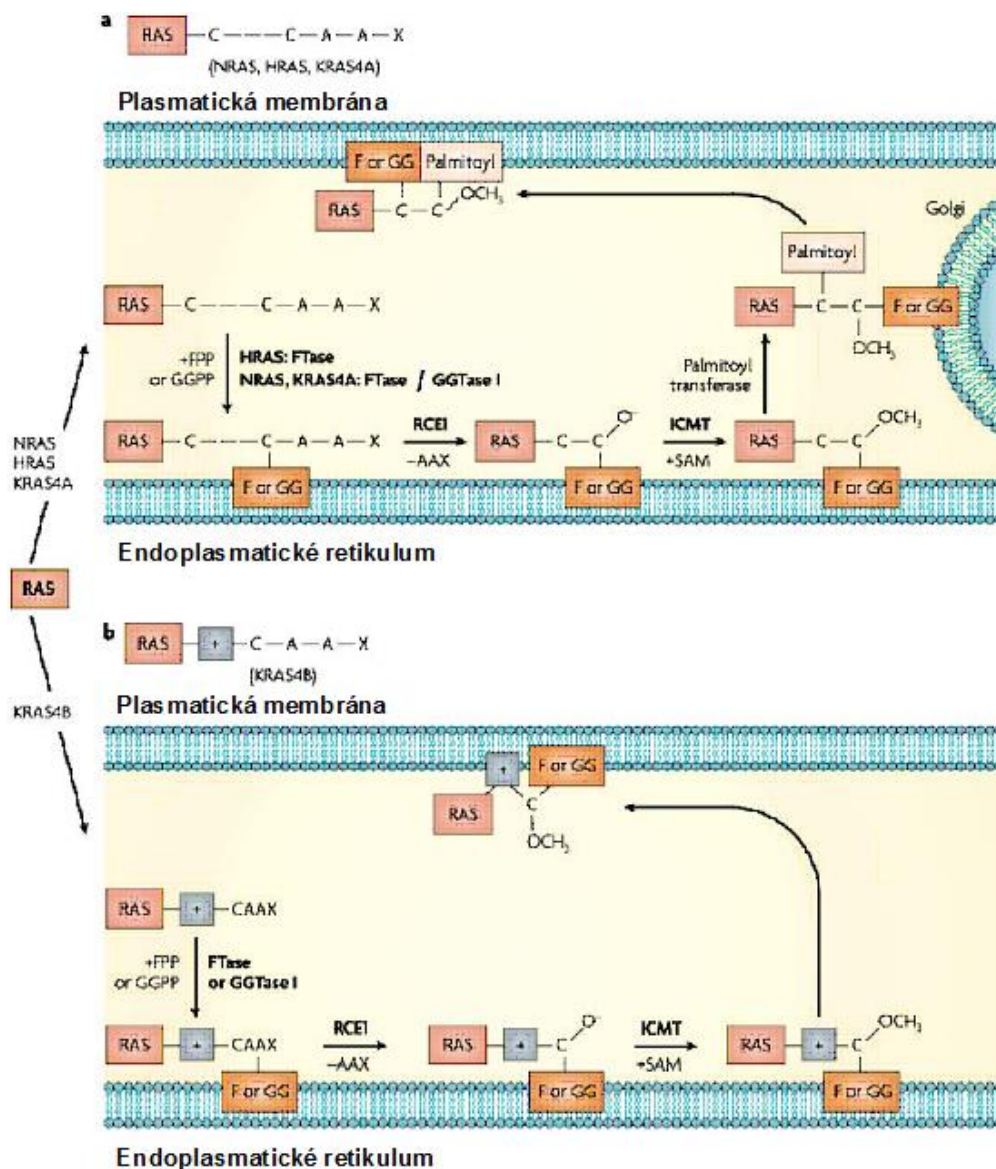
1.1.2. Posttranslační modifikace

U Ras proteinů probíhá vícestupňová posttranslační modifikace (Sebti, S. M., 2004). V buňce je nutné nasměrovat Ras protein na membránu, jelikož lokalizace na membráně je esenciální pro jeho funkci. Ras proteiny jako takové jsou malé a hydrofilní. Posttranslační modifikace Ras proteinů probíhá ve čtyřech krocích (obr. 2), kdy dochází ke zvýšení jejich lipofility.

V prvním kroku podléhají prenylaci – připojení farnesylové skupiny (F) na C-konec, která je katalyzovaná farnesyltransferásou (FT-asa). Pokud je tento enzym inhibován, může dojít k navázání geranylgeranylové skupiny (GG) díky geranylgeranyltransferáse typu I (GGTasa-1). Obě transferázy rozeznávají specifický CAAX motiv (C = Cys, A = alifatická aminokyselina – Leu, Ile či Val, X = Met, Ser, Leu či Gln) přítomný na každém z Ras proteinů (Friday B. B., 2005). Koncová aminokyselina X rozhoduje, jestli proběhne farnesylace nebo geranylgeranylace (Moore S. L., 1991). Při inhibici farnesyltransferázy modifikuje GGT-1 pouze K- a N-ras, nikoliv H-ras (Whyle, P., 1997)

Druhý krok posttranslační modifikace zahrnuje proteolytické štěpení koncového AAX motivu z CAAX proteásou Rce1 nebo Afc1 (Trueblood, V. L., 2000). Následujícím krokem je karboxymethylace zprostředkovaná specifickou transferásou přes s-adenosylmethionin (Clarke, S., 1992). V posledním čtvrtém kroku dochází k palmitoylaci SH skupiny cysteinových zbytků v blízkosti C-konce, kromě K-ras4B (Resh, M. D., 2004). Tato isoforma K-rasu dosahuje napojení na membránu díky elektrostatickým interakcím, umožněných klastrem pozitivně nabitých lysinových zbytků (Jackson, J. H., 1994).

Obr. 2: Posttranslační modifikace Ras proteinů (Konstantinopoulos, P. A., 2007)



1.1.3. Ras aktivace a deaktivace

Aktivace Ras drah je komplexní a vede k vyvolání široké škály stimulů. Samotná aktivace je zahájena různými upstreamovými receptory, jako jsou tyrosinkinázy, integriny, serpentinové receptory, heterotrimerní G-proteiny a cytokinové receptory (Ghobrial, I. M., 2002). Nejlépe popsanou drahou je nejspíše stimulace Ras proteinu před tyrosinkinásový receptor EGF. Vazba ligandu na EGF receptor indukuje oligomerizaci receptoru, kdy vznikají

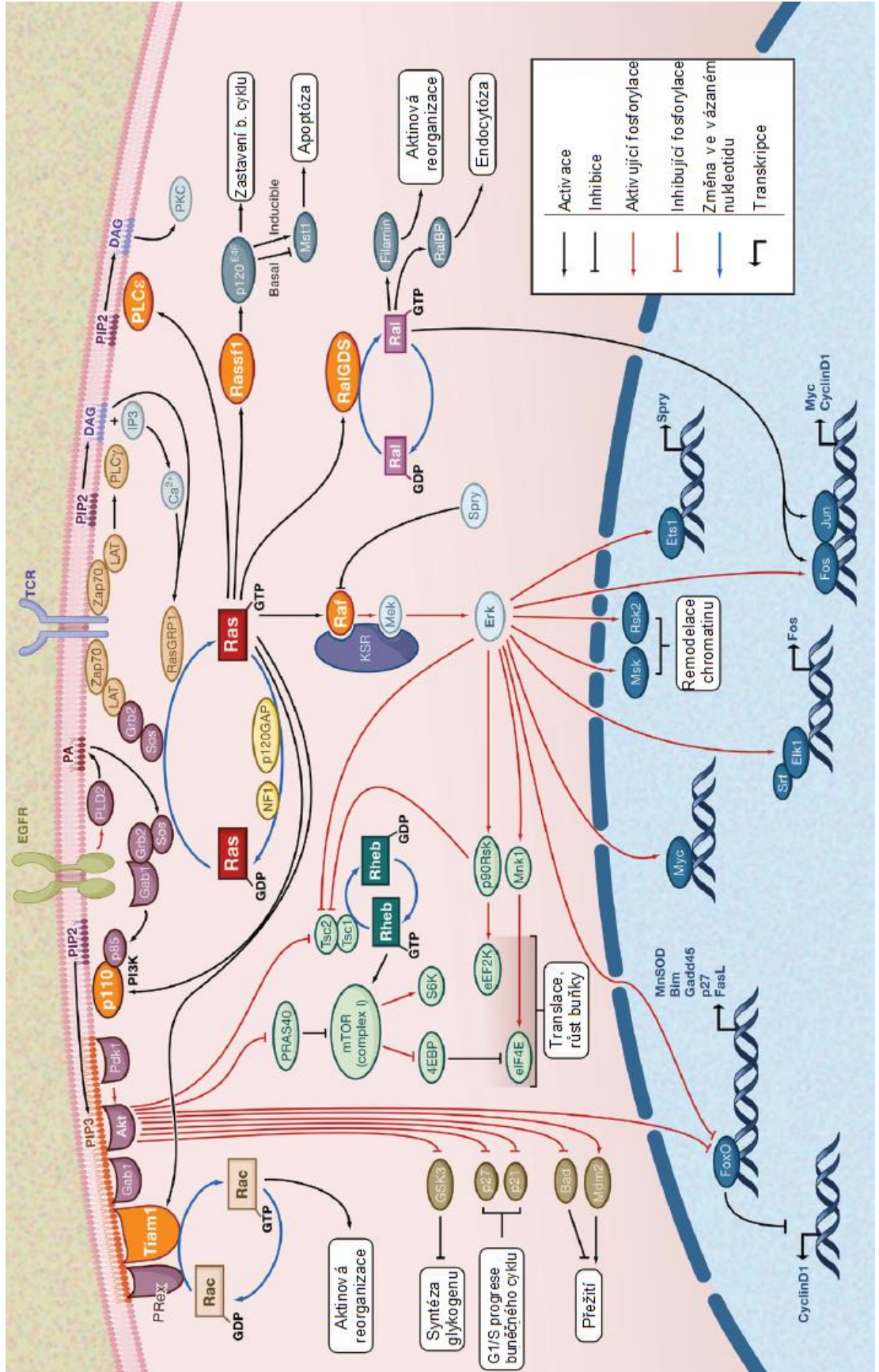
vedle sebe cytoplasmatické katalytické domény a umožní tak spuštění kinásové aktivity, tedy transfosforylaci (Lemmon, M. A., 1994). Sekvenční homologii 2 domén rozeznají adaptorové proteiny např. Grb2, ty následně zmobilizují guaninnukleotidové výměnné faktory – SOS-1 či CDK25 k buněčné membráně (Schlessinger, J., 2000). Výměnné faktory interagují s Ras proteiny v buněčné membráně a vyvolají u nich změnu konformace, tím i přeměnu GDP na GTP. Subcelulární lokalizace výměnných faktorů se považuje za klíčovou v aktivaci Ras proteinů, jelikož SOS-1 či CDC25 mají zvýšenou schopnost transformovat NIH 3T3 buňky, pokud jsou konstitučně zacílené na buněčnou stěnu (Quilliam, L. A., 1994). Výzkumy poukázaly i na skutečnost, že dráha je obousměrná, kdy Ras reguluje aktivitu SOS (Sondermann, H., 2004), což nejspíš znamená, že regulace tohoto klíčového stupně v Ras signalizaci je mnohem komplexnější, než se zpočátku zdálo.

Aktivovaný stav Ras proteinů končí s hydrolyzou GTP na GDP. Ras proteiny samy o sobě mají jistou nízkou GTPásovou aktivitu, ta je stimulovaná GTPásu aktivujícími proteiny – NF1-GAP/neurofibromin a p120-GAP. Takto je zajištěna inaktivace Ras proteinů (Bernards, A., 2004) a nedochází tedy k příliš dlouhé signalizaci. Význam GTPásu aktivujících proteinů je výrazný zejména u onkogenních mutací Rasu, které takřka jednotně znemožňují interakci Rasu s GTPásu aktivujícími proteiny. NF1-GAP gen je nádorovým supresorem a jeho dysfunkce vede k neurofibromatóze typu 1 (Reynolds, R. M., 2003) – klinická porucha vedoucí k vysokému riziku vzniku optických gliomů, astrocytomů (mozkový gliom), nádorů nervových pouzder, rhabdomyosarkomů (dětský sarkom) a feochromocytomů (neuroendokrinní nádor) u pacientů. Prodloužená nebo trvalá Ras signalizace zapříčiněná mutací, dysfunkcí NF1-GAP či nadměrnou expresí Rasu je klíčovým jevem v Rasem indukované onkogenezi.

1.1.4. Ras efektory

Aktivovaný Ras protein ovlivňuje celou řadu efektorů, z nichž jsou některé dobře popsány. Efekторы slouží k regulaci nesčetného množství buněčných funkcí včetně růstu, přežití, diferenciaci a angiogeneze (tvorba nových cév). Dráhy se s hlubším výzkumem stávají komplexnějšími díky rozpoznání dalších efektorů a odkrýváním vzájemné regulace komunikačních drah (viz obr. 3).

Obr. 3 : Schéma Ras signalizace (Cully, M., 2008)



Nejlépe popsanými Ras efektory je Raf rodina serin/threoninkinás, do níž patří Raf-1, A-raf a B-raf. Raf kináza je klíčový prvek mitogenem aktivované protein kinásové (MAPK) dráhy, zahrnující Raf/MEK/ERK. Po Ras aktivaci je Raf kináza mobilizována k buněčné stěně přes vazbu na doménu přepínače I na Ras proteinu (Marais, R., 1995) a taktéž vazbou na lipid (Johnson, L. M., 2005). Plná aktivace Raf proteinu vyžaduje mnoho kofaktorů a fosforylačních kroků. Jedná se tedy o velmi komplexní a plně nepochopený proces. Nejefektivnější aktivace Raf-1 je schopna K-ras4B, nicméně K-ras4A, H-ras i N-ras jsou této aktivace taky schopny (Voice, J. K., 1999). Kritická úloha Raf-1 v Ras signalizaci a onkogenezi je založena na několika faktech: zaprvé jsou dominantní negativní formy Raf proteinu schopny potlačovat H-rasem indukovanou buněčnou transformaci (Heinicke, T., 2000). Zadruhé trvale aktivované formy Raf kinázy mají srovnatelnou transformační schopnost jako Ras protein (Cowley, S., 1994). Aktivující mutace Braf kinázy jsou s vysokou frekvencí nacházeny u mnoha rakovin včetně maligního melanomu (66 %) a rakoviny tlustého střeva (12 %) (Davies, H., 2002). Dominantní negativní forma Raf kinázy je schopna pouze zbrzdit tvorbu nádorů vyvolaných aktivací Rasu u lysých myší (Heinicke, T., 2000) a je tedy zřejmé, že Raf není v onkogenezi jediným efektozem Ras proteinu.

Aktivovaný Raf stimuluje signální kaskádu fosforylací MEK1 a MEK2, které dále fosforylují a aktivují ERK1 a ERK2. Aktivace ERK kinázy je kritická pro Ras-indukované buněčné odpovědi. ERK1 i 2 fosforylují rozmanité transkripční faktory a kinázy – Elk-1, c-Est1, c-Est2, p90RSK1, MNK1, MNK2 i další proteiny jako např. protiproliferační protein Tob. Mnoho z těchto ERK cílů byly součástí Rasem indukované buněčné transformace (Maekawa, M., 2002, Roux, P. P., 2004).

Fosfoinositid-3'-kinázy (PI3-K) fosforylují různé fosfatidylinositolové substráty, a tak produkují mitogenní fosfoinositolové lipidy. Každá ze tří podobných p110 kinásových podjednotek třídy I, je schopna vazby na Ras svou Ras vazebnou doménou podobnou té u Raf a Ral-GDS (Vanhaesebroeck, B., 2001). Ras s navázaným GTP stimuluje aktivitu PI3-K (Rodriguez-Viciano, P., 1996). V buněčné linii NIH 3T3 (myší embryonální fibroblasty) jsou Raf a PI3-K pro buněčnou transformaci nezbytné (Rodriguez-Viciano, P., 1997). V Rasem vyvolané onkogenezi PI3-K pravděpodobně aktivuje několik downstreamových cílů, v čemž spočívá její onkogenní důležitost. Jedním z downstreamových cílů PI3-K je Akt/PKB, která je významná v regulaci apoptozy přes proapoptické proteiny – Bad či Kaspása 9 (Song, G., 2005). U buněčných liniích 16/17 NSCLC byla nalezena v rámci jedné studie trvalá aktivita Akt/PKB,

kteřá závisela na aktivitě PI3-K. Po aplikaci inhibitorů této kinázy došlo ke snížení aktivity Akt/PKB a vyvolání apoptozy (Brognard, J., 2001). Dalším downstreamovým efektem AKT je savčí cíl rapamycinu – mTOR. Inhibitory mTORu mohou zredukovat progresi malignit v myším modelu plicní rakoviny vyvolané mutovaným K-rasem (Wislez, M., 2005). Alternativním cílem PI3-K je G-protein Rac, který může být aktivovaný fosfatidyl-3,4,5-trifosfátem, což je produkt PI3-K (Crespo, P., 1997). Rac protein je důležitý v regulaci přeskupování cytoskeletu (Takai, Y., 2001), to je indukované jak membránovým zvlněním, tak i Rasem zprostředkovanou transformací. Membránová přestavba zprostředkovaná Rac proteinem, závisí na aktivitě PI3-K (Rodriguez-Viciano, P., 1997). PI3-K je tedy důležitým zprostředkovatelem Ras indukované buněčné transformace.

Vedle funkce negativních regulátorů Ras proteinu přes stimulaci hydrolýzy GTP mají GAPy p120 a NF-1 navíc funkci jako Ras efektory. Trvale aktivní Ras vyvolá asociaci p120 a syndekanu-2 do komplexu, jenž poskytuje místa pro dokování src onkogenu (Huang, J. W., 2005). Důkaz pro NF-1 je méně jasný, ale transfekce (infikování hostitelské buňky virovou nukleovou kyselinou bez proteinového obalu) NF-1 do buněk s mutantním Rasem, resistantním k GTPásu aktivující proteinové aktivitě, vedla ke sníženému počtu transformovaných kolonií (Corral, T., 2003). Na druhou stranu však NF-1 může umocnit růst Ras transformovaných buněk nezávislých na zakotvení, čímž došlo ke zlepšení vlastností maligního fenotypu. Přesná role GAPů v přenosu Ras signálu je stále nejasná.

MEKK1 je serin/threoninová kináza aktivovaná v důsledku různých signálů od růstových faktorů a cytokinů. Přes řadu mediátorů – JNK, SAPK, 14-3-3 a NF-KB vede k podnícení buněčného přežití nebo apoptozy (Schlesinger, T. K., 1998). MEKK1 může regulovat i Raf a ERK proteiny (Karandikar, M., 2000). Umožňuje tak komunikaci mezi rozmanitými signálními dráhami. Vykazuje jistou schopnost vyvolat apoptozu přes dysregulaci drah včetně ERK, JNK a p38 (Boldt, S., 2003). Přímou interaguje s Ras proteinem v závislosti na GTP (Russell, M., 1995). Biologická úloha této asociace je projevena v lysosofosfatidovou kyselinou vyvolané migraci buněk rakoviny vaječníků (Bian, D., 2004).

RalGEF regulují funkci G proteinů RalA a RalB stejně jako SOS a CDC25 regulují aktivitu Ras proteinu přes stimulaci výměny GDP za GTP. RalGEF rodina zahrnuje minimálně tři členy s Ras vazebnou doménou – RalGDS, Rgl a Rgl2/Rlf (Friday, B. B., 2005). Dominantní negativní Ral protein je schopen blokovat transformaci myších fibroblastů indukovanou Rasem

(Urano, T., 1996). Tato funkce je alespoň částečně vyvolána RalGDS, jelikož myši bez RalGDS proteinu vykazují odolnost proti rozvoji rakoviny kůže v modelu závislém na aktivaci Rasu (Gonzalez-Garcia, A., 2005).

1.2. K-ras v lidských nádorech

Mutace Ras proteinů jsou odhaleny v přibližně 30 % lidských nádorů, kdy mutace K-ras proteinu převládají. Spektrum nádorů s přítomností K-ras mutace je široké (viz tab. 1) a odráží skutečnost, že Ras je exprimován ve většině lidských buněk. Nádory slinivky jsou ke K-ras mutacím asi nejnáchylnější a mutace jsou identifikovány v přibližně 72 – 90 % nádorů (Dergham, S. T., 1997; Wang, J. Y., 2002). Případně některé nádory vykazují relativně velkou převahu mutace na jiném *ras* genu, ale jen vzácně mutaci na K-rasu. V primárních melanomech a melanomových buněčných liniích jsou běžné mutace N-rasu, ale K-ras je zde mutovaný jen vzácně (Reifenberger, J., 2004). Rozdíly v mutacích Ras proteinů mezi jednotlivými typy nádorů pravděpodobně odráží rozdíly v míře exprese a buněčně-specifických úlohách – přežití a růstu. Přestože mají Ras proteiny vysokou homologii, tak nejsou funkčně ekvivalentní. Delece genu pro K-ras je pro myši embrya letální, ale delece genu pro H- či N-ras smrtelná není (Reuther, G. W., 2000). Ras proteiny se navíc liší i v posttranslačních modifikacích, GEFech a efektorech (Ehrhardt, A., 2002; Sebti, S. M., 2004).

Tab. 1: Výskyt K-ras mutací u vybraných lidských nádorů (Friday, B. B., 2005)

Lokalizace/typ nádoru	Frekvence mutací [%]
Slinivka	72 – 90
Tlusté střevo	32 – 57
Plíce	15 – 50
Děložní sliznice	5 – 50
Močový měchýř	14 – 38
Mnohočetný myelom	16 – 33
Varlata	9 – 12

K-ras může mít úlohu v onkogenezi i tehdy, když neobsahuje aktivující mutaci, a to přes amplifikaci *ras* genu, nadexpresi nebo upstreamovou aktivaci dráhy. Všechny tyto potenciální buněčné změny vedou ke zvýšené aktivaci Ras efektorů, a tedy pohání rozvoj nádorů. Důkazy se dají nalézt v celé řadě zdrojů. Amplifikovaný gen pro K-ras byl nalezen u 40 % adenokarcinomů jícnu (Galiana, C., 1995). Morfologické změny buněčných linií 10T1/2 jsou spojeny s nadexpresí nemutovaného K-rasu (Coleman, W. B., 1994). Ras je u 50 % nádorů vysoce aktivní ve srovnání s benigní tkání u rakoviny prsu, kde jsou Ras mutace obecně vzácné. Vysoká aktivita je spojena s expresí receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) a HER-2 receptoru (Lintig von, F. C., 2000). U 41 % testovaných nádorů sérového karcinomu vaječníků byla přítomná aktivní forma MAPK bez aktivující mutace na K-rasu (Hsu, C.-Y., 2004). Na význam aktivace Rasu, při nepřítomnosti aktivující mutace, je poukázáno i úspěšnou léčbou, cílenou na receptor tyrosinkinázy – anti-Her-2 monoklonální protilátky u rakoviny prsu (Yarden, Y., 2004) a anti-EGFR monoklonální protilátky u rakoviny tlustého střeva (Taberero, T., 2004).

Četnost K-ras mutací u mnoha typů nádorů vedla mnoho skupin ke snaze zjistit, jestli přítomnost mutace je v nějakém vztahu ke stádiu onemocnění nebo celkové prognóze. V jedné studii bylo stanovení mutace K-rasu použito k definování rizikových skupin s endometriální rakovinou za použití patologického přístupu (Alexander-Sefre, F., 2003). Hloubka myometriální invaze byla stanovena alelově specifickou amplifikací založené na přítomnosti mutantního K-rasu. Oproti konvenční mikroskopii byly rozeznány i další nádory se submikroskopickou invazí a vysokou tendencí k návratu onemocnění a zhoršenou celkovou dobou přežití. K-ras mutace byly studovány i pomocí epidemiologického přístupu u široké škály nádorů – hematologické malignity, rakovina slinivky, tlustého střeva a nemalobuněčné plicní karcinomy. Obecně jsou však výsledky konfliktní. Metaanalýza dysregulace Rasu u rakoviny plic zahrnovala 43 studií, zabývajících se efektem K-ras mutací nebo nadexprese Rasu na celkovou dobu přežití (Mascaux, C., 2005). U 9 z těchto studií byla horší prognóza s ras mutací a 31 nepřineslo žádnou významnou spojitost, jedna měla lepší prognózu a dvě zbylé byly neprůkazné. Podobné výsledky byly i ve spojení s jinými typy nádorů. U karcinomů štítné žlázy byly mutace K-rasu spojeny s hůře diferenciovanými nádory a kratší dobou přežití (Garcia-Rostan, G., 2003). Několik studií s rakovinou tlustého střeva se zabývalo spojitostí mezi K-ras mutacemi a umístěním nádorů či stádiem onemocnění, ale žádná jasná spojitost mezi mutacemi a dobou přežití nebyla nalezena (Samowitz, W. S., 2000; Andreyev, H. J.,

2001). Studie zaměřené na srovnání mutace K-rasu a celkové prognózy jsou obecně nekonzistentní. Nestálost může být způsobena velikostí vzorku, heterogenitou *ras* mutací nebo nemožnosti opravy matoucích prognostických faktorů. Lepší prognostickou hodnotu by mohly mít rozdíly u downstreamových efektorů, než vysoký výskyt mutací *ras* či p21 nadexprese.

1.3. Důvody pro léčbu rakoviny cílenou na K-ras

Důvody pro použití K-rasu jako cíle pro léčbu rakoviny jsou založeny na několika faktorech, jako je funkce normálních Ras proteinů, důležitost Rasu v onkogenezi, následky inhibice Rasu v buněčných liniích nádorů a nádorových modelech i četnost mutací Rasu v lidských nádorech. Ras protein reguluje rozličné dráhy, které jsou důležité pro růst a šíření malignit včetně buněčné proliferace, regulace buněčného cyklu, přežití buňky, angiogeneze a buněčné migrace. Pod vlivem epidermálního růstového faktoru stimuluje EGFR buněčnou proliferaci skrze Ras signalizaci a vede k podpoření opravy tkání a léčby ran (Boonstra, J., 1995). Buněčný cyklus je Rasem regulován přes indukci cyklinu D1, což je protein důležitý pro progresi G1 do S-fáze, nicméně další dráhy jsou velmi pravděpodobně stejně důležité (Stacey, D. W., 2003). Antiapoptické signály generované Rasem jsou zprostředkovány PI3-K a AKT (Downward, J., 2004). Buněčnou migraci kontroluje integrinová signalizace, kterou částečně zprostředkovává Ras kaskáda (Cary, L. A., 1999). Ras proteiny jsou schopny vyvolat angiogenezi přes změny v genové expresi (Kranenburg, O., 2004). Normální Ras proteiny regulují rozličné buněčné funkce, které jsou pro tvorbu nádorů taktéž důležité.

Je zřejmé, že Ras má definovanou roli v onkogenezi, což není překvapivé, když vezmeme v potaz jeho centrální roli v regulaci buněčného růstu, diferenciace a přežití. Centrální úloha Rasu v onkogenezi se zakládá na následujících důkazech. K-ras byl prvotně popsán jako savčí protějšek transformačního činitele viru Kirstenova myšího sarkomu, který je odpovědný za maligní fenotyp buněčné linie karcinomu plic a močového měchýře (Der, C. J., 1982). Transfekce onkogenního Rasu jako protikladu k wild-type Rasu do myších fibroblastů vede také k jejich změně na nádorotvorné (Shih, C., 1982). Exprese mutantního K-rasu je v transgenních myších dostatečná k vyvolání částečné transformace nebo k úplnému zformování nádoru (Caulin, C., 2004; Tuveson, D. A., 2004). K-ras mutace jsou rovněž přítomné u lidí při mnoha premaligních podmínkách. Mutace byly popsány u sporadického hyperplastického polypu tlustého střeva, tak jako v polypech spojených s chronickou

vředovitou kolitidou (zánětem střev) – známým rizikovým faktorem rakoviny tlustého střeva (Odze, R. D., 2002). K-ras mutace byly také popsány u 39 % pacientů s chronickým zánětem slinivky, kteří byli více náchylní k rozvoji rakoviny pankreatu (Arvanitakis, M., 2004). Aktivující mutace byly identifikovány v prerakovinových solárních keratomech (Spencer, J. M., 1995). Na centrální roli K-ras mutací v rozvoji maligních fenotypů poukazuje i jejich vysoký výskyt u širokého spektra rakovinových buněk.

Ačkoliv hraje K-ras klíčovou roli v rozvoji nádorů, tak otázka, zdali blokování aktivity Rasu v rozvinutých nádorech či buněčných liniích vede k vyvolání buněčné smrti nebo ke konverzi na benigní fenotyp, byla řešena několika přístupy. Byl sestrojen dominantní negativní Ras mutací H-rasu N116Y (náhrada asparaginu tyrosinem) v místě kritickém pro navázání GTP, který mohl vrátit maligní fenotyp buněk NIH 3T3 transformovaných onkogenním Rasem (Friday, B. B., 2005). H-ras s mutací N116Y je schopen inhibovat buněčný růst v různých lidských nádorových buněčných liniích a může inhibovat i růst myších nádorových modelů rakoviny jícnu a slinivky, když je vpraven ve vektoru adenoviru přímo do nádoru (Ogiso, Y., 1994). Mutovaný GEF byl vytvořen, aby nahradil nemutovaný GEF, což vedlo k tvorbě stabilního GEF/Ras komplexu, který redukuje Ras signalizaci sekvestrací (oddělením signalizace wild-type formy od mutované) (Bossu, P., 2000). Transfekce dominantně-negativního GEFu do myších fibroblastů, transformovaných onkogenním K-rasem, vedla k návratu buněk do wild-type fenotypu. Po odstranění aktivované formy K-rasu genetickou delecí v lidských buněčných liniích rakoviny tlustého střeva DLD-1 a HCT-116 bylo dosaženo konverze maligních buněk na benigní fenotyp, v němž buňky nebyly schopné tvořit klony na agaru a postrádaly tumorogenicitu v lysých myších (Shirasawa, S., 1993). Efektivní zrušení aktivity Rasu dominantními negativy nebo vyvázáním vede ke zkrácení doby přežití a proliferační kapacitě.

K-ras má jasnou roli v rozvoji a udržování maligních fenotypů. Skutečnost, že Ras mutace jsou tak časté a K-ras je nejčastěji mutovaný, z něj činí atraktivní cíl pro terapii. Terapie cílená na K-ras je racionálním přístupem s předpokládaným klinickým přínosem.

1.4. Přístupy v léčbě rakoviny zacílené na K-ras

Ras signalizace je komplexní, tedy existuje mnoho kroků, na něž lze léčbu zacílit. Ras aktivace tyrosinkinásou a dalšími receptory jsou oblasti, kde farmaceutický vývoj zaznamenal úspěchy s látkami zaměřenými na EGFR, VEGFR, Her-2 a bcr-abl. Je možné, že protinádorová aktivita těchto látek je částečně způsobena efekty na Ras signální dráhy. Zde se však zaměříme na Ras a downstreamové efekty. Cílení K-ras dysregulace se může zaměřit na mnoha úrovních Ras signalizační kaskády – inhibice exprese Ras proteinu, inhibice membránové lokalizace při posttranslačních modifikacích nebo dopravy na místo, blokování Rasu interakcí s GEFy, podpora Ras/GAP interakcí, cílení onkogenního K-rasu nebo inhibice Ras efektorů. Pro efektivní terapii rakoviny, cílenou na K-ras, by bylo nutné vyvinout prostředek, který specificky cílí Ras dysregulaci, je aktivní perorálně, má minimální systémovou toxicitu a potenciálně inhibuje aktivitu Rasu. Takový prostředek bohužel dosud neexistuje.

1.4.1. Inhibice exprese Ras proteinu

1.4.1.1. Antisense oligonukleotidy

Princip metody je založen na zavedení antisense Ras DNA do nádorových buněk (Duursma, A. M., 2003). Ta by se měla komplementárně vázat na Ras mRNA molekuly a stericky tak blokovat v translaci nebo vést k RNásou H zprostředkované RNA degradaci. Několik studií ukázalo, že by tento přístup mohl být účinný. Oligonukleotidové cílení 5'-doprovodné oblasti H-ras zredukovalo expresi H-ras proteinu o 90 % v NIH 3T3 buňkách transformovaných aktivovaným H-rasem (Gray, G. D., 1993). Buňky ošetřené antisense oligonukleotidy vykazovaly navíc sníženou tvorbu nádorů po transfekci do lysých myší. Byly popsány metody cílení K-rasu pomocí adenoviru, exprimujícího 2 kb antisense K-ras (Zhang, Y., 1993). Infekce K-ras antisense adenovirem vedla u buněčných linií rakoviny plic k 10x nižší expresi K-rasu a snížené schopnosti tvořit kolonie na agaru i tumorigenitě v orthotopickém (na správném místě) modelu rakoviny plic. Významná protinádorová aktivita byla zaznamenána po intratracheální aplikaci (do průdušnice) u lysých myší s implantovanými lidskými nádory (Georges, R. N., 1993). Jiná metoda využívá adenovirus s 247 pb dlouhou sekvencí komplementární ke K-rasu, aby potlačila růst lidských pankreatických buněk v břišní dutině (Miura, Y., 2005).

Antisense přístup je bohužel limitován možností bezpečně a efektivně podat oligonukleotidy. ISIS 2503 je fosforothioát, dvacetimerní oligonukleotid směřovaný na 5'-nepřepisovanou oblast H-rasu. Substituce síry za kyslík ve fosfodiesterové vazbě na fosfothioátovém oligonukleotidu vede k jeho vyšší stabilitě a odolnosti vůči endonukleázám. ISIS 2503 může specificky snížit expresi H-rasu v buněčné kultuře, zabránit proliferaci nádorových buněk a inhibovat lidské nádorové xenografty v lých myších (Friday, B. B., 2005). Ve fázi I klinického testování byl dobře snášen i v dávkách do 10 mg/kg/den v kontinuální infuzi, ale byla pozorována jen omezená protinádorová aktivita u 4 z 22 léčených pacientů se stabilním onemocněním (Cunningham, C. C., 2001). Pouze limitovaný a nekonzistentní účinek na H-ras byl nalezen v periferních krevních buňkách, ačkoliv byla překročena *in-vitro* IC50 (50 % inhibiční koncentrace). V další klinické studii bylo léčivo použito v kombinaci s gemcitabinem (fluorovaný derivát deoxycytidinu). Kombinace byla dobře snášená a hlavní toxicita byla hematologického charakteru – umocnění trombocytopenie (nedostatku krevních destiček) závislé od dávkování. Ve fázi I došlo ke stabilizaci onemocnění u 6/27 pacientů a částečné odpovědi u pacienta s rakovinou prsu (Adjei, A. A., 2003). Fáze II zahrnovala 48 pacientů s adenokarcinomem slinivky v pokročilém či metastatickém stádiu. Získaný odpovědní faktor byl 10,4 % pro kombinaci (Alberts, S. R., 2004) a 5 % pro samotný gemcitabin ve fázi III (Burris III, H. A., 1997). Dosud neexistuje přesvědčivý důkaz, že ISIS 2503 má specifickou protinádorovou aktivitu buď samostatně či v kombinaci s gemcitabinem.

Neúspěch antisense terapie není pravděpodobně způsoben nedokonalým cílením, ale spíše limitacemi v dostupných technikách. Úspěšná inhibice Rasu při použití antisense oligonukleotidů v lidských nádorech nebyla zatím prokázána.

1.4.1.2. RNA interference

RNA interference je druhým přístupem v omezení exprese Rasu. Jedná se o sekvenčně specifickou posttranskripční metodu genového silencingu, vyvolaného dvouvláknovou RNA (Duursma, A. M., 2003). Do buněk jsou vloženy krátké interferující RNA molekuly (siRNA – short interfering) s komplementární sekvencí k cílenému genu, které vytvářejí vlásenkovou smyčku. Výchozí dvouvláknová RNA je štěpena na fragmenty enzymem RNásou III Dicerem a ty jsou zabudovány do RNA – silencer komplexu, který skenuje mRNA a hledá sekvence komplementární k siRNA (Hannon, G. J., 2002). Rozeznání vede k degradaci specifické

mRNA. Výhodou této techniky oproti antisence oligonukleotidům je vysoká specifita, kdy i odlišnost v jediné bázi vede k siRNA vyvolané degradaci mRNA. Je tedy možné citlivě cílit na mutovanou formu K-rasu, zatímco wild-type forma není zasažena. Virovou transfekcí přenesená siRNA proti mutantní formě K-ras^{12V} alele snížila v buněčných liniích obsah mutantní formy K-rasu, nikoli však wild-type formy (Brummelkamp, T. R., 2002). Zároveň došlo k redukci tumorogenicity buněk s mutantní formou K-rasu, ale ne wild-type buněk, jak u metody tvorby kolonií na agaru, tak i tvorby nádorů v lysých myších.

Efektivní přenesení specifické siRNA do nádorových buněk by mohlo selektivně útočit na nádory s mutantním K-rasem a buňky s nemutovaným K-rasem nechat bez povšimnutí, což by znamenalo minimální systémovou toxicitu. Stejný faktor jako u antisense technologie – bezpečný a účinný přenos do místa určení, bude omezovat použití siRNA molekul. Do stádia klinického testování dosud nepostoupila žádná siRNA molekula.

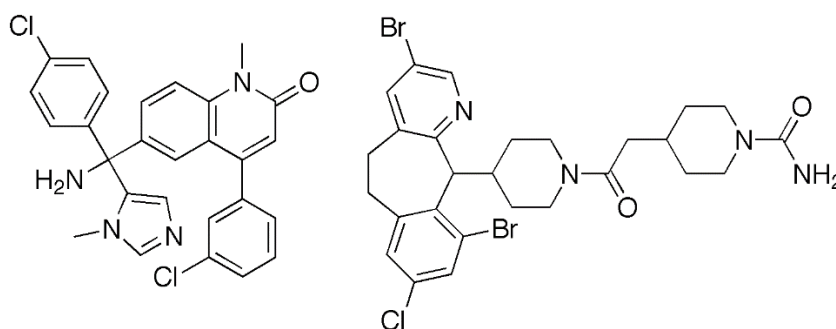
1.4.2. Inhibice procesů zpracování K-rasu

1.4.2.1. Inhibice farnesyltransferázy

Lokalizace na membránu je pro K-ras signalizaci nezbytná. Jak bylo již řečeno výše, je posttranslační modifikace vedoucí k membránové lokalizaci vícekrokový proces zahrnující prenylaci, proteolytické štěpení, metylaci a palmitoylaci. Inhibice kteréhokoliv z těchto kroků může vést ke snížené aktivitě K-rasu tím, že se zabrání v lokalizaci na membránu. Prenylace je rychlost určující krok v modifikačním procesu a rozsáhlý výzkum byl již věnován vývoji účinných inhibitorů. Důvodem je fakt, že pro onkogenní transformační aktivitu Rasu je farnesylovaná vyžadována (Kato, K., 1992). Inhibitory farnesyltransferázy byly první skupinou protirakovinových látek k cílení Ras prenylace. Řada publikovaných review popisuje jak preklinická tak klinická data, získaná po použití těchto inhibitorů (Sebti, S. M., 2004; Haluska, P., 2002; Adjei, A. A., 2003). Obecně lze inhibitory farnesyltransferázy rozdělit do dvou skupin: CAAX peptidomimetika, která napodobují přirozené rozpoznávací místo farnesyltransferázy a nepeptidomimetika. Mezi peptidomimetika patří např. FTI-276 a FTI-277 a nepeptidomimetika např. tipifarnib (R115777; obr. 4, vlevo), lonafarnib (SCH663366; obr. 4, vpravo) a BMS-214662. Velké množství dat podporuje preklinickou účinnost těchto látek, např. tipifarnib v dávkách 6,25 – 100 mg/kg inhibuje růst nádorů s H- či K-ras mutací a nemutovaným Rasem

v lysých myších (End, D. W., 2001) a navíc vykazuje aktivitu u 75 % z testovaných nádorových buněčných linií. FTI-276 je peptidomimetikum C-konce K-rasu4B, které inhibuje růst NIH 3T3 buněk transformovaných onkogenním Rasem, tak i růst lidských plicních karcinomů s K-ras mutací v lysých myších (Sun, J., 1995). Podobné výsledky přineslo i použití ostatních inhibitorů. Z toho vyplývá, že se jedná o skupinu látek, které jsou schopné účinně inhibovat Ras v *in-vitro* systémech, nádorových buněčných a zvířecích modelech.

Obr. 4: Struktura tipifarnibu (vlevo) a lonafarnibu (vpravo)



V klinických studiích byl nejvíce studovaný tipifarnib, který byl dokonce v roce 2005 navržen FDA (Food and Drug Administration) ke schválení jako léčivo pro pacienty ve vyšším věku s akutní myeloidní leukémií. FDA však toto použití zamítla pro nedostatečně výzkumně podložený terapeutický benefit pro pacienty (Kanapaux, W., 2005; Mesa, R.A., 2006). Toto léčivo – nepeptidomimetický chinolonový analog – je aktivní při perorální aplikaci s výraznou aktivitou v hematoonkologických malignitách jako je leukémie s 29 % celkovou odpovědí (Karp, J. E., 2001). Další inhibitory farnesyltransferázy vykazovaly klinickou aktivitu, ale studovány byly jen okrajově.

Inhibitory farnesyltransferázy byly primárně vytvořeny k cílení Rasu, nicméně je spíše nepravděpodobné, že by jejich protinádorová aktivita vycházela čistě z inhibice Rasu a nemusí tedy v léčbě rakoviny představovat významný přístup v cílení K-rasu. Toto tvrzení je založeno na několika důkazech. Za prvé je to prenylace Ras proteinů geranylgeranylací při inhibici farnesyltransferázy, kdy membránová lokalizace není ovlivněna (Whyte, D. B., 1997). Za druhé reverze Ras-transformovaného fenotypu ve fibroblastech léčbou inhibitory nekoreluje s očekávaným časovými průběhy inhibice Rasu podle znalosti poločasů rozpadu, což naznačuje na reverzi způsobenou jinými cíli než Rasem (Prendergast, G. C., 1994). Nejen Ras je farnesylován, ale i další signální molekuly podléhají stejné modifikaci – Rho-B, Rho-E, Rap2A a další, což vede k pleiotropnímu (jednofaktorové ovlivnění více oblastí) biologickému efektu

při inhibici farnesyltransferázy (Friday, B. B., 2005). Inhibitory farnesyltransferasy budou bezpochyby významné v léčbě rakoviny, ale nebudou představovat úspěšnou strategii pro cílení K-rasu.

1.4.2.2. Jiné cíle v Ras procesech

Cíli pro léčbu mohou být i další kroky z posttranslační modifikace, i když jejich nezbytnost v onkogenní signalizaci Rasu je méně jasná. Význam CAAX proteázy Rce1 v Ras signalizaci a onkogenezi je podporována několika studii. V myších fibroblastech s knockoutovaným *rce1* genem vykazuje K-ras pouze částečnou delokalizaci a Rasem indukovaná transformace byla snížena v testech na agarových koloniích (Bergo, M. O., 2002). Deficit Rce1 je v knockoutovaných myších ve vývoji embrya letální a Ras v buňkách těchto myší je také delokalizovaný (Kim, E., 1999). Methylace je taky důležitá. Transformace fibroblastů aktivovaným K-rasem je inhibována vypnutím genu pro isoprenylcystein karboxyl methyltransferasu (ICMT) – enzymu zodpovědného za methylyaci Rasu. Nízkomolekulární inhibitor ICMT založený na indolu – cysmethynil – má protinádorovou aktivitu (Winter-Vann, A. M., 2005). Ošetření nádorových buněk cysmethynilem vedlo k delokalizaci K-rasu v míře závislé na dávce a blokaci růstu buněčné linie rakoviny tlustého střeva. Palmitoylace je pravděpodobně nevýznamná v přístupu cílení K-rasu, jelikož K-ras varianta 4B dosahuje membrány díky polylysinové doméně, nikoliv přes palmitoylaci (Jackson, J. H., 1994). Každý krok posttranslační modifikace je potenciálním cílem pro léčbu rakoviny, ale jejich význam a klinický užitek v cílení dysregulovaného K-rasu musí být teprve stanoven. Mezi nedostatky těchto technik patří hlavně neschopnost specificky cílit K-ras a jeho mutované formy včetně dalších cílů, které jsou důležité pro udržení maligního fenotypu. Nespecifičnost cílení posttranslačních modifikací může vést ke zvýšené toxicitě, a tedy i limitovanému klinickému vývoji.

1.4.3. Cílení mutovaného K-ras proteinu

1.4.3.1. Imunologické přístupy

Aktivující mutace K-rasu jsou tak běžné u lidských malignit, že byly vyvinuty strategie na specifické cílení těchto forem K-rasu. Zejména cílení mutantní formy je věnována zvláštní pozornost, poněvadž se u tohoto přístupu předpokládá minimální toxicita pro normální buňky nesoucí wild-type formu Rasu. Výše již byla popsána metoda siRNA. Další metoda spadá do imunologického odlišení mutantní formy od wild-typu. Mutovaná forma je považována za nádorově specifickou. Z toho plyne, že cílení cytotoxických T-buněk na nádory může představovat vysoce specifickou techniku (Gjertsen, M. K., 1998). Vakcinace mutantními Ras peptidy může stimulovat imunitní odpověď, která zahrnuje jak CD4+ a CD8+ T-lymfocyty u pacientů s rakovinou či bez ní. Tyto T-buňky jsou schopny v *in-vitro* testech rozeznat a inhibovat růst lidských buněčných linií nesoucích odpovídající mutaci Rasu. Klony izolovaných T-lymfocytů z pacienta, imunizovaného proti Ras peptidu G13D, vykazovaly cytotoxicitu pro buňky rakoviny tlustého střeva se stejnou mutací (Fossum, B., 1995). Aktivace T-buněk vyžaduje více signálů, jelikož samotný mutantní K-ras není příliš imunogenní v přirozeném nádorovém uspořádání, a to díky nízké frekvenci imunitních reakcí u nevakcinovaných pacientů (Fossum, B., 1995; Gjersten, M. K., 2001). Peptidy jsou často ve spojení s imunostimulujícími adjuvans, často GM-CMF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Při použití alternativní metody jsou izolované buňky s antigenem naplněny Ras peptidy v *ex-vivo* podmínkách a následně jsou aplikovány pacientovi. Této techniky bylo využito ke studii klinických a imunologických výsledků u pacientů s adenokarcinomem slinivky (Gjersten, M. K., 2001). Imunizace pacientů probíhala buď proti peptidu s odpovídající mutací nalezenou v nádoru, nebo směsí peptidů odpovídající čtyřem nejčastějším mutacím. Peptidově specifická imunita byla vyvolána u 25 ze 43 (58 %) pacientů. Pacienti s odpovědí na léčbu měli prodlouženou dobu přežití. Ukázalo se, že T-lymfocyty neovlivňují buňky s nemutovanou formou a cílí jen buňky s mutací (Khleif, S. N., 1999). Jsou však nezbytné další studie pro objasnění role této metody v léčbě rakoviny.

Další možností je využití celých kvasinek, které exprimují mutantní proteiny, jelikož kvasinkové buňky jsou imunitním systémem rozeznány jako typické patogeny. Mohou tak tedy vyvolat imunitní odpověď vůči rekombinantním proteinům (Friday, B. B., 2005). Vytvořené kvasinkové kmeny byly využity k imunizaci myši s plicní rakovinou indukovanou injekcemi

urethanu, který způsobuje adenomy a karcinomy s K-ras mutací (Lu, Y., 2004). Celkový objem nádorů a jejich vzhled byl výrazně snížen, pokud mutace ve vakcíně korespondovala s nádorovou. Imunoterapie, založená na peptidech odpovídajících K-ras mutací, může představovat účinnou léčbu. Vakcinace byla testována u pacientů s pokročilou nemalobuněčnou rakovinou plic. Vakcinace byla dobře snášena, ale nedošlo k vytvoření *ex-vivo* detekovatelné odpovědi T-buněk (Meyer, R. G., 2007).

1.4.3.2. Inhibitory mutovaných K-ras peptidů

Druhý navržený přístup využívá vhodně navržené peptidy, které odpovídají efektorových doménám na K-rasu (Pincus, M. R., 2004). Tyto domény se díky konformačním změnám na mutované formě liší od těch na nemutovaném proteinu. Peptidy inhibovaly růst buněk v linii krysích nádorů slinivky a pankreatické linii transformované mutantním K-rasem. Metoda stojí na myšlence, že mutantní formy jsou vhodné na cílení léčby, aniž by došlo k ovlivnění normální funkce Rasu. Vytvořené peptidy mohou být stěžejní pro vývoj peptidomimetik specifických vůči mutovanému K-rasu.

1.4.4. Cílení Ras efektorů

Dysregulace K-rasu je v lidských nádorech doprovázená dysregulací downstreamových efektorů. Cílení těchto efektorů může být potenciální metoda K-ras specifické léčby rakoviny.

Byly testovány inhibitory Raf kinázy. Raf je součástí Raf/MEK/ERK dráhy, která patří k nejlépe charakterizované signální dráze regulované Rasem. Nejvíce testovaným byl nízkomolekulární derivát močoviny – sorafenib, který je účinný při perorálním podání a vedl ke klinické odpovědi u pacientů. Výrazná aktivita byla pozorována zejména u nádorů ledvin, ale sorafenib ovlivňuje i jiné tyrosinkinázy, tedy se velmi pravděpodobně jedná o metodu jen částečně cílicí K-ras (Wilhelm, S. M., 2004; Larkin, J. M. G., 2006). Testovány byly i inhibitory MEK kinázy (mitogenem aktivované protein kinázy kinázy), které bohužel nebyly dostatečně účinné (Reinhart, J., 2004), pravděpodobně kvůli neuspokojivým farmakokinetickým vlastnostem přípravku.

Transformace indukovaná Rasem probíhá částečně přes PI3-K a její efektor AKT. Důležitým downstreamovým cílem je savčí cíl rapamycinu (mTOR) (Vignot, S., 2005). Reguluje kontrolu translace, apoptozu, postupování buněčného cyklu a modulaci metabolismu. Několik studií poukázalo na spojení mezi onkogenním Rasem a aktivací mTORu. Inhibitory mTORu vykazaly v klinických testech povzbudivou protinádorovou aktivitu proti různým lidským nádorům (Vignot, S., 2005).

1.5. Klinické metody detekce K-ras mutací

Existuje řada různých metod, jak detekovat mutace K-ras genu. Většinu z nich zahrnuje použití PCR (polymerázová řetězová reakce) k amplifikaci odpovídajícího regionu K-ras genu. Poté navazují různé přístupy, jak odlišit mutovanou formu od wild-type (nemutované) formy na klíčovém kodonu 12, resp. 13. Detekčními metodami jsou: sekvenování nukleových kyselin, alelově specifické PCR metody, analýza křivky tání a další (Anderson, S. M., 2011).

Mezi tři nejběžnější klinicky využívané metody patří sekvenování, real-time PCR s analýzou křivky tání a alelově specifická PCR. Pyrosekvenování zahrnuje uvolnění a detekci pyrofosfátu, produkovaného během inkorporace specifického nukleotidu do syntetizovaného DNA komplementu. Pyrofosfát je následně převeden sérií enzymatických reakcí na detekovatelný signál (Ogino, S., 2005). Real-time PCR metody s analýzou křivky tání, k odlišení nukleotidových variací v amplifikovaném cíli, jsou používány v mnoha klinických oblastech. Technologie křivky tání využívá fluorescenční sondu komplementární s cílovým amplikonem, kdy na základě rozdílu v teplotě, nutné k disociaci sondy ze vzniklého komplexu, jsou rozlišeny mutované formy od nemutovaných. Rozdíly jsou rozeznány podle zhášení fluorescence v závislosti na vzrůstající teplotě (Tsiatis, A. C., 2010) Alelově specifické PCR metody jsou také běžně používány k rozlišení bodových mutací. Využívají oligonukleotidové primery, které umožňují specifickou amplifikaci mutantní formy oproti nemutované na základě rozdílů v navázání a přebytku primeru. Produkty mohou být následně detekovány pomocí gelové elektroforézy či detekcí používanou v real-time PCR (Anderson, S. M., 2011).

Znalost mutace přítomné v nádorové tkáni je důležitá pro následnou volbu léčebného postupu. Mutace na K-ras proteinu vede k rozdílným reakcím pacientů na aplikovanou léčbu, např. nízká odpověď na chemoterapeutickou léčbu nebo resistance nádorových buněk vůči

radiační léčbě při expresi K-ras proteinu s mutací G12V (Jancik, S., 2010). Přítomnost mutované formy K-ras proteinu je spojena i s možnou horší prognózou.

1.6. Shrnutí

Regulace růstu buněk, jejich diferenciaci a samotné přežití buňky je zajištěno souhrou mimobuněčných signálů a vnitrobuněčných signálních kaskád. Ras rodina monomerních G proteinů – H-ras, N-ras a K-ras, pracují jako molekulární převáděče vnějších signálů, přenesených membránovými receptory na signály vnitřní. Ras proteiny v cyklech přecházejí mezi vypnutým stavem, kdy je navázaný GDP a aktivovaným stavem s navázaným GTP, a to v závislosti na aktivaci různými receptory. Aktivovaný Ras následně cílí celou řadu downstreamových efektorů jako je Raf kináza, fosfoinositid-3'-kináza (PI3-K) a RalGEF, čímž vyvolává z jednoho vnějšího signálu více buněčných funkcí (tzv. pleiotropní efekt). RAS signalizace je důležitá pro růst a přežití buněk, ale zejména v onkogenezi. U lidských nádorů byl K-ras identifikován jako transformující protein, který je analogií k proteinu viru Kirstenova myšího sarkomu. Nalezené bodové mutace tohoto proteinu vedou k jeho trvalé aktivaci. Tyto mutace jsou s vysokou frekvencí nacházeny v mnoha typech lidských nádorů.

V oblasti léčby bylo vyvinuto několik přístupů, které jsou cílené na K-ras. Přístupy zahrnovaly metody inhibice proteinové exprese aplikací non-sense oligonukleotidů, blokace posttranslační modifikace inhibicí farnesyltransferasy nebo inhibicí downstreamových efektorů. Některé z těchto metod vyústily v protinádorové aktivitě, ale role inhibice K-rasu v léčbě rakoviny není dosud úplně dořešena, jelikož testované inhibitory v klinických studiích působily i na jiné cíle vedle K-ras proteinu.

2. Proteomika

2.1. Definice pojmu

Pojem proteomika byl poprvé použit v roce 1995, aby vyjádřil širokoškálovou charakterizaci veškerého proteinového vybavení buněčné linie, tkáně nebo organismu. (Anderson, N. G., 1996; Wilkins, M. R., 1995). V současnosti se uplatňují dvě definice. První a zároveň klasičtější zahrnuje pouze analýzy proteinů a vyřazuje ostatní studie genetických produktů. Druhá zahrnuje kromě analýzy proteinů i zmíněné genetické produkty, jako je studium mRNA, genomu a dvouhybridové kvasinkové analýzy (Pandey, A., 2000). Cíl proteomiky zůstává nezměněn – získat globálnější a ucelenější pohled na biologii sledováním všech proteinů, než studiem jednoho po druhém.

Použití druhé definice umožňuje vyčlenění mnoha různých oblastí zájmu. Mezi tyto spadají protein-proteinové interakce, modifikace, lokalizace a funkce proteinů a další. Záměrem proteomiky není jen identifikovat kompletní proteom, ale vytvořit i úplnou trojrozměrnou mapu s umístěním proteinů v buňce. Vytvoření takto komplexního systému bude zahrnovat spojení několika vědeckých disciplín: molekulární biologii, biochemii a zejména bioinformatiku, jejímž úkolem je zejména vyvinout počítačové systémy, schopné zpracovat rozměrná data, vygenerovaná proteomickým výzkumem.

Ve výzkumu je však nutné neustále pamatovat na fakt, že proteom buňky, či libovolného organismu, je dynamický systém, reagující na změny ve vnějším prostředí. Zachycuje tak prostředí, v němž se vyskytuje v okamžiku experimentu, či těsně před ním. Jedná se tedy o jistou formu biologické „fotografie“ proteomu buňky v libovolný okamžik.

2.2. Původ proteomiky

Za první proteomické výzkumy je možné považovat představení dvoudimenzionální gelové elektroforézy v roce 1975. Autory prací na toto téma jsou O'Farrell (O'Farrell, P. H., 1975), Klose (Klose, J., 1975) a Scheele (Scheele, G. A., 1975), kteří začali mapovat proteiny z *Escherichia coli*, myši a morčete. Ačkoliv může být odseparována a zviditelněna velká spousta proteinů, tak ne všechny jsme schopni identifikovat.

Zavedení 2-D elektroforézy bylo pro proteomiku velkým přínosem, přesto bylo nezbytné, pro větší rozmach této oblasti, vyčkat na vytvoření dostatečně citlivých metod pro identifikaci separovaných proteinů. Jeden z prvotních problémů tkvěl v nedostatečně citlivé sekvenační metodě. Zlepšení citlivosti bylo esenciální, jelikož jak 1-D, tak i 2-D mají omezenou dávkovací kapacitu proteinů. První ze sekvenčních metod bylo Edmanovo odbourání (Edman, P., 1949). Přelomovým objevem bylo následně vyvinutí mikrosekvenční techniky pro elektroblotované proteiny (Aebersold, R. H., 1987; Aebersold, R. H., 1988, Aebersold, R. H., 1986). Tato technika byla využita k vytvoření prvních 2-D databází (Celis, J. E., 1987) pro proteiny separované 2-D elektroforézou. Zlepšení v mikrosekvenční technice v devadesátých letech vedlo ke zvýšené citlivosti Edmanova odbourání, až na úrovni pikomolů (Aebersold, R. H., 1987).

Nejdůležitějším objevem pro proteomiku však byly technologie hmotnostní spektrometrie (Andersen, J. S., 2000). Z posledních let došlo ke zvýšení citlivosti a přesnosti o několik řádů (Andersen, J. S., 2000, Pandey, A., 2000). V gelech jsme v současné době schopni identifikovat proteiny i ve femtomolární koncentraci. Hmotnostní spektrometrie je schopna tolerovat směsi proteinů i ve větších dávkách, přirozeně tak nahradila Edmanovo odbourání ve volbě sekvenční techniky.

2.3. Genomová informace

Růst proteomiky byl přímým výsledkem pokroku ve velkorozsahovém sekvenování nukleotidů z exprimovaných tagů a genomové DNA. Bez těchto informací by identifikace proteinů nebyla možná ani s použitím MS, jelikož identifikace závisí na přítomnosti nějaké formy databáze pro daný organismus (Pandey, A., 1999; Shevchenko, A., 1996a). Většina sekvenční informace DNA a proteinů byla posbírána za posledních 15 – 20 let (Broder, S., 2000). První kompletní genom byl zesekvenován u viru chřipky (*Haemophilus influenzae* (Fleischmann, R. D., 1995). V roce 2002 byl znám kompletní genetický kód u 54 mikroorganismů (Greves, P. R., 2002) a genomy eukaryot, jako jsou *Arabidopsis thaliana* (Tabata, S., 2000), *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau, A, 1996) a *Drosophila melanogaster* (Adams, M. D., 2000, Meyers, E. W., 2000, Rubin, G. M., 2000).

2.4. Proč proteomika?

Mnoho informací nemůže být získáno čistě ze studia genů. Například za fenotyp buňky jsou zodpovědné proteiny, nikoliv geny. Je nemožné vysvětlit mechanismus onemocnění, stárnutí a efektů vnějšího prostředí jen studiem genomu. Jenom analýzy proteinů a jejich modifikací jsou schopny tyto mechanismy objasnit a zároveň i identifikovat cíl aplikovaného léčiva.

2.4.1. Anotace genomu

Jedna z prvních aplikací proteomiky bude identifikovat konečný počet genů v daném genomu. Tahle funkční anotace je nezbytná, jelikož je stále dosti komplikované přesně předpovědět geny jen z genomických dat (Eisenberg, D., 2000). Jedním problémem je neschopnost bioinformatiky přesně určit exon-intronovou strukturu většiny genů (Dunham, I., 1999). K tomu, aby byla potvrzena existence genu, je nezbytné integrovat genomické informace s proteomickými.

2.4.2. Studie proteinové exprese

V současnosti se staly populárními analýzy mRNA, mezi které řadíme sériovou analýzu genové exprese (SAGE) (Velculescu, V. E., 1995) a DNA microarray technologii (Schena, M., 1995; Shalon, D., 1996). Analýza mRNA však neposkytuje přímý obraz toho, jaký je skutečný proteinový obsah v buňce. Mezi mRNA a úrovní exprese proteinů je skutečně jen špatná korelace (Abbott, A., 1999; Anderson, L., 1997; Gygi, S. P., 1999). Zformování mRNA je pouze prvním krokem v kaskádě dějů vedoucích k syntéze proteinu. V první řadě podléhá mRNA posttranskripční kontrole ve formě alternativního sestřihu, polyadenylaci a editaci (Newman, A., 1998). V tomto kroku může z jednoho genu docházet k vytvoření mnoha proteinových isoform. Následně je mRNA vystavena regulaci na úrovni translace proteinu (Jansen, M., 1995). Vytvořené proteiny jsou poté posttranslačně modifikovány. Předpokládá se, že existuje až 200 různých druhů modifikací (Krishna, R. G., 1993). Proteiny mohou být regulovány také pomocí proteolýzy (Kirschner, M., 1999) a rozčleněním (Colledge, M., 1999). Historický předpoklad „jeden gen, jeden protein“, je v současné době považován za příliš velké

zjednodušení. Odhaduje se, že z jednoho genu vznikají u bakterií jedna nebo dvě formy proteinu, tři formy u kvasinek, u člověka potom tři a více forem (Wilkins, M. R., 1996). Některé tělní tekutiny neobsahují žádný zdroj mRNA, jako například sérum nebo moč, a tedy nemohou být studovány analýzou mRNA.

2.4.3. Proteinová funkce

Pro zhruba jednu třetinu genových sekvencí nelze přiřadit funkci v organismech, jejichž genom byl již sekvenován (Eisenstein, E., 2000). Úplná identifikace proteinů z genomu bude vyžadovat zejména znalost trojrozměrné struktury všech proteinů. Znalost prostorového uspořádání je nezbytná pro odvození funkce proteinů (Burley, S. K., 1999).

2.4.4. Modifikace proteinů

Charakterizace proteinových modifikací je asi nejdůležitější aplikace proteomiky. Posttranslační modifikace proteinů jsou odpovědí na různé intra i extracelulární podněty (Hunter, T., 1995). Například fosforylace proteinu jsou důležité signální mechanismy a dysregulace proteinových kinás nebo fosfatás může vést k onkogenezi (Hunter, T., 1995). Proteomika umožňuje simultánně sledovat změny v modifikacích mnoha exprimovaných proteinů v buňce.

2.4.5. Lokalizace proteinů a jejich začlenění

Lokalizace proteinu je jedním z nejdůležitějších regulačních mechanismů. Chybná lokalizace proteinu má hluboké důsledky na buněčné funkce, např. u cystické fibrózy (Drumm, M. L., 1993). Proteomika se snaží identifikovat subcelulární umístění každého proteinu. Znalosti umístění pomohou vytvořit 3-D proteinovou mapu buňky a přinést novou informaci o proteinové regulaci.

2.4.6. Protein-proteinové interakce

Pro biologii je nezbytně důležitá znalost a pochopení protein-proteinových interakcí. Proces růstu buňky, programovaná buněčná smrt či rozhodnutí projít buněčný cyklus a další buněčné pochody jsou regulovány přenosem signálu přes proteinové komplexy (Pawson, T., 2000). Proteomici se snaží vytvořit trojrozměrnou mapu proteinových interakcí v buňce. U *Helicobacteru pylori* bylo pomocí kvasinkové dvouhybridové metody detekováno na 1200 proteinových spojení, což pokrylo necelých 50 % genomu (Rain, J. C., 2001). Rozsáhlá dvouhybridová analýza byla provedena i u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Uetz, P., 2000).

2.5. Členění proteomiky

2.5.1. Expresní proteomika

Kvantitativně studuje exprese proteinů v různých vzorcích, lišících se mezi sebou ve známém proměnném faktoru. V tomto přístupu je sledován celý nebo jen částečný proteom v porovnání s ostatními vzorky. Získané informace jsou schopné odhalit nové proteiny v přenosu signálů, či identifikovat proteiny specifické pro určité onemocnění (Greves, P. R., 2002)

2.5.2. Strukturní proteomika

Hlavní snahou strukturní proteomiky je identifikovat všechny proteiny v proteinovém komplexu či organele. Určit, kde jsou lokalizovány a popsat všechny protein-proteinové interakce, kterých se účastní. Izolace specifické organely, či proteinového komplexu, může vést k výraznému zjednodušení proteomické analýzy (Jung, E., 2000). Strukturní proteomika by tak mohla přinést informace, které kousek po kousku poskládají celkovou architekturu buněk a objasní, jak exprese určitých proteinů poskytuje buňkám jejich jedinečné vlastnosti.

2.5.3. Funkční proteomika

Jedná se o široký pojem, zahrnující mnoho specifických a cílených proteomických přístupů. Může jít o izolaci specifických proteinů nebo proteinových subsystémů pomocí afinitní chromatografie. Tato skupina je následně dále studována a charakterizována. Tento přístup přináší důležité informace ohledně signalizace, mechanismu vzniku onemocnění, nebo interakcí mezi léčivem a proteinem (Greves, P. R., 2002).

2.6. Proteomické technologie

Nedílným pohonem rozvoje proteomiky jsou pokroky v proteinových technologiích. V době zavedení 2-D elektroforézy, existovalo jen několik proteomických nástrojů. Vývoj do současné doby pokročil, nové techniky byly uvedeny do běžné praxe a zastaralé buď byly vylepšeny, nebo se od nich opustilo. Typický proteomický experiment můžeme rozdělit na tyto dílčí kroky: 1) separace a izolace proteinů z buněčné linie, tkáně či organismu, 2) získání strukturální informace proteinu pro potřeby jeho identifikace a popisu a 3) využití databáze.

2.6.1. Separace a izolace proteinů

Z podstaty proteomiky je zřejmé, že se běžně analyzují proteinové směsi. Je tedy nezbytné zahrnout do přípravy vzorku separační kroky, aby došlo k zobrazení, identifikaci a charakterizaci jednotlivých složek. Dominantní separační metodou v proteomice je elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Tato technika se od svého uvedení do praxe před více jak čtyřiceti lety (Laemmli, U. K., 1970) nesetkala až s takovým rozvojem, přesto však zůstává nejefektivnějším způsobem k separaci proteinů v komplikovaných směsích. Jedinou nevýhodou 1-D i 2-D elektroforézy je zejména velmi komplikovaná automatizace a dlouhá doba nutná pro separaci.

2.6.1.1. Jednorozměrná a dvourozměrná elektroforéza

V jednorozměrné elektroforéze jsou proteiny separovány na základě rozdílné molekulové hmotnosti. Jednorozměrná elektroforéza je jednoduchá, reprodukovatelná a je

schopna separovat proteiny o molekulové hmotnosti přibližně od 5 do 300 *kDa*. Jelikož je její rozlišovací schopnost limitována, je pro separaci komplexních proteinových vzorků, jako je například buněčný lyzát, vhodnější dvourozměrná elektroforéza. Ve 2-D elektroforéze jsou proteiny děleny na základě dvou různých vlastností. V jednom rozměru jsou separovány v gradientu pH na základě isoelektrického bodu a po otočení o 90° jsou separovány v druhém směru na základě molekulové hmotnosti či opačně. Tímto postupem lze docílit rozlišení daleko přesahujícího možnosti jednorozměrné elektroforézy.

Jedna z nejsilnějších stránek 2-D elektroforézy je schopnost rozlišit posttranslačně modifikované proteiny od nemodifikovaných. Posttranslační modifikace je možné rozlišit díky přítomnosti dodatečného náboje v modifikující skupině. Mění se tak celkový náboj proteinu i jeho molekulová hmotnost. Například u fosforylace proteinu, kdy je 2-D elektroforéza schopna rozlišit fosforylovaný od nefosforylovaného proteinu, které se jeví v gelu jako více bodů (Lewis, T. S., 2000).

Primární aplikace 2-D elektroforézy je profilování proteinové exprese, u které umožňuje kvalitativní i kvantitativní srovnání dvou vzorků. Objevení či ztráta spotu poukazuje na změnu v expresi proteinů a intenzita zbarvení spotu nese kvantitativní údaj o míře exprese. Profilování proteinové exprese může být provedeno ve vzorcích z celých organismů, buněčných linií, tkání nebo tělesných tekutin. Technika byla použita na srovnání normální a nezdravé tkáně (Dunn, M. J., 2000), buněk vystavených různým léčivům či stimulům (Heinke, M. Y., 1999; Scheller, C., 1999; Shaw, A. C., 1999).

Dvojměrná elektroforéza je využívána i v mapování buněčného proteomu. Mapování za pomoci 2-D elektroforézy bylo použito u mikroorganismů (Cash, P., 2000; Shevchenko, A., 1996a), buněčných organel (Jung, E., 2000) a proteinových komplexů (Rappsilber, J., 2000). Jelikož je možné na jednom gelu rozlišit tisíce proteinů (Dunn, M. J., 2000; Shevchenko, A., 1996a), jedná se o silný nástroj ke katalogizaci proteinů. Na tomto principu bylo vytvořeno mnoho databází, které jsou dostupné na internetu (Appel, R. D., 1999).

Mezi nejvýznamnější vylepšení patří imobilizované pH gradienty, které výrazně zlepšily reprodukovatelnost 2-D elektroforézy (Bjellqvist, B., 1993) a speciální gradienty vedly k rozlišení více proteinů (Gorg, A., 2000). Fluorescenční barviva umožnila zvýšení citlivosti detekce proteinů (Patton, W. F., 2000). Automatizace se nevyhnula ani elektroforéze a to od průběhu separace, přes analýzu gelu, až po vyřezávání spotů (Traini, M., 1998). Byla vyvinuta

i nová technologie – diferenční gelová elektroforéza (DIGE), která používá fluorescenční značky a dva proteinové vzorky barvené různými barvivy (Unlu, M., 1997). Vzorky jsou současně separovány na jednom gelu a fluorescenční zobrazování gelu zviditelní rozdíly mezi superponovanými proteiny. Barviva reagují s aminem a jsou navrženy tak, aby oba vzorky měly stejnou mobilitu.

Elektroforéza je stále dosti pracovně i časově náročná. Jeden vzorek je analyzován na jednom gelu a samotná separace může zabrat i dva dny. 2-D elektroforéza je limitována jak počtem, tak typem proteinů, které je možné rozlišit. Mnoho velkých nebo hydrofobních proteinů nevstoupí do gelu v prvním směru a extrémně kyselé či alkalické proteiny (s izoelektrickým bodem pod 3, resp. nad 10) v druhém (Gorg, A., 2000). Dalším omezením je neschopnost detekovat málo exprimované proteiny při analýze buněčného lyzátu (Gygi, S. P., 1999; Shevchenko, A., 1996a).

2.6.1.2. Alternativy elektroforézy

Jeden z přístupů, jak obejít omezení elektroforézy, je přeměnit proteinovou směs na peptidy. Nejčastěji se využívá digesce trypsinem a následuje přečištění před analýzou hmotnostní spektrometrií. Více přístupů bylo vyvinuto v purifikaci peptidů, včetně kapalinové chromatografie (Link, A. J., 1999; McCormack, A. L., 1997; Yates III, J. R., 1997), kapilární elektroforézy (Tong, W., 1999) a kombinace technik, jako je multidimenzionální identifikace proteinů (Link, A. J., 1999) nebo kationtově-výměnná chromatografie a chromatografie na reverzní fázi (Opitck, G. J., 1997). Hlavní výhodou je, že v analyzovaném vzorku je zastoupeno více proteinů. Na druhou stranu mohou tyto metody vyžadovat velké množství času a výpočetní techniky na rozluštění naměřených dat.

2.6.2. Stanovení strukturní informace proteinu

2.6.2.1. Edmanovo odbourání

Mikrosekvenování pomocí Edmanova odbourání bylo jednou z nejranějších metod pro identifikaci proteinu na základě sekvence čtené od N-konce. Chemie metody se od jejího představení nezměnila, jenom technologie vedla ke zvýšené citlivosti a snížené náročnosti

metody. V současné době využití této metody upadá, ale některé skupiny se jí ještě věnují, jelikož existovala před zavedením hmotnostní spektrometrie. Edmanovo odbourání zůstává prospěšnou metodou pro sekvenování abundantních proteinů, pokud hmotnostní spektrometrie není dostupná, nebo je plně využita pro analýzu málo exprimovaných proteinů. Používá se také pro stanovení skutečného začátku N-konce proteinu.

Metoda byla poprvé představena Pehrem Edmanem v roce 1949 (Edman, P., 1949). V současnosti je nejčastěji využívána k sekvenování proteinů přenesených na membránu. Vytvoření membrán kompatibilních s chemikáliemi, používanými při Edmanově odbourání, umožnilo použít metodu i na proteiny po separaci SDS-PAGE (Vandekerckhove, J., 1985). Jelikož bylo náročné říct, jestli je protein na N-konci modifikován, a tedy blokován pro odbourání, byla metoda modifikována přidáním štěpného kroku. V tomto kroku je protein rozštěpen na peptidy působením bromkyanu (CNBr) nebo skatolu a vzniklé peptidy jsou současně sekvenovány (Damer, C. K., 1998; Greves, P. R., 2002).

Postup analýzy proteinu přes směs štěpných produktů Edmanova odbourání lze ve stručnosti popsat následovně. Komplexní proteinová směs je separována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v jedno či dvourozměrném provedení a následně jsou proteiny elektroblotovány na membránu. Proteiny, o něž máme zájem, jsou zviditelněny, vyřezány a vystaveny působení chemického štěpení. Při použití bromkyanu dochází ke štěpení na methioninu, při použití skatolu na tryptofanu, čímž vznikají dlouhé peptidy. Jejich počet závisí na četnosti výskytu dané aminokyseliny, nejčastěji vznikají 3 až 5 peptidů. Membránový výřez je umístěn do automatického Edmanova sekvenátoru. Během čtyř až osmi hodin proběhne 6 až 12 cyklů a získaná data jsou prohledána za pomoci speciálních algoritmů. Metoda je při použití automatického sekvenátoru a při minimální manipulaci se vzorkem dostatečně citlivá i na úrovni 0,1 – 1 *pmol*.

2.6.2.2. Hmotnostní spektrometrie

Viz Kapitola 3.

2.7. Proteomika v České republice

Proteomika jakožto velmi významný vědní obor počátku 21. století se rozvíjí i v rámci České republiky. Mezi nejvýznamnější proteomická pracoviště patří Společná proteomová laboratoř ústavů Akademie věd České republiky. Společná laboratoř v sobě zahrnuje několik ústavů: Mikrobiologický ústav (bakteriální proteomika), Ústav fyziologie a genetiky živočichů (proteomika kmenových buněk a zrajícího vajíčka savců), Ústav experimentální medicíny (proteiny buněčného jádra). Dále se proteomikou zabývá i Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky a společnost Immunotech, a.s. Proteomika je atraktivní i pro univerzity, jelikož rostlinnou proteomikou se zabývá Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně a zdárně se rozvíjí na univerzitách v Praze a Olomouci (Kovarova, H., 2005)

V rámci České republiky byla již v roce 2003 ustavena Proteomická sekce v České společnosti pro biochemii a molekulární biologii. První česká proteomická konference se konala o rok později (Kovarova, H., 2005).

3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie umožňuje získat informaci o molekulové hmotnosti peptidu nebo sekvenci aminokyselin. Těchto informací může být následně využito při vyhledání proteinu v databázi a jeho identifikaci. Hmotnostní spektrometrie může detekovat jak místo, tak i typ modifikace proteinu. Sběr informací o proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie lze rozdělit do tří kroků – příprava vzorku, ionizace a hmotnostní analýza.

3.1. Příprava vzorku

Směs proteinů je běžně rozdělena pomocí elektroforézy. Nejčastěji následuje extrakce proteinu či jeho peptidů z gelu, přečištění vzorku a analýza hmotnostní spektrometrií. Extrakce celého proteinu z gelu je neefektivní, jednodušší je extrahovat peptidy, proto se volí cesta štěpení proteinu proteázou v gelu. Postupy pro digesci proteinů v gelu (Shevchenko, A., 1996b) jsou běžně v proteomické praxi využívány jak v 1-D, tak i 2-D gelech (Rosenfeld, J., 1992). Digescce v gelu poskytuje lepší návratnost vzorku než jiné metody např. elektroblotting (Courchesne, P. L., 1997). Samozřejmostí je i větší informační přínos z peptidů nežli ze samotného proteinu jako celku. Po extrakci peptidů je před analýzou nutné ze vzorku odstranit kontaminanty z gelu interferující s MS analýzou, mezi něž patří zejména soli, pufrů a detergentů (Yates III, J. R., 1998). Velmi často je potřebné i zakoncentrování peptidů. Možností purifikace a frakcionace peptidové směsi je v současnosti celá řada – ZipTips (Millipore), Poros R2 Perfusion materiál (PerSeptive Biosystems) (Trauger, S. A., 2002; Shevchenko, A., 1996b) apod.

3.2. Ionizace vzorku

Molekuly pro analýzu biologických vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie musí být nabitě a „suché“. Toho dosahujeme jejich přeměnou na desolvatované ionty. V proteomické praxi se uplatňují nejvíce dvě ionizační techniky – ionizace elektrosprejem (ESI) a desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (MALDI). Obě metody převádí peptidy na ionty odebráním či přidáním jednoho nebo více protonů. Zároveň spadají mezi jemné ionizační

techniky, které umožňují zformování iontů bez významných ztrát integrity analytu. Umožňují tedy získat informace o peptidech resp. proteinu v nativním podobě.

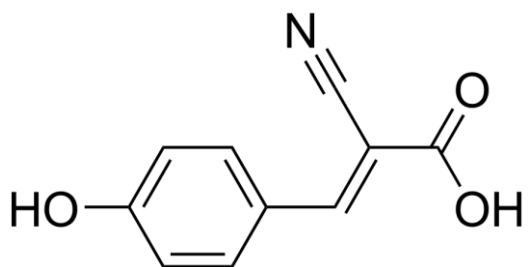
3.2.1. Ionizace elektrosprejem

Kapalný vzorek vytéká z kapiláry do vstupu hmotnostního spektrometru, kde se nachází potenciálový rozdíl, lokalizovaný mezi kapilárou a vstupem přístroje. Tento potenciálový skok vytváří jemný sprej nabitých kapek (Fenn, J. B., 1989; Yates III, J. R., 1998). Z kapek se postupně odpařuje rozpouštědlo a velikost kapek se postupně zmenšuje, dokud se nevytvoří desolvatované ionty (Fenn, J. B., 1989). Výrazného zlepšení bylo dosaženo zavedením nanoelektrospreje, u něhož se průměr sprejovací kapiláry pohybuje okolo 1 až 2 μm a průtoky se mohou pohybovat kolem pěti až deseti nl/min (Wilm, M., 1996). Nízké průtoky zredukovaly spotřebu vzorku a zvýšily dobu potřebnou pro analýzu (Shevchenko, A., 1996b). Vzorek lze do ESI zdroje dodávat přímo přes mikrokapiláru nebo přes výstup kapalinového chromatografu.

3.2.2. Ionizace laserem za účasti matrice

Molekuly analytu jsou inkorporovány mezi molekuly matrice a následně jsou ostřelovány laserem, který vyvolává tvorbu molekulárních iontů (Karas, M., 1988). Matricí je obecně malá molekula, schopná absorbovat energii, jako například 2,5-dihydroxybenzoová kyselina nebo α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (obr. 5). Vzorek se spolu s matricí spotuje na kovovou destičku a volně se z něj nechá odpařit rozpouštědlo. Dojde tak ke vzniku krystalů. Destička o různých formátech např. 96ti spotová, je vložena do přístroje a ten následně může automaticky mířit laser do určených míst na destičce. Nanášení vzorku na destičku může být provedeno roboticky, včetně samotné analýzy, celý proces lze tedy jednoduše automatizovat. Výhodou MALDI je i kompatibilita s běžnými kontaminanty z elektroforetické separace (Qin, J., 1997).

Obr. 5: Strukturální vzorec α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny



3.3. Hmotnostní analyzátory

Po přeměně proteinů či peptidů na molekulární ionty následuje hmotnostní analýza. Ta probíhá ve vakuu v hmotnostním analyzátoru, který rozlišuje molekulární ionty na základě velikosti jejich náboje a hmotnosti.

3.3.1. Kvadrupólový hmotnostní analyzátor

Kvadrupól je jedním z nejběžnějších hmotnostních analyzátorů. Ionty jsou v něm přenášeny skrz elektrické pole vyvolané čtveřicí paralelních kovových tyčí – kvadrupólem (Yates III, J. R., 1998). Kvadrupól může propouštět všechny ionty nebo se může chovat jako hmotnostní filtr a propouštět pouze ionty se specifickým poměrem hmotnost k náboji (m/z). Pokud je použito více kvadrupólů v řadě, mohou být použity k získání informace o aminokyselinové sekvenci peptidu. (Burlingame, A. L., 1998; Yates III, J. R., 1998).

3.3.2. Analyzátor doby letu

Analyzátory doby letu (TOF, z angl.. Time-of-Flight) jsou jedny z nejjednodušších hmotnostních analyzátorů. Měří m/z iontů z doby, kterou potřebují na přelet celé délky průletové trubice. Některé TOF analyzátory se skládají i z iontového zrcadla, umístěného na konci průletové trubice, které odráží ionty zpět průletovou trubicí na detektor. Použití zrcadla prodlužuje délku dráhy a koriguje malé energetické rozdíly mezi ionty (Yates III, J. R., 1998). Oba faktory vedou ke zvýšení rozlišovací schopnosti analyzátoru.

3.3.3. Iontová past

Past slouží k zachycení molekulárních iontů v trojrozměrném elektrickém poli. Hlavní výhodou iontové pasti, oproti kvadrupólu, je schopnost nahromadit ionty. Poté je selektivně vypudit, což má za následek vyšší citlivost (Yates III, J. R., 1998).

3.4. Typy hmotnostních spektrometrů

Většina hmotnostních spektrometrů se skládá ze čtyř základních prvků: iontový zdroj, iontová optika, hmotnostní analyzátor a detektor. Názvy různých přístrojů jsou odvozeny od zdroje a hmotnostního analyzátoru. V současné době jsou komerčně dostupné i hybridní přístroje, kombinující různé iontové zdroje s hmotnostními analyzátory. Analýza proteinů pomocí MS se dá všeobecně rozdělit do dvou skupin: hmotnostní analýza peptidů a aminokyselinové sekvenování. V první skupině, jinak nazývané jako fingerprinting, jsou změřeny hmoty jednotlivých peptidů ze směsi a následně použity k vytvoření hmotnostního spektra. Pro sekvenování se využívá tandemové hmotnostní spektrometrie neboli MS/MS, v níž je specificky izolovaný peptid na základě m/z fragmentován na menší peptidy. Fragmenty jsou poté použity k odvození aminokyselinové sekvence.

3.4.1. Trojitý kvadrupól

Běžně se trojitě kvadrupóly používají k získání aminokyselinové sekvence a v kvantifikačních analýzách. V první fázi analýzy, tzv. full scanu, jsou všechny ionty nad určitou hodnotou m/z transmitovány do posledního kvadrupólu, kde dojde k hmotnostní analýze (Jonscher, K. R., 1997; Yates III, J. R., 1996). V druhé fázi pracuje hmotnostní spektrometr v MS/MS módu. V prvním kvadrupólu je izolován peptid o specifickém m/z , který je vpuštěn do kolizní cely. V kolizní cele dochází ke kolizi s inertním plynem, kdy vznikají fragmenty. Vzniklá série fragmentů se mezi sebou liší o jednu aminokyselinu. Proces je znám jako kolizí indukovaná disociace (CID). Fragmenty jsou následně ve třetím kvadrupólu analyzovány. Ve finále obdržíme dvě hmotnostní spektra – odtud MS/MS či MS² (Hunt, D. F., 1986).

3.4.2. MALDI-TOF

Hlavní aplikací je peptidový fingerprinting. Díky možné automatizaci je vhodný pro širokoškálovou proteomiku (Ekstrom, S., 2000). Díky rychlosti analýzy bývá často volen pro prvotní identifikační analýzu proteinů. Pokud nedojde k identifikování fingerprintem, pak následuje analýza ESI-MS/MS. MALDI-TOF je schopno odhalit i aminokyselinovou sekvenci díky rozpadu za zdrojem (post-source decay) (Spengler, B., 1992). Oproti trojitému kvadrupólu je tato fragmentace méně spolehlivá, protože je málo předvídatelná (Kaufmann, R., 1996).

3.4.3. Kvadrupól-TOF

Tento přístroj kombinuje první dva kvadrupóly, tj. kvadrupól (Q) a kolizní celu (q), z trojitého kvadrupólu. Poslední třetí kvadrupól je nahrazen analyzátozem doby letu (Sevchenko, A., 1997). Mezi hlavní aplikace QqTOF patří identifikace proteinů na základě sekvence aminokyselin a popis proteinových modifikací. Používaným zdrojem je zde elektrosprej.

3.4.4. MALDI-QqTOF

Tato kombinace byla vyvinuta, aby peptidový fingerprinting a aminokyselinové sekvenování mohlo být prováděno na jednom přístroji (Shevchenko, A., 2000). Fragmentační spektra, naměřena tímto přístrojem, jsou hůře interpretovatelná než z ESI-QqTOF (Greves, P. R., 2002).

3.4.5. FT-ICR

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací je iontová past, která je schopna dosáhnout velmi vysokého rozlišení a přesnosti. V porovnání s ostatními hmotnostními spektrometry dosahuje v těchto směrech nejlepších výsledků (Amster, J., 1996). Lze zkombinovat jak s ESI, tak i MALDI. Díky vysoké rozlišovací schopnosti může být použit na analýzu komplexních vzorků. Ve spojení s ESI se využívá pro studium proteinových interakcí a konformací nebo pro mnoho dalších účelů.

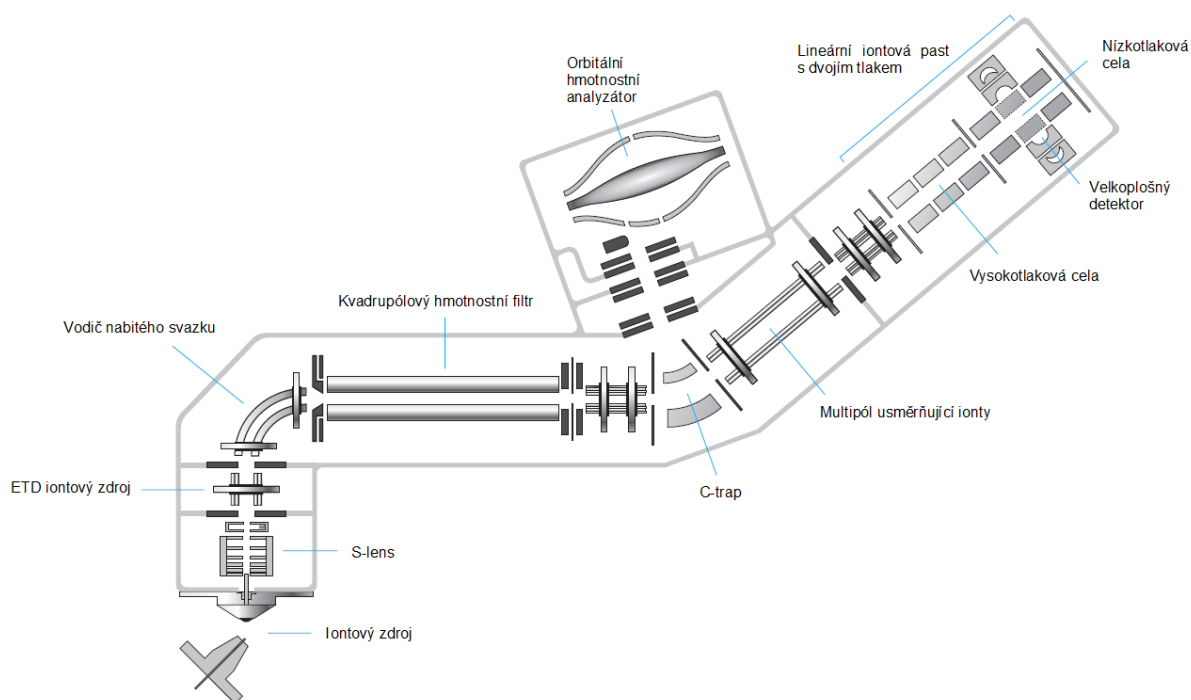
3.4.6. LTQ-Orbitrap

Orbitrap byl vynalezen v roce 1999 Makarovem (Makarov, A., 2000) a o 6 let později byl označen za nástroj pro proteomický výzkum (Hu, Q., 2005). V této iontové pasti ionty konají orbitální pohyb, krouží kolem centrální elektrody a zároveň harmonicky oscilují mezi krajními polohami. Frekvence tohoto oscilačního pohybu je charakteristická pro jejich hodnotu m/z . Získaný záznam je následně převeden Fourierovou transformací na běžné časově závislé hmotnostní spektrum. LTQ-Orbitrap v sobě zahrnuje lineární iontovou past a orbitrap spojený s C-trapem.

3.4.7. Orbitrap Fusion™ Tribid™

Hmotnostní spektrometr, uvedený v roce 2013 na trh firmou Thermo-Scientific, kombinuje výkonný kvadrupól, orbitrap a dvojitou lineární past, uspořádané v Tribid™ architektuře (obr. 6). Všechny analyzátoři mohou pracovat sériově či paralelně. Přístroj umožňuje využít tři fragmentační techniky – CID, HCD a ETD. Fluoranthen, nosič z ETD techniky, může být využit k interní kalibraci, neboť je neustále v přístroji uvolňován.

Obr. 6: Schéma uspořádání jednotlivých prvků v hmotnostním spektrometru Orbitrap Fusion (Thermo Scientific)



3.5. Fragmentace peptidů

3.5.1. Kolizí indukovaná disociace (CID)

CID je jednou z nejpoužívanějších fragmentačních technik pro proteiny a peptidy. Je založena na srážce mezi vybraným biomolekulárním iontem a neutrálním atomem, či molekulou. K fragmentaci dochází, pokud energie srážky je dostatečně velká, aby došlo k přenosu části relativní kinetické energie na vibrační energii biomolekulárního iontu. K disociaci dochází při překročení aktivační bariéry, odkud pochází označení CID jako kolizí aktivované disociace (CAD). Míra fragmentace závisí na kolizní energii, sekvenci peptidu a náboji peptidu. Pro vybraný peptid o určitém fixním náboji je hodnota kolizní energie klíčovým faktorem pro fragmentaci. V kvadrupólech a lineárních iontových pastech se hodnota kinetické energie pohybuje obvykle pod hodnotou 100 eV (Chen, C. H., 2008). Pro nízkoenergetickou CID jsou charakteristické ionty *b* a *y* série (obr. 6). Kolizní cela je naplněna kolizním plynem, kterým je nejčastěji vzácný plyn (He, Ar) nebo dusík (N₂) (Gross, J. H., 2011).

3.5.2. Disociace vyšší energií v C-trapu (HCD)

Neformálně je někdy označovaná jako CID s vyšší energií. Navzdory názvu často pracuje v režimu nízkoenergetické CID (Murray, K. K., 2013). Jedná se o techniku specifickou pro přístroje s orbitrapem. Fragmentace však probíhá v přídavném oktapólu, tzv. HCD cele (Gross, J. H., 2011). Vzniklé fragmenty se poté vrací do C-trapu a odtud jsou vypuzeny do orbitrapu. Radiofrekvenční napětí je běžně nastaveno na vyšší hodnotu než 1500 V a to až k hodně 2500 V (Olsen, J. V., 2007). Kolizním plynem je dusík o tlaku $1,3 \cdot 10^{-3}$ mbar (Gross, J. H., 2011).

3.5.3. Disociace zachycením elektronu (ECD)

Jako první tuto techniku představil McLafferty v roce 1998 (Zubarev, R. A., 1998). Zahrnuje rekombinaci nízkoenergetického elektronu z elektronového děla s násobně nabitým biomolekulárním iontem v FT-ICR (Chen, C. H., 2008). Elektron-peptidová rekombinace je

exotermní proces a způsobí fragmentaci peptidového řetězce. Přesný mechanismus dosud není dostatečně znám. Fragmentace neovlivňuje posttranslační modifikace a na rozdíl od CID, resp. HCD techniky nedochází ke vzniku fragmentů *b* a *y*, ale *c* a *z* (obr. 6).

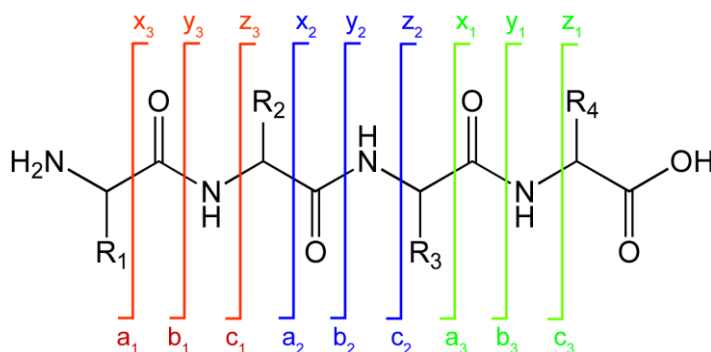
3.5.4. Disociace transferem elektronu (ETD)

Poprvé byla tato fragmentační technika představena v roce 2004. Snahou bylo využít výhody ECD k fragmentaci peptidového řetězce bez nutnosti termálních elektronů. Aniont s nízkou elektronovou aktivitou, jako je flouranthen, přenáší elektron na peptidový iont. Tento elektronový transfer by měl být exotermní s energií okolo 5 eV, aby byla zahájena fragmentace. Stejně jako ECD nechává posttranslační modifikace nedotknuté a vede k vytvoření *c* a *z* iontů (obr. 6).

3.5.5. Multifotonová disociace infračerveným zářením (IRMPD)

Intenzivně byla IRMPD studována od sedmdesátých let do skoro devadesátých let minulého století. Až v roce 1994 McLafferty ukázal, že IRMPD může být použita pro fragmentaci peptidů a k získání aminokyselinové sekvence (Little, D. P., 1994). Proteiny okolo 30 kDa byly úspěšně fragmentovány a dokonce vzniklé ionty byly stabilnější a selektivnější než získané z CID. Využívá CO₂ laser, který produkuje záření s vlnovou délkou 10,6 μm (2,83·10¹³ Hz) a energií 25 – 40 W. Energie jednoho fotonu je 0,116 eV (Gross, J. H., 2011). Vznikající fragmenty jsou *b* a *y* ionty (obr. 7) (Crowe, M. C., 2004).

Obr. 7: Schématické zobrazení fragmentace peptidů zachycující vznik jednotlivých sérií iontů (Roepstorff, P., 1984)



3.6. Využití databází

Databáze umožňují použít informace získané z Edmanova odbourání či MS k identifikaci proteinu. Účelem vyhledávání přes databáze je rychlé a přesné identifikování velkého množství proteinů. Úspěch procesu závisí na kvalitě změřených dat v hmotnostním spektrometru, úrovni samotné databáze a vyhledávací metodě.

3.6.1. Databázové vyhledání pro peptidový fingerprinting

Jedna z identifikačních metod je peptidový fingerprinting, kdy jsou změřeny hmoty peptidů po digesci neznámého proteinu proteásou. Hmoty jsou následně srovnány s hmotami z teoretické digesce proteinů v databázi. Pokud dojde k překrytí dostatečného počtu změřených hmot s teoretickými, může dojít k identifikaci proteinu. Výhodou tohoto přístupu je zejména jeho rychlost a možnost automatizace.

Jedinou a asi největší nevýhodou peptidového fingerprintingu je dvojznačnost identifikace, která je způsobena redundancí peptidových hmot. Příkladem mohou být krátké peptidy. Peptidy tvořené pěti aminokyselinami mají stejnou hmotu, i když pořadí těchto pěti aminokyselin je v každém jiné (VGEEK, AEGVK, EGAVK,...). Pro zajištění úspěšné identifikace je nutné změřit delší peptidy, které jsou schopny poskytnout dostatečnou specifičnost vyhledání. Redundance hmot se vyskytuje s větší frekvencí při vyhledání proti větším genomům, u nichž nejsou dosud identifikovány všechny exprimované proteiny. Nejefektivnější je fingerprinting při použití databází z malých organismů s malým, plně sekvenovaným a dobře anotovaným genomem (Qin, J., 1997).

Významným aspektem je i přesnost měření (Clayton, K. R., 1999). Pro správnou identifikaci potřebujeme přesně změřené hmoty více peptidů. Existují faktory, které fingerprinting negativně ovlivní i v případě měření na dostatečně přesném přístroji. Takovým faktorem jsou posttranslační modifikace. Pokud je neznámý protein ve značné míře modifikovaný, změřené hmoty peptidů nebudou odpovídat hmotám z teoretické digesce nemodifikovaného proteinu.

Problémem do jisté doby byly i jednoduché směsi dvou či tří proteinů, jelikož po digesci se peptidové spektrum výrazně zkomplikovalo. Existuje několik vyhledávacích metod, jak

zpracovat i takové výsledky. Jedním z nich je program ProFound, který umožňuje identifikaci proteinů z jednoduché směsi (Zhang, W., 2000). Dalšími jsou například PepSea (Mann, M., 1993), MS-Fit (Clauser, K. R., 1999), MOWSE (Pappin, D. D. J., 1993) a PeptIdent/MultiIdent (Wilkins M., R., 1999).

3.6.2. Databázové vyhledání pro sekvenování aminokyselin

Nejspecifičtějším typem databázového vyhledávání proteinů je použití sekvence aminokyselin peptidu. Pokud určíme sekvenci aminokyselin určitého peptidu, můžeme následně určit, z kterého proteinu pochází. Jednou z takových metod je peptidové tag vyhledávání (angl. tag – štítek, visačka). Částečná aminokyselinová sekvence je určena z MS/MS spektra (sekvenční tag). Tato informace se spojí s hmotou peptidu a hmotami okolních peptidů s neznámou sekvencí, s použitou proteásou a provede se databázové srovnání. Tag vyhledávání je specifičtější identifikační nástroj než fingerprinting (Mann, M., 1994; Wilm, M., 1996).

3.6.3. Vyhledávání neinterpretovaných MS/MS dat

V současné době je dostupných více programů (tab. 2) pro identifikaci proteinů s využitím neinterpretovaných MS/MS dat. Jedná se o programy jako Mascot a SEQUEST (Fenyo, D., 2000). Přístup se v základě setkává se stejnými problémy a omezeními jako peptidový fingerprinting. Vývoj vyhledávacích algoritmů, které jsou rezistentní k chybám, umožňuje přidělit identifikovanému proteinu určité statistické skóre.

Tab. 2: Nástroje pro vyhledávání v databázích (Lin, D., 2003).

Nástroje pro srovnání s databází na základě mapování hmot	
Mascot	http://www.matrixscience.com
MS-Fit	http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm
ProFound	http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe
Nástroje pro srovnání s databází na základě hmotnostního spektra	
Mascot	http://www.matrixscience.com
MS-Tag	http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm
SEQUEST	http://www.fields.scripps.edu/quest

3.7. Přístupy k proteomickému studiu

3.7.1. Bottom-up proteomika

Bottom-up přístup identifikuje proteiny ze směsi peptidů po digesci intaktních proteinů (Lin, D., 2003). Využívá zejména tandemovou hmotnostní spektrometrii. Peptidová směs je rozdělena kapalinovou chromatografií. Hmotnostní spektrometr dokáže izolovat jednotlivé peptidy a fragmentovat je. Fragmentační spektrum může být využito k databázovému vyhledání.

3.7.2. Top-down proteomika

Tato strategie začíná intaktním proteinem a jeho štěpením v plynné fázi. Protein je fragmentován uvnitř hmotnostního spektrometru. Nejvhodnější jsou hmotnostní spektrometry s Fourierovou transformací v kombinaci s ionizací elektrosprejem (Lin, D., 2003). Výhodou je zejména jejich velká rozlišovací schopnost. Fragmenty vzniklé v přístroji jsou analyzovány, čímž získáme informaci o sekvenci. Vhodná fragmentační technika nám může zároveň poskytnout i informaci o posttranslačních modifikacích. Přesné přístroje jsou schopné detekovat vedle modifikací i sekvenční chyby (Lin, D., 2003).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

1. Popis metod

1.1. Biologický materiál

Pro účely praktické části diplomové práce byly Ústavem molekulární a translační medicíny poskytnuty 4 buněčné linie: CCRF-CEM, SNU-1, NCI-H358 a Calu-1. Všechny tyto buněčné linie obsahují mutovanou formu K-ras proteinu. Jedná se o bodovou mutaci na dvanácté aminokyselině, tj. glycin je zaměněn za jinou aminokyselinu. V případě CCRF-CEM a SNU-1 jde o mutaci G12D, NCI-H358 a Calu-1 mutaci G12C. Kultivace buněk probíhala v CO₂ inkubátorech (HeraCell 150i, Thermo Scientific, USA) v 5 % CO₂ atmosféře při 37 °C. Výživa byla zajištěna příslušnými médii s hovězím fetálním sérem. Pasážování probíhalo podle potřeby 2 – 3x týdně. Po dosažení dostatečné populace buněk byly alikvoty buněčné suspenze o určitém počtu buněk (25 či 50 milionů) vystaveny působení RIPA lyzačního pufru. V připraveném proteinovém lyzátu byla spektrofotometricky stanovena koncentrace totálního proteinu metodou s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Měření absorbance byla provedena na přístroji Multi Plate Reader EnSpire[®] (Perkin Elmer, USA). Koncentrace totálního proteinu takto připravených lyzátů se pohybuje v rozsahu 2 – 7 mg/ml podle typu linie a počtu buněk. Krátkodobě byly lyzáty uskladněny při -12 °C, dlouhodobě při teplotě -80 °C.

Médium po inkubaci buněčné linie bylo sebráno pouze u linie CCRF-CEM. Po centrifugaci flakonů s buněčnou suspenzí těsně před lyzací buněk nebylo médium vylito do odpadu, ale přelito do nového flakonu. Sebrané médium bylo uskladněno při teplotě -12 °C.

1.1.1. CCRF-CEM

Linie lidské akutní lymfoblastické leukemie odvozená z krve čtyřleté dívky kavkazské rasy. Kultura je suspenzní. Doporučené inkubační médium je RPMI 1640 s 2 mM glutaminem a 10 – 20 % fetálním hovězím sérem. Pasážování se doporučuje při dosažení koncentrace 1 – 2 miliony buněk na mililitr. Nese K-ras mutaci se záměnou glycinu za asparagovou kyselinu.

1.1.2. SNU-1

Tyto buňky jsou jednou z linií rakoviny žaludku. Linie byla vytvořena ze žaludečního karcinomu 44letého asijského muže v roce 1984. Jednalo se o slabě diferenciováný primární karcinom, odebraný před cytotoxickou léčbou. Buňky jsou suspenzní. Doporučené inkubační médium je RPMI 1640 s 2 *mM* glutaminem, 10 *mM* HEPES, 1 *mM* pyruvát sodný a 10% fetálním hovězím sérem. Doba zdvojení je 26 hodin. V linii je exprimován K-ras protein s glycinem nahrazeným za asparagovou kyselinu.

1.1.3. NCI-H358

NCI-H358 byly izolovány v roce 1981 z primárního bronchoalveolárního karcinomu plic z pacienta mužského pohlaví kavkazské rasy, vyoperovaného před zahájením léčby. Jedná se o nemalobuněčný karcinom plic s přítomností granulí typických pro Klarovy buňky – buňky průdušinek, produkující povrchově aktivní látky, které brání kolapsu průdušinek. V RPMI 1640 médiu dochází ke zdvojení po 38 hodinách. Buňky jsou adherentní. Doporučené inkubační médium je RPMI 1640 s 2 *mM* glutamanem a 5 – 10 % fetálním hovězím sérem. K-ras protein má místo glycinu cystein.

1.1.4. Calu-1

Buněčná linie byla vytvořena z epidermoidního karcinomu plic ve třetím stádiu z 47letého pacienta mužského pohlaví a kavkazské rasy. Buňky obsahují mikroklky a jejich drsné endoplasmatické retikulum je relativně nápadné. Dále obsahují lysosomy a neobsahují virové částice. Buňky jsou adherentní. ATCC doporučuje McCoyovo 5A medium s 1,5 *mM* glutaminem a 10 % fetálním hovězím sérem. Bodová mutace K-rasu je v Calu-1 buňkách ve formě záměny glycinu za cystein.

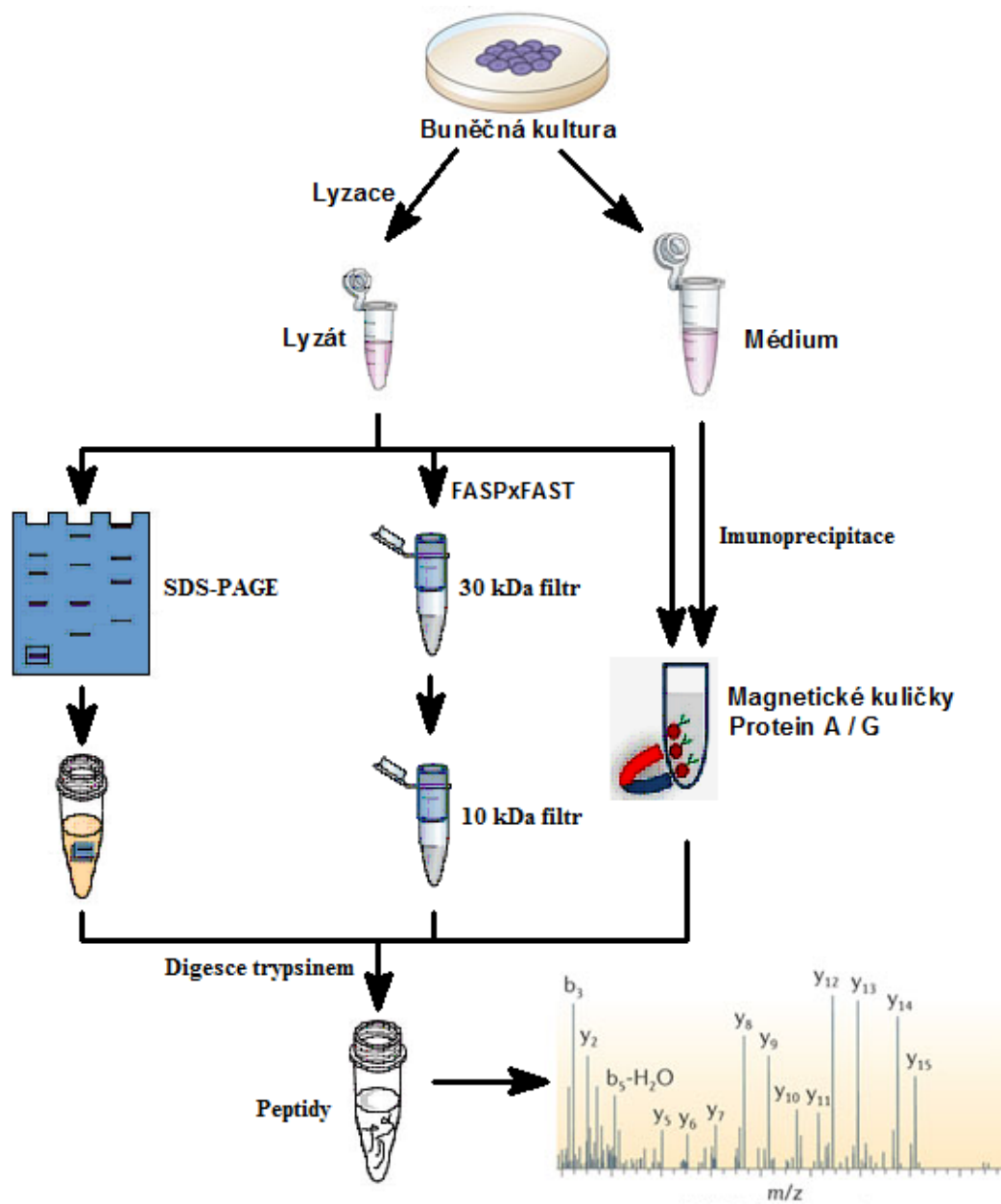
1.2. Metody izolace K-ras proteinu / Příprava vzorků

Z možných metod k izolaci K-ras proteinu z buněčného lyzátu byly vybrány následující metody. Izolace K-ras proteinu využitím SDS-PAGE metody se dá v rámci proteomiky označit za klasický přístup. Pracovní postup metody byl inspirován Halvey, P. J, 2012. Komerčně dostupné anti-Ras protilátky umožňují využít k izolaci K-ras proteinu imunoprecipitaci. Z možných přístupů byla vybrána imunoprecipitace na magnetických kuličkách s imobilizovaným proteinem, na něž se nejprve naváže protilátka. Publikovaná metoda využívá magnetické kuličky s imobilizovaným proteinem G (Wang, Q., 2010). V rámci experimentální části byl protokol přizpůsoben s ohledem na použití magnetických kuliček s imobilizovaným proteinem A. Imunoprecipitační metoda je současně nejvhodnější metodou pro izolaci K-ras proteinu z tekutých vzorků o velkém objemu a nízké koncentraci tohoto proteinu, např. médium po inkubaci buněk resp. krevní plasma. Pro izolaci K-ras proteinu byla navržena i metoda využívající filtraci lyzátu přes membránový filtr, zachycující proteiny od určité molekulové hmoty. Zvolena byla filtrace přes 30 *kDa* membránový filtr s následným zachycením prošlých proteinů, včetně K-rasu, na 10 *kDa* membránovém filtru. Metody jsou schematicky zachyceny na obr. 8.

Vzorky po aplikaci některé z vybraných metod pro izolaci byly následně podrobeny digesci trypsinem. Samotné digesci předcházela redukční krok, kdy cysteiny spojené disulfidickým můstkem reagují s dithiothreitem. Zredukované cysteiny byly karbamidometylovány reakcí s jodacetamidem, aby se zabránilo jejich opětovnému spojení můstkem. Inkubace s trypsinem probíhala v alkalickém prostředí při teplotě 37 °C přes noc.

Purifikační krok následoval po trypsinaci na odstranění gelových kontaminantů po izolaci SDS-PAGE metodou či solí a dalších kontaminantů u ostatních digestů. Purifikace byla provedena na kolonce MacroTRAP. Od eluovaných peptidů bylo odpařeno rozpouštědlo ve vakuové odparce. Peptidy byly resuspendovány v 5% acetonitrilu s 0,1% mravenčí kyseliny a spikovány značenými syntetickými peptidy. Každý vzorek byl spikován značeným nemutovaným peptidem (WT*) a odpovídajícím značeným mutovaným peptidem (G12D* nebo G13D*) tak, aby při nástřiku byl obsah značeného peptidu 5 *fmol*.

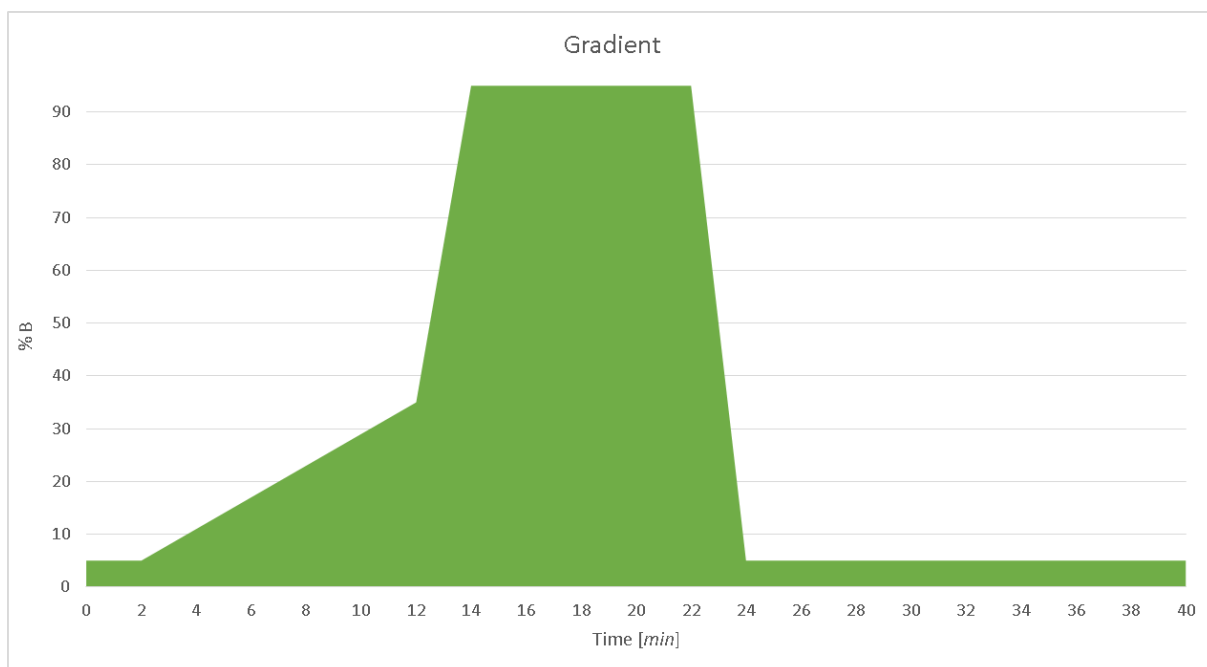
Obr. 8: Schéma metod praktické části diplomové práce



1.3. LC/MS analýza

Všechna měření probíhala na kapalinovém chromatografu Dionex Ultimate 3000 Series (Thermo Scientific, USA) spojeným s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer (Thermo Scientific, USA). Využita byla kolona EASY-Spray column Pep/Map® C18 ($3\ \mu\text{m}$, $120\ \text{Å}$, $75\ \mu\text{m} \times 15\ \text{cm}$; Thermo Scientific, USA; obr. 10) vyhřívána na $35\ \text{°C}$. Kolona má již zabudovanou sprejovací kapiláru a používá se v kombinaci s nanoelektrosprejovým zdrojem EASY-Spray nano-electrospray ion source (Thermo Scientific, USA; obr. 9), jehož design umožňuje připojení EASY-Spray kolon a mikrokamery pro sledování sprejování. Nástřikový objem byl $2\ \mu\text{l}$, pokud není uvedeno jinak. Mobilní fáze A byla tvořena vodou s $0,1\ \%$ kyselinou mravenčí a mobilní fáze B $80\ \%$ acetonitrilem s $0,1\ \%$ kyselinou mravenčí. Peptidy byly mobilní fází A o průtoku $5\ \mu\text{l}/\text{min}$ nejprve zachycovány na trap koloně Acclaim PepMap100 (C18, $5\ \mu\text{m}$, $100\ \text{Å}$, $300\ \mu\text{m} \times 5\ \text{mm}$; Thermo Scientific, USA) po dobu $2\ \text{min}$. Po uplynutí této doby došlo k přepnutí ventilu a zachycené peptidy byly eluovány do kolony. Separace byla gradientová (graf 1) s průtokem mobilní fáze $0,300\ \mu\text{l}/\text{min}$. Celková doba analýzy byla 40 minut.

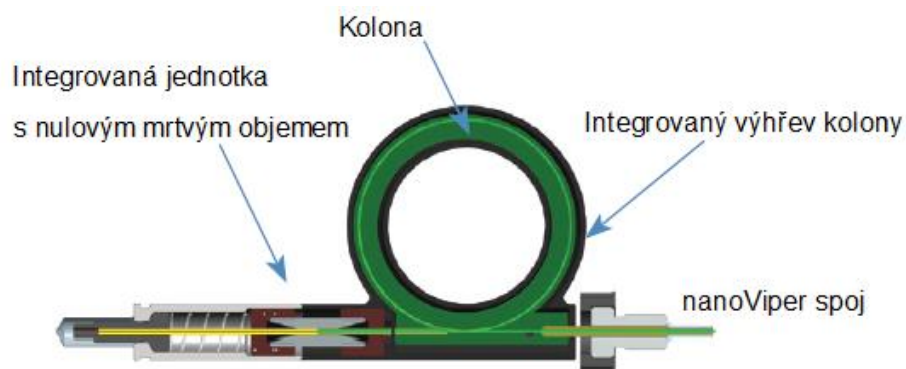
Graf 1: Schéma gradientové eluce



Obr. 9: EASY-Spray nano-electrospray iontový zdroj s vloženou EASY-Spray kolonou (Kioyonami, R., 2012)



Obr. 10: Průřez EASY-Spray kolonou s popisem částí (Kioyonami, R., 2012)



2. Výsledky a vyhodnocení

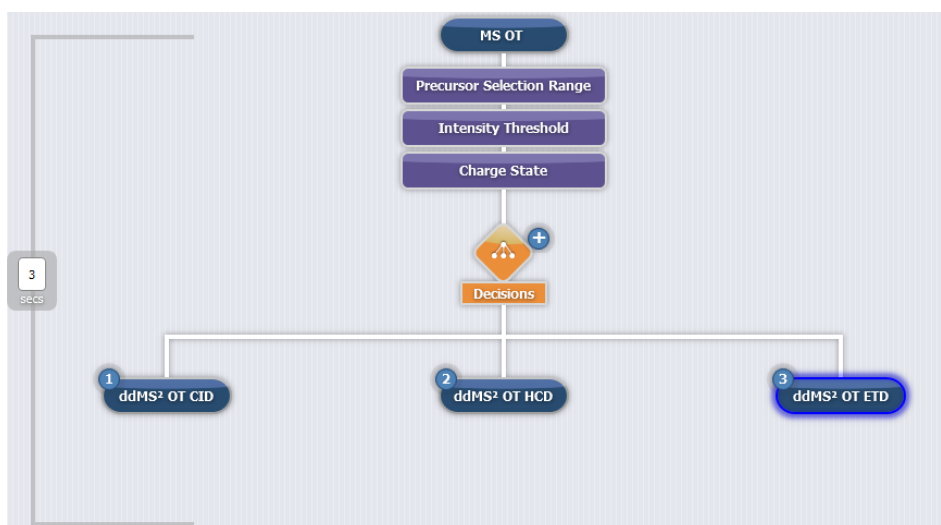
2.1. Optimalizace

2.1.1. Tvorba MS metody

Vzorky, tvořené vždy jedním syntetickým peptidem o koncentraci 1 *fmol/μl*, byly analyzovány po separaci kapalinovou chromatografií v hmotnostním spektrometru. Syntetické peptidy odpovídaly K-ras proteinu s mutací na pozici 12 (6 peptidů) a 13 (1 peptid), které byly neznačené. Peptid odpovídající nemutované (angl. wild-type, zkráceně WT) formě o sekvenci L*VVVGAGGVGK (*tučně označená pozice 12 K-ras proteinu*) byl k dispozici pouze značený a to leucinem s těžkými atomy uhlíku ¹³C a dusíku ¹⁵N (*v sekvenci peptidu označen kurzívou a hvězdičkou*). Molekulová hmotnost tohoto peptidu je tedy posunuta o +7 Da.

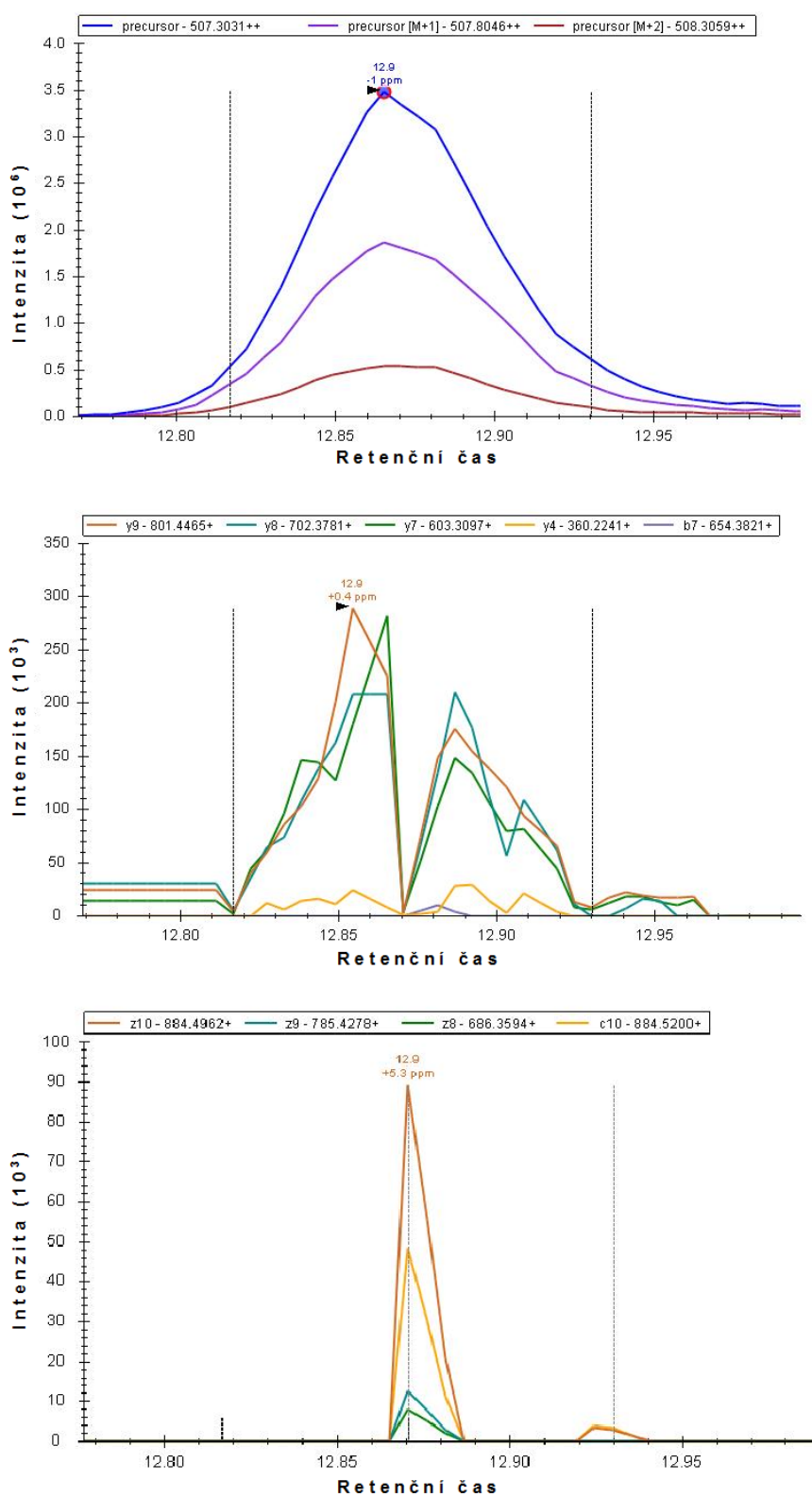
Použitá měřící metoda zahrnovala tři fragmentační techniky – CID, HCD, ETD. Měření probíhalo v pozitivním módu. Fragmentace všemi technikami probíhala v TopSpeed režimu, kdy byly fragmentovány ionty, které byly zachyceny v pasti do naplnění její kapacity, v rozsahu 250 – 1000 *m/z*. Měření fragmentačních spekter probíhalo vždy tak, aby se za dobu maximálně 3 vteřin změřil 1x full scan a všechna tři fragmentační spektra (obr. 11). Hmotnostní analýza probíhala ve všech případech v orbitrapu. Rozlišení full scanu bylo 60000 a v případě fragmentačních spekter 15000. Stejným způsobem proběhla i analýza vzorku směsi tvořené všemi syntetickými peptidy o koncentraci 1 *fmol/μl*. Vzorky byly připraveny v 5% acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí.

Obr. 11: Workflow MS metody se všemi fragmentačními metodami

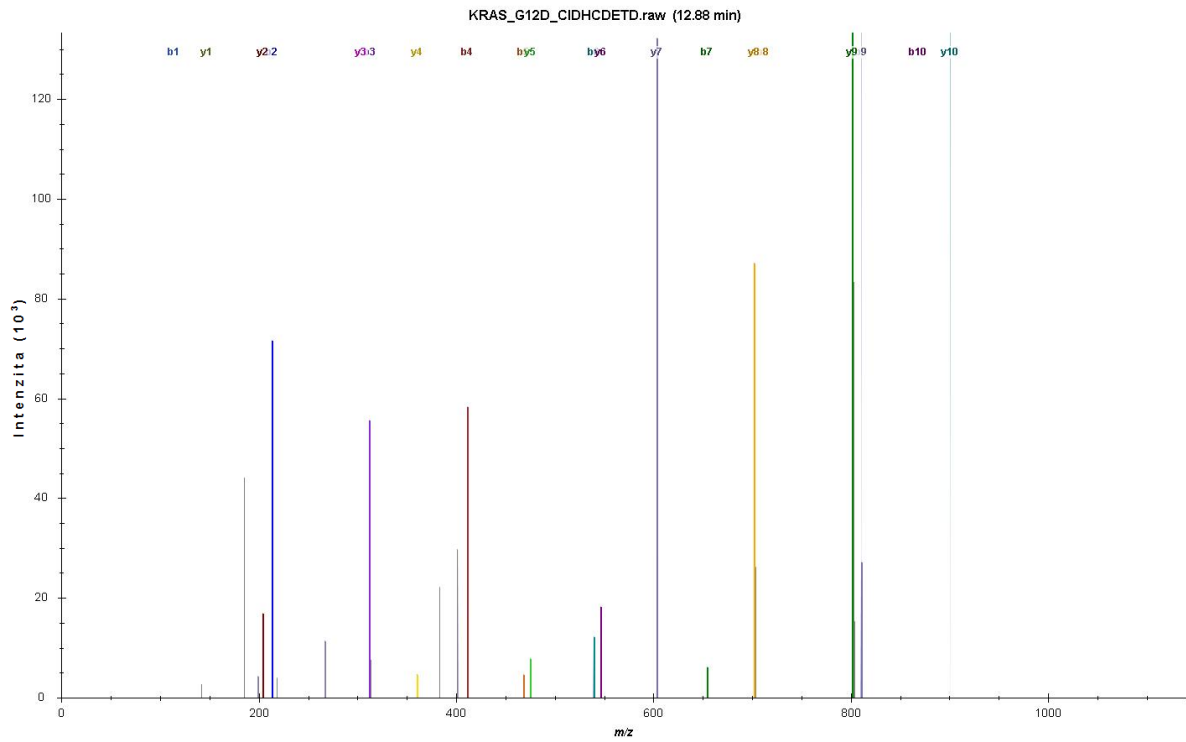


Vykreslené píky tvarově odpovídají průběhu iontových stop v čase pro dvojnásobně nabitě prekurzory jednotlivých peptidů a jejich jednonásobně nabitě fragmenty. Na obr. 12 jsou vykresleny záznamy pro peptid G12D, kdy iontový proud fragmentů série *b* a *y* skokově klesá při měření fragmentů po ETD fragmentaci. Pokles je způsoben tím, že ETD fragmentace vede ke vzniku iontů *c* a *z* série. Obrázky 13, 14 a 15 zachycují tři po sobě jdoucí fragmentační spektra. Je z nich zřejmé, že nejvhodnější fragmentační techniky pro fragmentaci zvolených peptidů v pozitivním módu jsou CID a HCD. ETD fragmentace v pozitivním módu vedla k velmi slabé či žádné fragmentaci, jelikož předáním elektronu došlo pouze ke snížení náboje prekurzorového iontu.

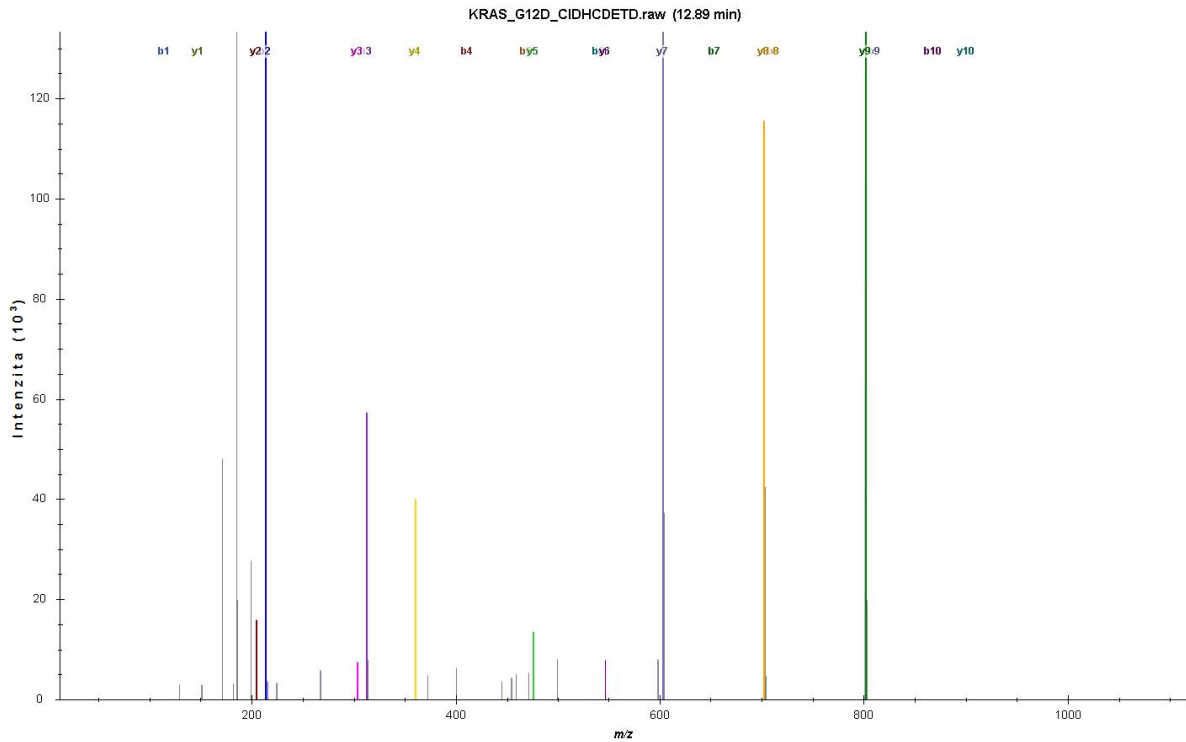
Obr. 12: Vykreslené píky dvojnásobně nabitého prekurzoru peptidu G12D (*nahoře*) a jeho vybraných fragmentů změřených metodou se CID a HCD (*uprostřed*), resp. ETD fragmentací (*dole*).



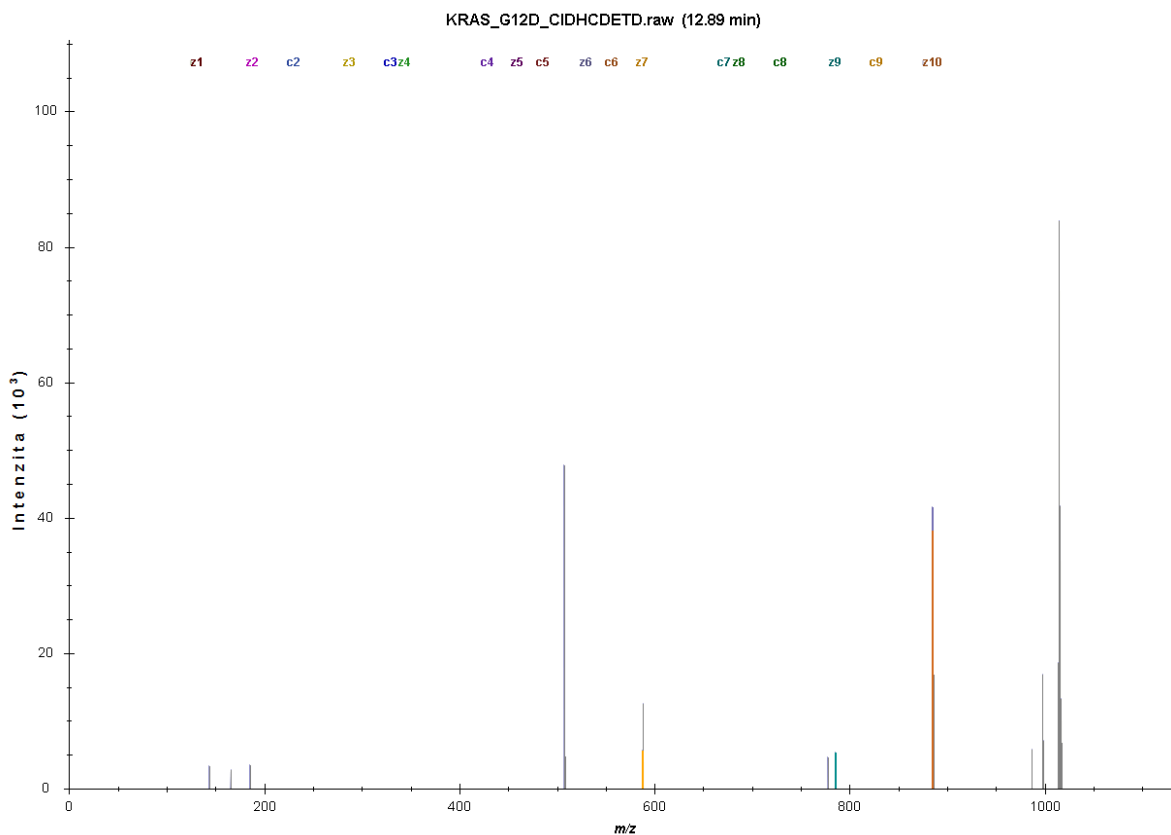
Obr. 13: Fragmentační spektrum peptidu G12D v retenčním čase 12,88 min, CID fragmentace



Obr. 14: Fragmentační spektrum peptidu G12D v retenčním čase 12,89 min, HCD fragmentace



Obr. 15: Fragmentační spektrum peptidu G12D v retenčním čase 12,89 min, ETD fragmentace



Pouze v případě peptidů s mutací G12D a G13D nastává problém. Oba peptidy jsou isobary a lze je od sebe odlišit pouze na základě fragmentačního spektra. Jelikož jsou jejich sekvence velmi podobné (LVVVGADGVDK, resp. LVVVGAGDVDK), tak jedině přítomnost fragmentů y_4 a b_7 umožní jejich rozlišení (tab. 3). Tyto fragmenty jsou tedy sekvenčně unikátní pro tyto dva peptidy.

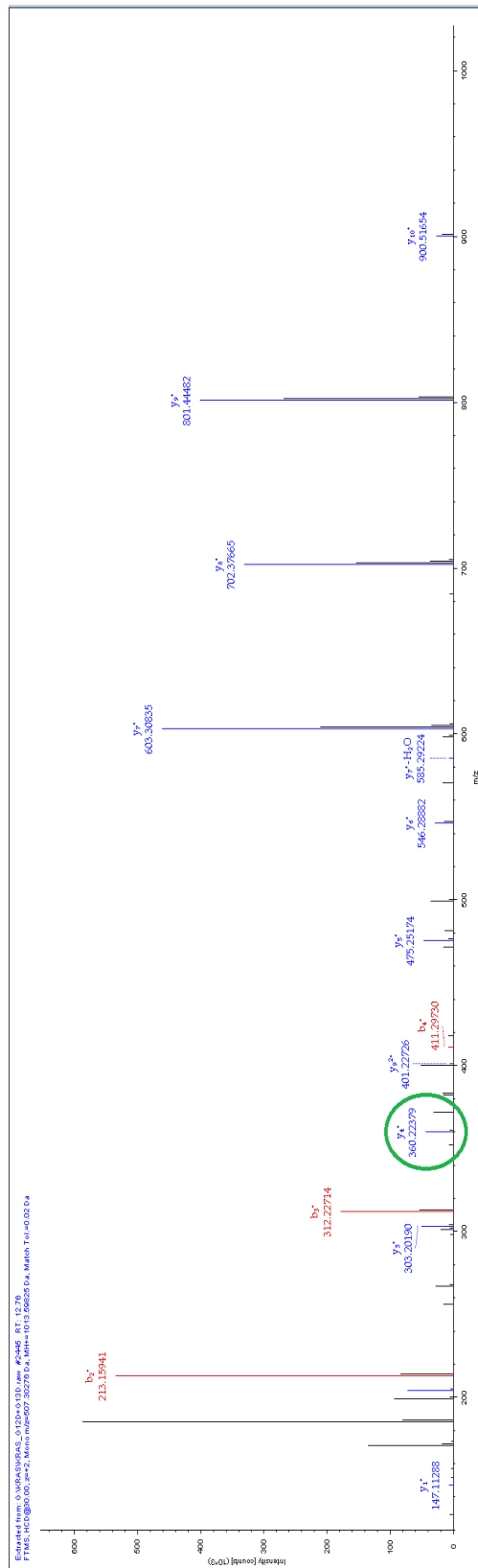
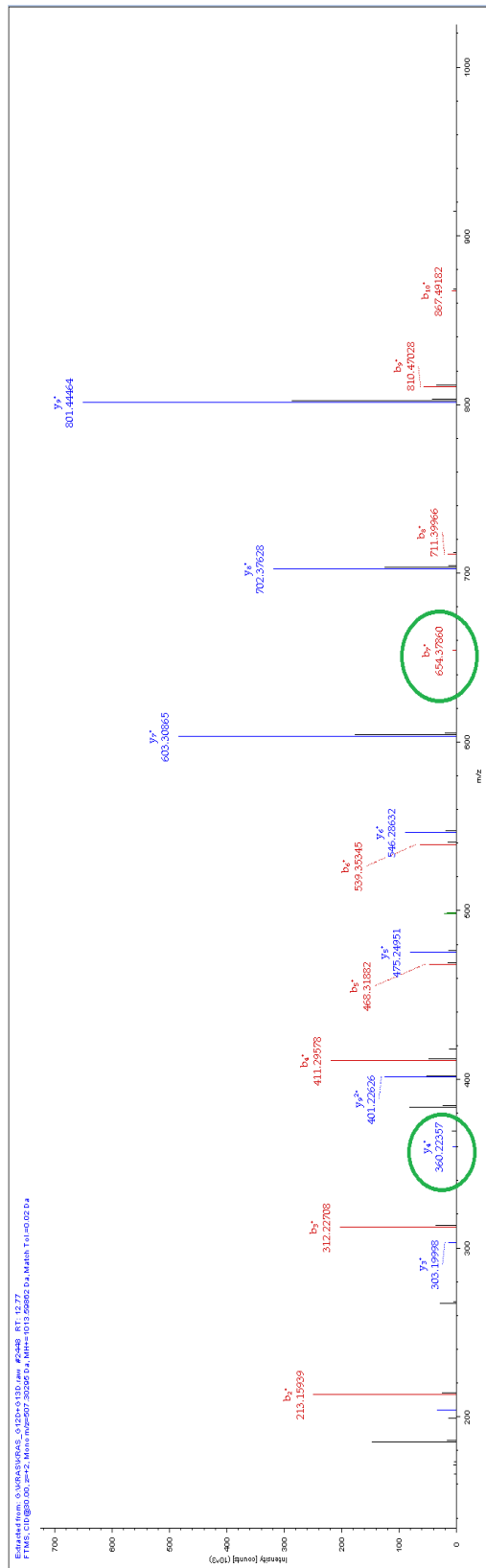
Byly vytvořeny dvě MS metody, které se od sebe lišily pouze v typu fragmentace, tj. CID a HCD. Jednalo se o cílené MS² metody (tzv. tMS² z angl. targeted) se zadanými hodnotami m/z pro izolování prekurzorů. Účelem těchto metod bylo vybrat mezi fragmentačními technikami tu, která povede ke vzniku sekvenčně unikátních fragmentů u peptidů G12D a G13D. Pro CID byla kolizní energie nastavena na hodnotu 30 % a HCD na hodnotu 27 %.

Tab. 3: Fragmenty peptidů G12D a G13D s hodnotami m/z , sekvenčně specifické fragmenty jsou označeny.

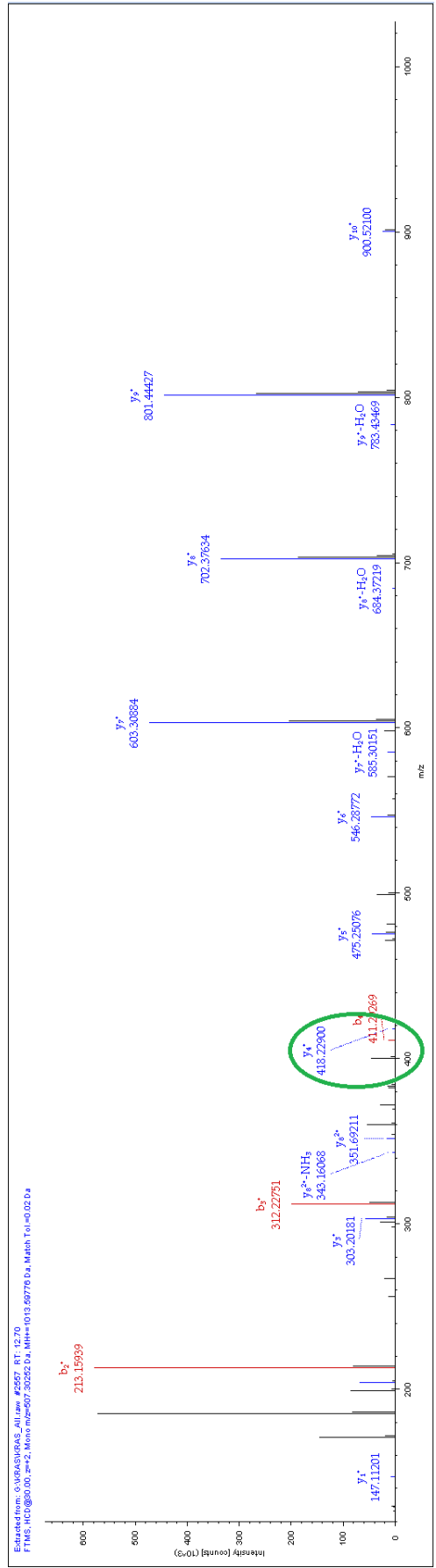
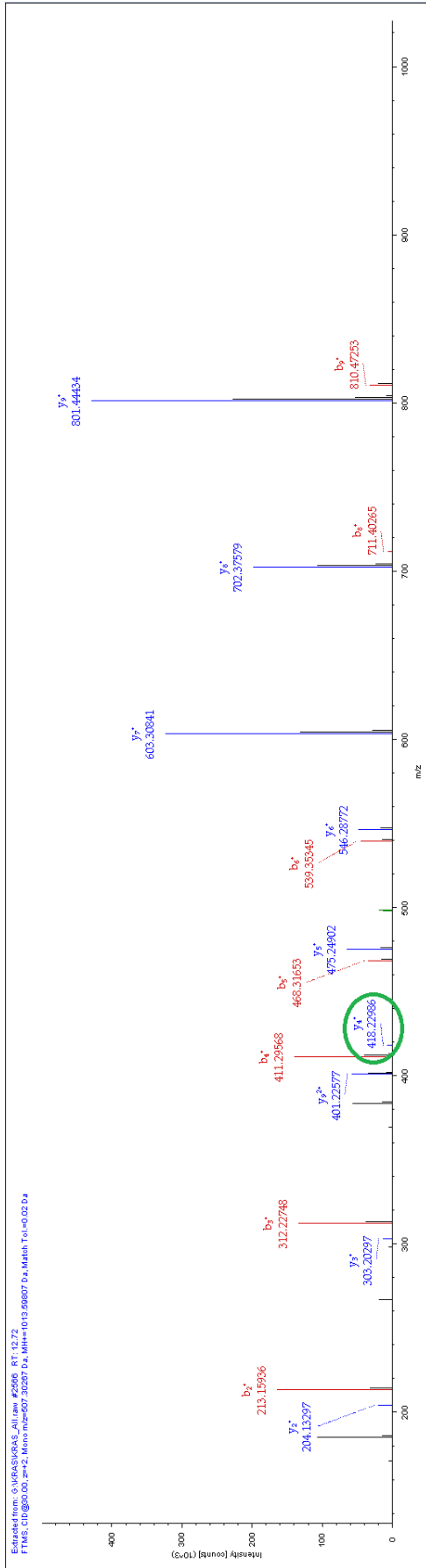
Prekurzor m/z					507,3031				
Náboj prekurzoru					2				
Prekurzor $M+H$					1013,5990				
G12D					G13D				
m/z	b	aminokyselina	y	m/z	m/z	b	aminokyselina	y	m/z
114,09	1	L	-	-	114,09	1	L	-	-
213,16	2	V	10	900,51	213,16	2	V	10	900,51
312,23	3	V	9	801,45	312,23	3	V	9	801,45
411,30	4	V	8	702,38	411,30	4	V	8	702,38
466,32	5	G	7	603,31	466,32	5	G	7	603,31
539,36	6	A	6	546,29	539,36	6	A	6	546,29
654,38	7	D	5	475,25	596,38	7	G	5	475,25
711,40	8	G	4	360,22	711,40	8	D	4	418,23
810,47	9	V	3	303,20	810,47	9	V	3	303,20
867,49	10	G	2	204,13	867,49	10	G	2	204,13
-	-	K	1	147,11	-	-	K	1	147,11

Fragmentační spektra obou peptidů (obr. 16 a 17) poskytla sekvenčně unikátní fragment y_4 , který byl u peptidu G12D intenzivnější, zejména při HCD fragmentaci. CID fragmentace u peptidu G12D vedla k získání fragmentu b_7 , ale jenom v případě peptidu G12D. Ačkoliv HCD poskytuje vyšší signál y_4 fragmentu peptidu G12D, tak měřitelnost obou fragmentů je rozhodující pro výběr fragmentační techniky, kterou je CID.

Obr. 16: Fragmentační spektrum peptidu G12D pořízené technikou CID (nahore) a HCD (dole); (fragment y_4 , b_7 označeny zeleně)



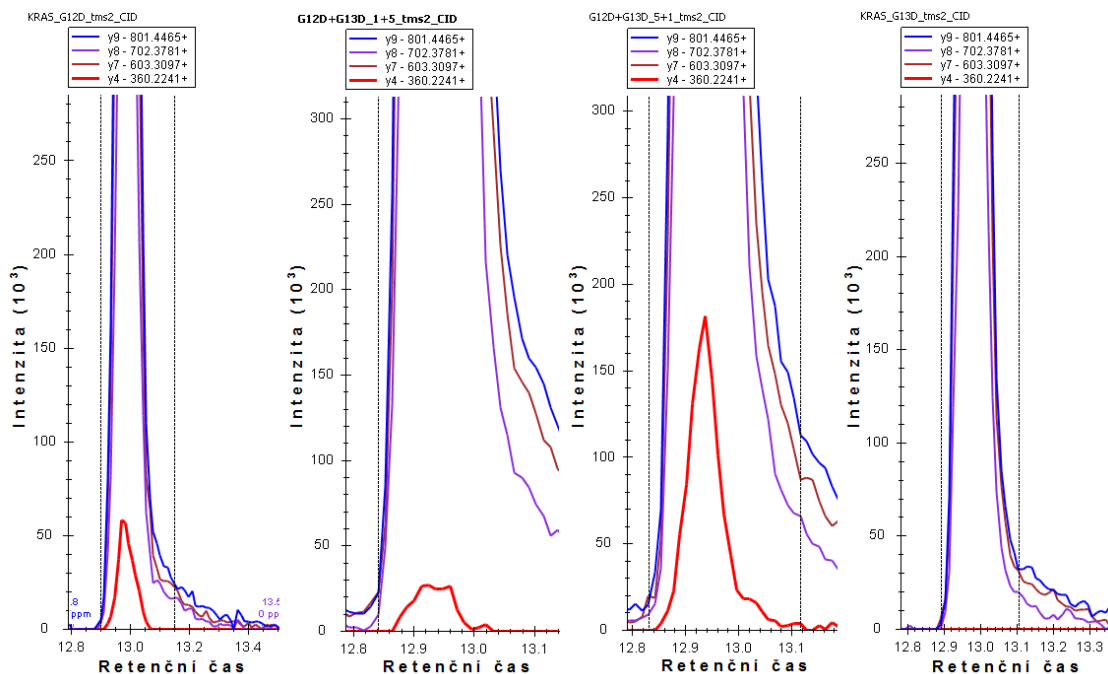
Obr. 17: Fragmentační spektrum peptidu G13D pořízené technikou CID (nahore) a HCD (dole); (fragment y_4 označen zeleně)



Byly připraveny dva vzorky obsahující peptidy G12D a G13D v poměru 1:5 a 5:1, aby byla odzkoušena schopnost fragmentačních technik rozlišit tyto dva peptidy. Vzorky byly změřeny metodou se CID i HCD fragmentací, aby mohlo dojít k jejich srovnání. Pro srovnání byly použity i vzorky obsahující vždy pouze jeden z peptidů.

Na obr. 18 je vidět srovnání signálů fragmentu y_4 z peptidu G12D v jednotlivých vzorcích po CID fragmentaci. Signál u vzorku s 5x vyšším obsahem peptidu G12D vykazuje odpovídající zvýšení signálu (přibližně 5x). Mezi vzorkem obsahujícím pouze peptid G12D a vzorkem v poměru 1:5 je zřetelný silnější signál u vzorku, kde je pouze G12D. Snížený signál fragmentu y_4 u vzorku s oběma peptidy je pravděpodobně způsoben nižším počtem iontů peptidu G12D, které zaplňují iontovou past, jelikož ji v tomto případě sdílí s ionty peptidu G13D. Jakožto izobary jsou izolovány v pasti současně. Signál by měl být tedy přibližně šestinový oproti vzorku jen se samostatným peptidem. Tato skutečnost byla experimentálně změřena, jak ukazuje obr. 18.

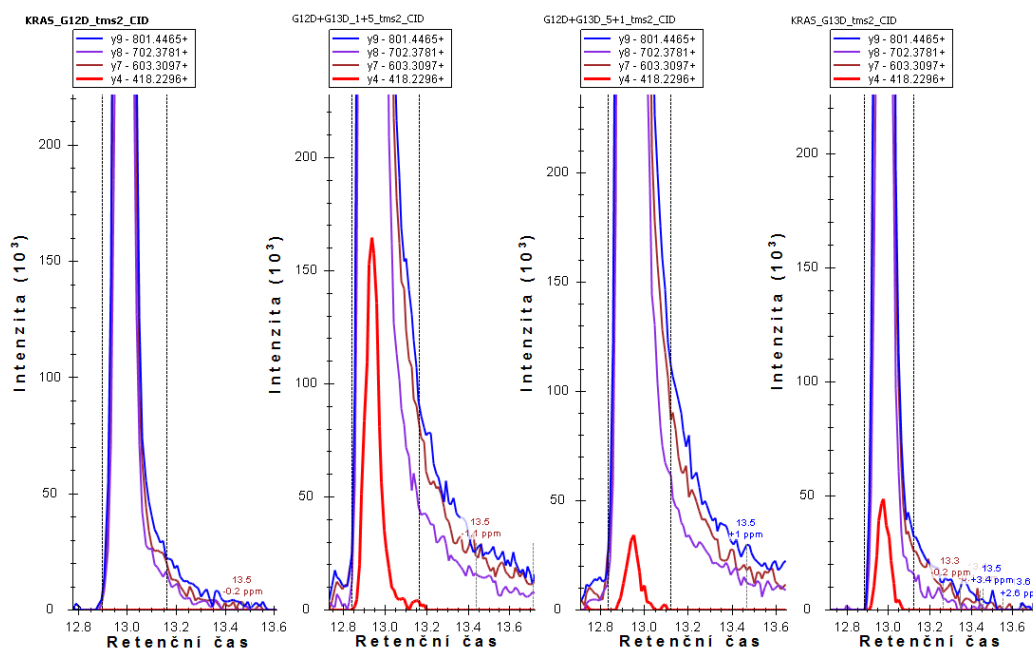
Obr. 18: Chromatogramy fragmentu y_4 (červeně) peptidu G12D v různých vzorcích po CID fragmentaci



(Zleva: G12D samostatně; peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1; G13D samostatně)

Situace u fragmentu y_4 peptidu G13D po CID fragmentaci je obdobná (obr. 19), s tím rozdílem, že změřené signály nedosahovaly až takové shody s teoretickými předpoklady uvedenými v předchozím odstavci, jako tomu bylo v případě peptidu G12D. Přehozené pořadí glycinu a asparagové kyseliny vede k odlišnému chování peptidu G13D při fragmentaci, což lze vysledovat i v odlišných intenzitách jednotlivých fragmentů ve spektrech (obr. 16 *nahoře* a 17 *nahoře*).

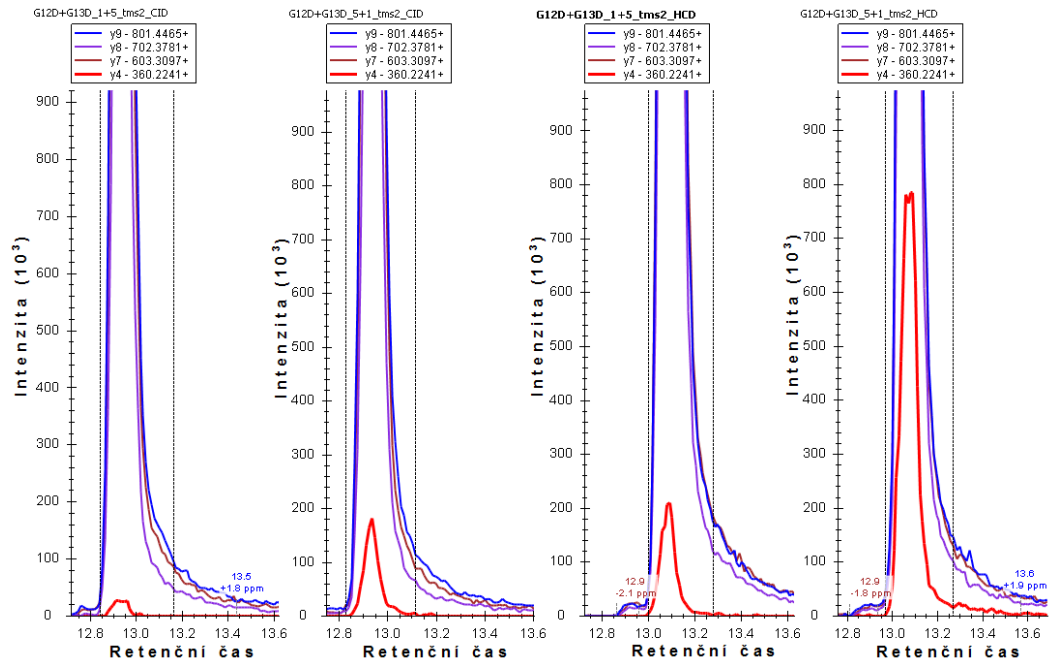
Obr. 19: Chromatogramy fragmentu y_4 (červeně) peptidu G13D v různých vzorcích po CID fragmentaci



(Zleva: G12D samostatně; peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1; G13D samostatně)

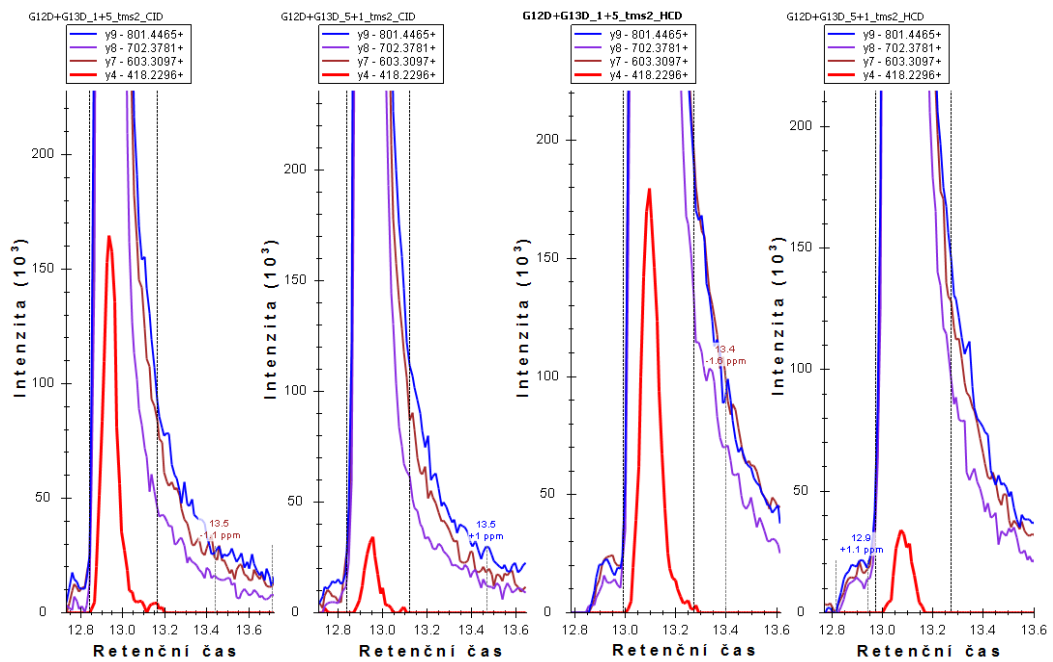
HCD fragmentace vede ke zvýšené intenzitě signálu y_4 z G12D (obr. 20), ale u fragmentu y_4 z peptidu G13D k tak výrazné změně intenzity nevede (obr. 21). Zásadní rozdíl ale nastává u CID fragmentace. CID umožňuje detekovat druhý sekvenčně unikátní fragment b_7 , který umožňuje druhotné rozlišení peptidů. Tento fragment je detekovatelný u peptidu G12D (obr. 22) i G13D (obr. 23). Detekce obou fragmentů pomocí CID zároveň vynahrazuje nižší signál y_4 iontu oproti HCD technice. Identifikace a rozlišení obou peptidů na základě dvou fragmentů je spolehlivější, než při použití jen jednoho ač intenzivnějšího.

Obr. 20: Chromatogramy fragmentu y_4 (červeně) peptidu G12D po CID a HCD fragmentací



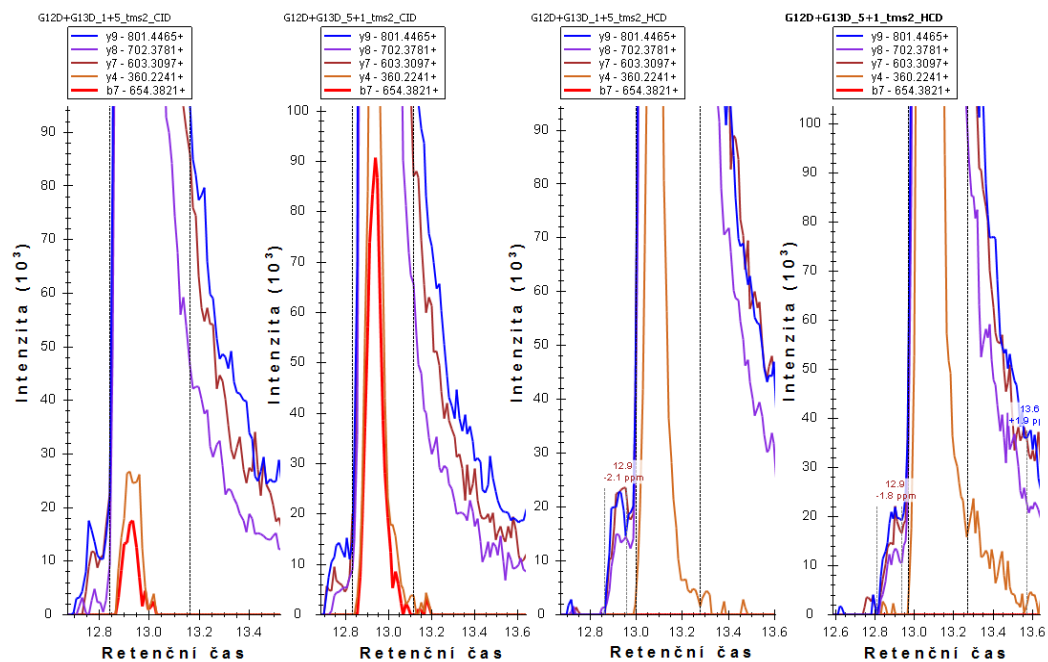
(Zleva: CID: peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1; HCD: peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1)

Obr. 21: Chromatogramy fragmentu y_4 (červeně) peptidu G13D po CID a HCD fragmentací



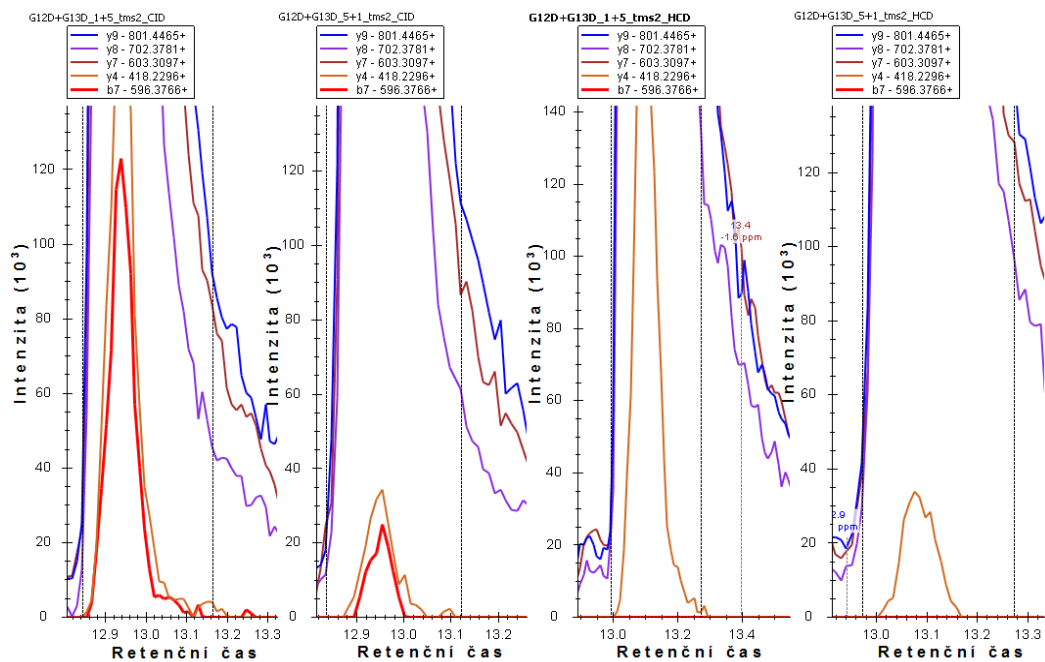
(Zleva: CID: peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1, HCD: peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1)

Obr. 22: Chromatogramy fragmentu b_7 (červeně) peptidu G12D po CID a HCD fragmentací



(Zleva: CID: peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1, HCD: peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1)

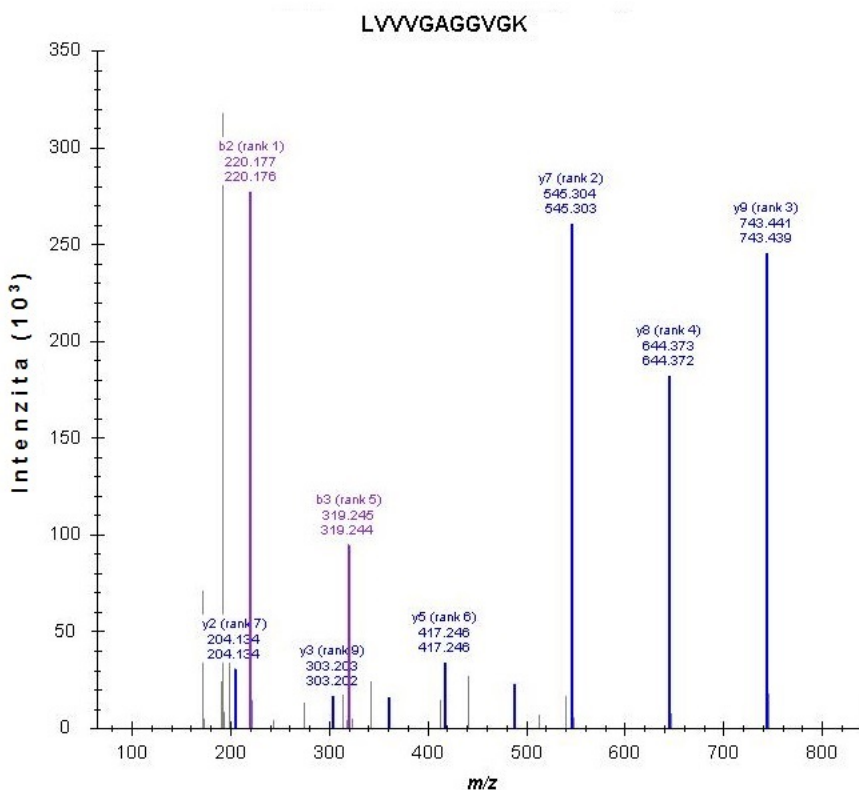
Obr. 23: Chromatogramy fragmentu b_7 (červeně) peptidu G13D po CID a HCD fragmentací



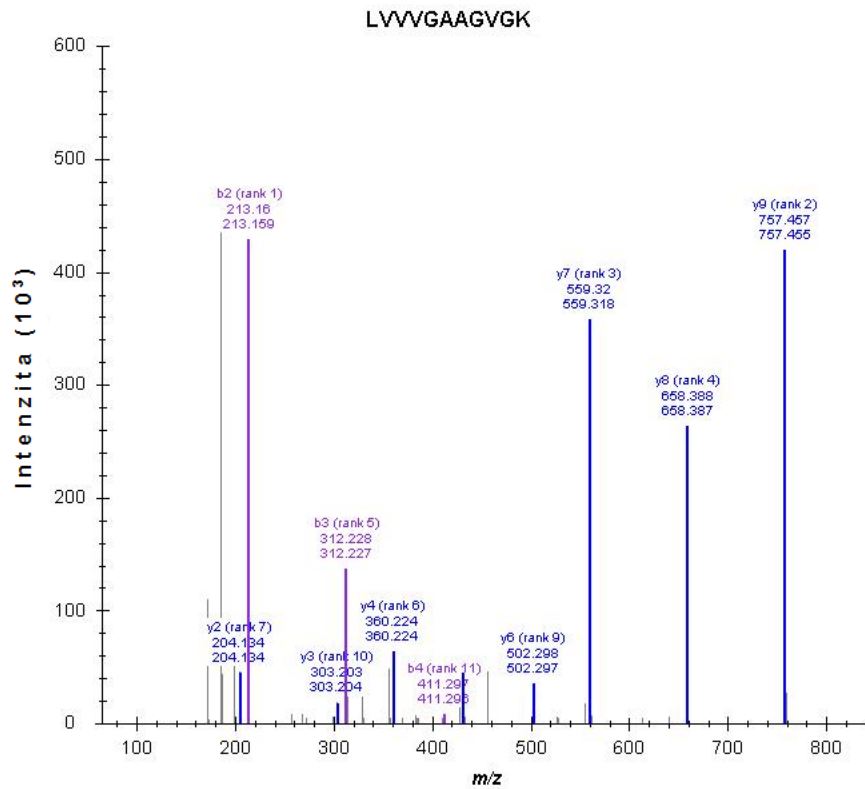
(Zleva: CID: peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1, HCD: peptid G12D a G13D v poměru 1:5; peptid G12D a G13D v poměru 5:1)

Pro další měření byla vybrána CID fragmentace. Metoda s CID fragmentací byla následně použita pro naměření fragmentačních spekter všech peptidů (obr. 24 až 31). Na základě teoretického vygenerování fragmentů byly pro každý peptid vybrány tři fragmenty. Výběr probíhal tak, aby fragmenty nesly informaci o určitém úseku sekvence peptidu, kde se nachází mutace, tedy se mezi jednotlivými peptidy liší v hodnotě m/z . Vybrané teoretické fragmenty se následně porovnaly s naměřenými fragmentačními spektry. Vybrány byly následující ionty: y_7 , y_8 , y_9 a pro peptid G12R y_3 , y_4 a y_5 . Pro peptidy G12D a G13D byly navíc vybrány ionty y_4 a b_7 .

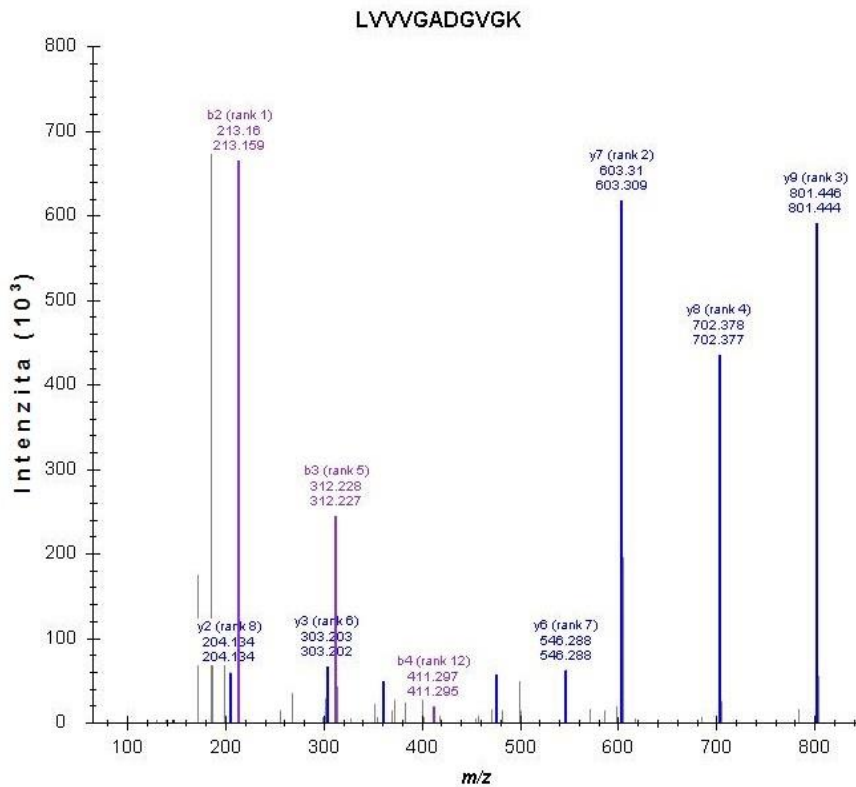
Obr. 24: Fragmentační spektrum peptidu WT(+7 Da)



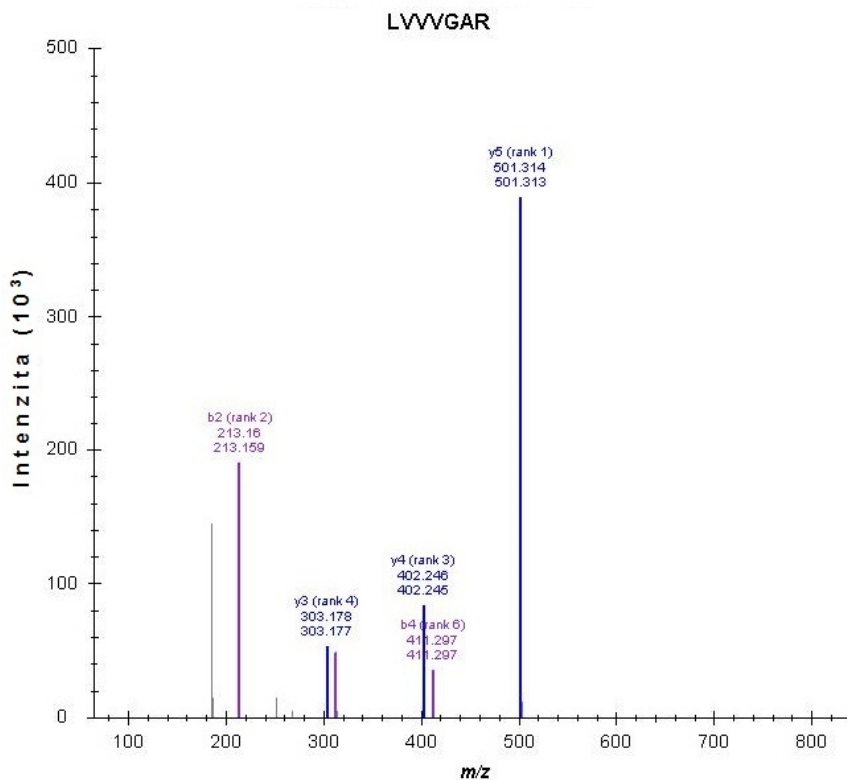
Obr. 25 : Fragmentační spektrum peptidu G12A



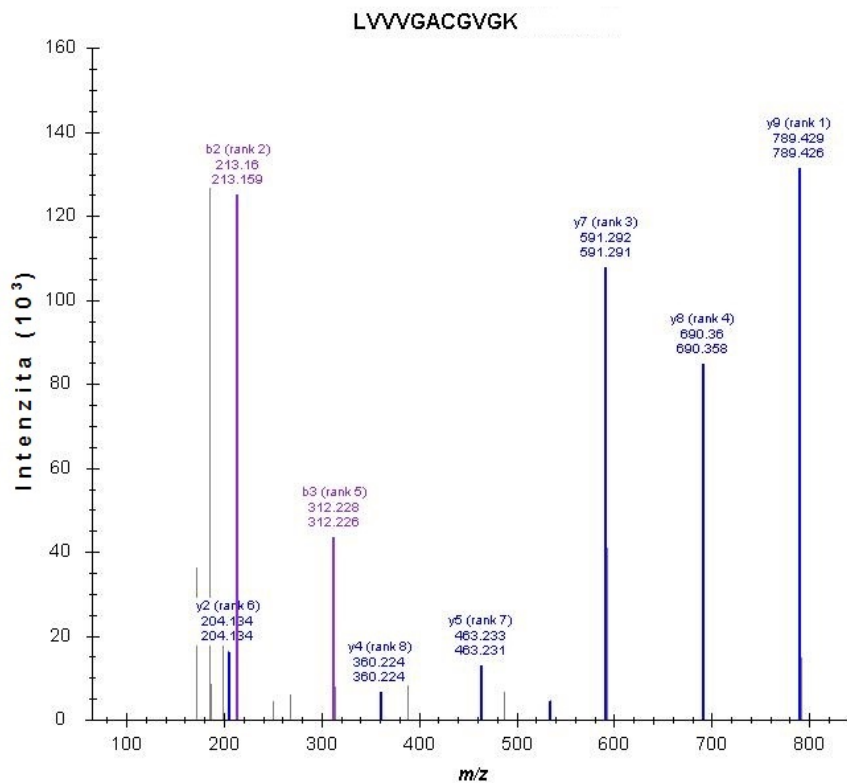
Obr. 26: Fragmentační spektrum peptidu G12D



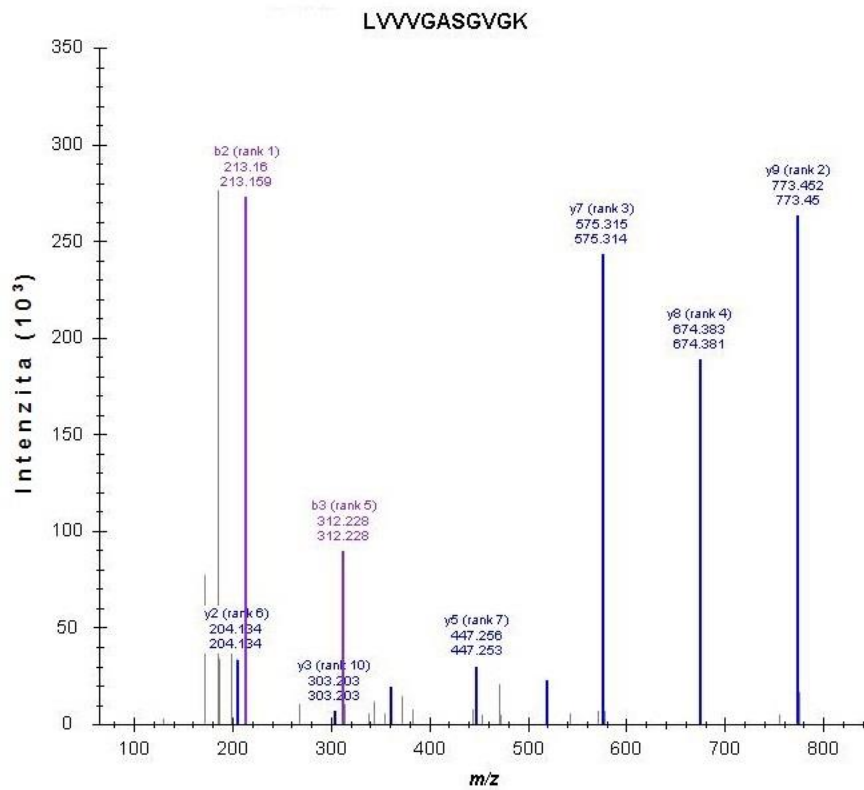
Obr. 27: Fragmentační spektrum peptidu G12R



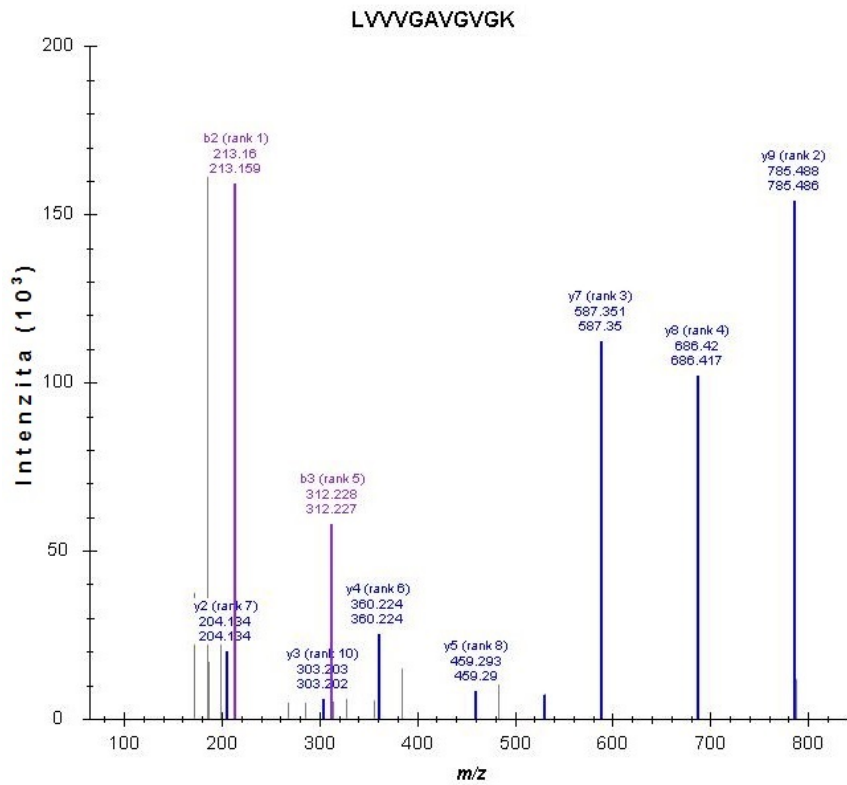
Obr. 28: Fragmentační spektrum nemodifikovaného peptidu G12C



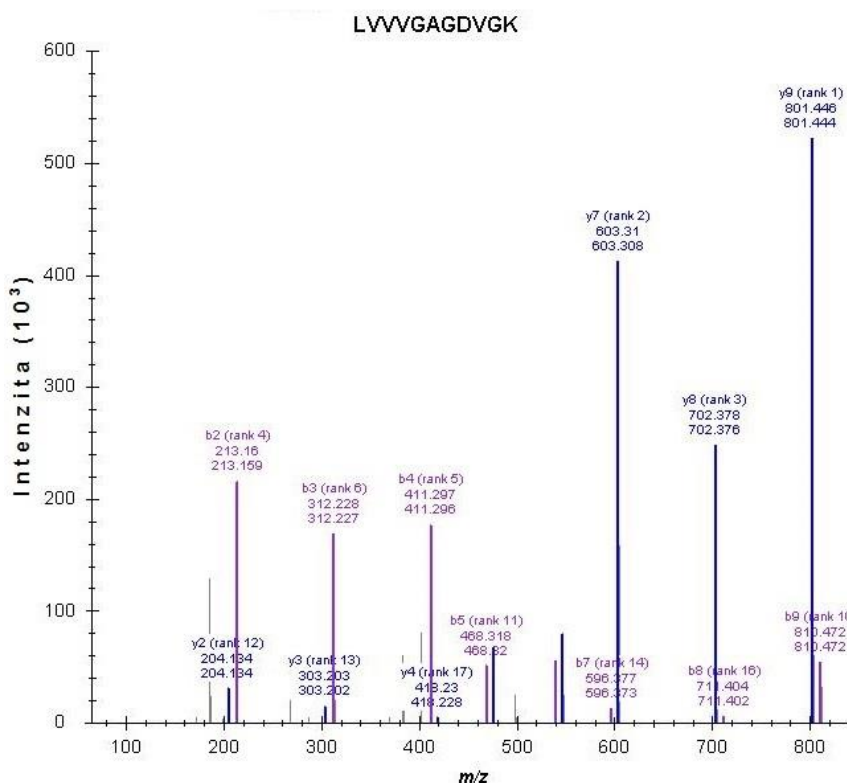
Obr. 29: Fragmentační spektrum peptidu G12S



Obr. 30 : Fragmentační spektrum peptidu G12V



Obr. 31: Fragmentační spektrum peptidu G13D



2.1.1.1. Sekvenční homologie

K-ras protein sdílí značnou část své sekvence s H a N-ras proteiny (obr. 32). Peptid LVVVGAGGVGK, z nemutované formy K-ras proteinu, se nachází ve všech třech proteinech. Tento peptid podléhá stejným mutacím, jak v K-ras proteinu, tak H-ras i N-ras.. Při měření reálných vzorků by tedy mohlo být důležité určit, jestli změřená mutace pochází z K-ras proteinu, či nikoliv. K tomuto účelu by bylo vhodné nalézt peptidy, které by byly specifické pro každý z uvedených Ras proteinů.

Obr. 32: Sekvenční homologie K-ras proteinů s H-ras a N-ras proteinem



(Shora: K-ras 4A, K-ras 4B, H-ras, N-ras; společná sekvence – červená, WT peptid – zelená, společná sekvence – šedá, unikátní peptidy – modrá, odlišná sekvence oproti K-ras – žlutá)

V sekvencích těchto tří proteinů byly nalezeny peptidy, které jsou pro každý z proteinů unikátní a jeden další peptid, který je společný pro všechny (tab. 4). Tyto peptidy byly přidány do konečné tMS² metody.

Tab. 4: Vybrané peptidy z K, H a N-ras proteinu

	WT		Společný		Unikátní	
	Sekvence	<i>m/z</i>	Sekvence	<i>m/z</i>	Sekvence	<i>m/z</i>
K-ras	LVVVGAGGVGK	478,30	SYGIPFIETSAK	656,84	SFEDIHHYR	602,28
H-ras	LVVVGAGGVGK	478,30	SYGIPFIETSAK	656,84	SFEDIHQYR	597,78
N-ras	LVVVGAGGVGK	478,30	SYGIPFIETSAK	656,84	SFADINLYR	549,78

(Hodnoty *m/z* jsou uvedeny pro dvojnásobně nabitě ionty.)

2.1.1.2. Parametry vytvořené LC/MS metody

V případě WT peptidu muselo dojít k úpravě hodnoty *m/z* prekurzoru. Dosud byla měření prováděna na peptidu se značeným leucinem, který posouval hodnotu *m/z* prekurzoru a fragmentů *b* série o +7 *Da*. V případě peptidu G12C je nutné prekurzor pro měření reálných vzorků modifikovat. Při zpracování reálných vzorků trypsinovou digescí dochází k předúpravě, jež vede k navázání karbamidomethylové skupiny na thiolovou skupinu cysteinu. Karbamidomethylace zvyšuje *m/z* jedenkrát nabitých peptidů o 57 *Da*, dvojnásobně nabitých o 28,5 *Da*. Reálné vzorky byly dále spikovány značenými peptidy – WT*, G12D* a G12C*, které v sekvenci nesly těžký lysin. Značený lysin (atomy ¹³C a ¹⁵N) zvyšuje hmotnost peptidu o +8 *Da*.

Targeted MS² (tMS²) metoda byla nastavena tak, aby docházelo k izolaci specifických hmot dvojnásobně nabitých prekurzorů (viz tab. 6). Jednotlivé ionty byly následně izolovány a fragmentovány CID technikou. Tab. 5 uvádí detaily nastavených parametrů.

Tab. 5: Detaily nastavení parametrů tMS² metody

Parametr	Nastavená hodnota
Délka metody	40 min
Iontový zdroj	Nanoelektrosprej
Sprejovací napětí	1900 V
Izolace	Kvadrupól
Izolační okno	2 m/z
Kolizní energie	30 %
Detektor	Obritráp
Rozlišení	30000
Rozsah	100 – 1500 m/z
Maximální doba plnění kolizní cely	100 ms
Polarita	+

Tab. 6: Tabulka izolovaných iontů v tMS² metodě

Název	Hodnota m/z	Náboj
Mut1 G12A	485,3082	2
Mut2 G12D	507,3031	2
Mut3 G12R	357,2371	2
Mut4 G12C_karbamidometylovaný	529,8050	2
Mut5 G12S	493,3057	2
Mut6 G12V	499,3239	2
Mut7 G13D	507,3031	2
K-ras WT	478,3004	2
K-ras unikátní	602,2807	2
H-ras unikátní	597,7805	2
N-ras unikátní	549,7826	2
Kras WT*	482,3075	2
Kras G12D*	511,3102	2
Kras G12C*	505,3013	2

2.1.1.3. Určení limitu detekce a kvantifikace

Z peptidové směsi, připravené podle návodu (viz protokol: Příloha 6, varianta d v části C) z množství 30 μg totálního proteinu z lyzátu buněčné linie CCRF-CEM, byla vytvořena sada kalibračních roztoků syntetického peptidu G12D a G12C. Roztoky byly připraveny tak, aby v nástřiku 2 μl bylo přítomno určité množství každého z peptidů v rozsahu od 2 amol do 10 fmol . Všechny vzorky byly současně spikovány značenými peptidy G12D* a G12C*, každý v koncentraci 0,5 $\text{fmol}/\mu\text{l}$, které sloužily jako interní standardy.

Všechny vzorky byly změřeny minimálně ve třech opakováních vytvořenou tMS² metodou. Z naměřených dat byla vyexportována plocha píků fragmentů příslušných peptidů tak, že pro peptid a jeho interní standard byly vybrány stejné fragmenty. Plochy píků fragmentů byly pro každý peptid sečteny a výsledná plocha píku peptidu byla vydělena plochou píku jeho interního standardu. Získaná hodnota, poměr neznačený (light – L) a značený peptid (heavy – H), byla označena L/H. Hodnoty L/H byly zaneseny do grafu proti množství daného peptidu.

Byla vybrána oblast, v níž byly L/H hodnoty lineárně závislé na množství daného peptidu. Metodou nejmenších čtverců byla získána hodnota směrnice přímky lineární závislosti (S) a směrodatná odchylka směrnice (SOS). Z těchto hodnot byl vypočten limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) podle vzorců:

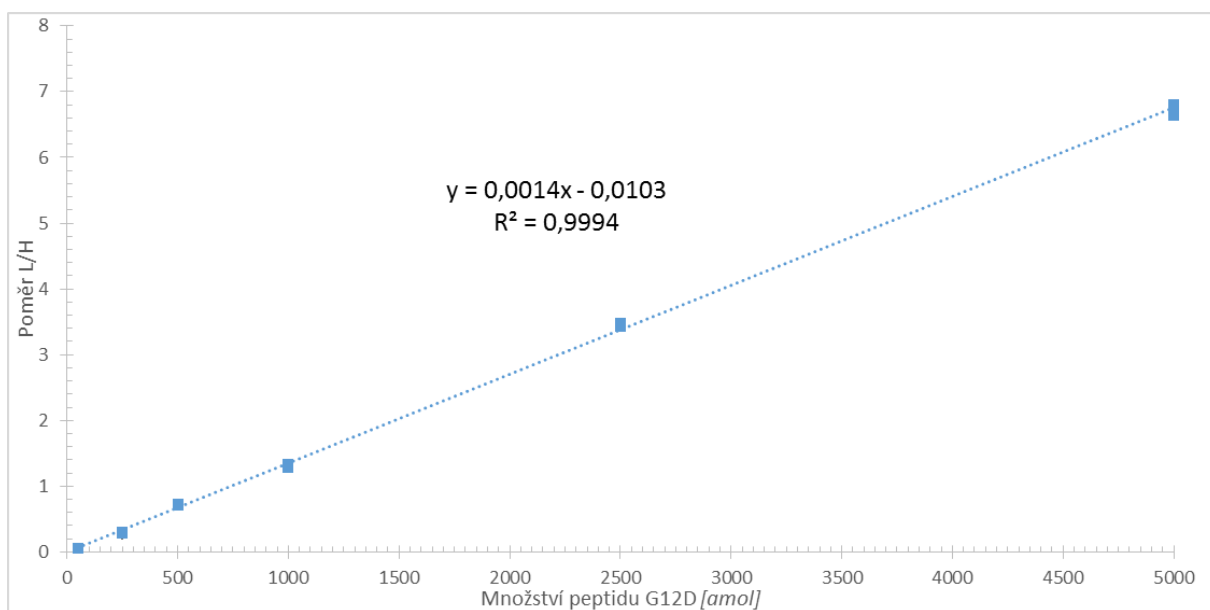
$$LOD = \frac{3,3 \cdot SOS}{S} \quad ; \quad LOQ = \frac{10 \cdot SOS}{S}$$

Ze zpětně vypočteného množství peptidu byla určena průměrná relativní chyba a recovery. Výsledky jsou shrnuty v tab. 7. Rozsah lineární závislosti L/H na množství peptidu je pro peptid G12D (obr. 33) a G12C (obr. 34) uveden včetně rovnice přímky a hodnoty koeficientu mnohonásobné determinace.

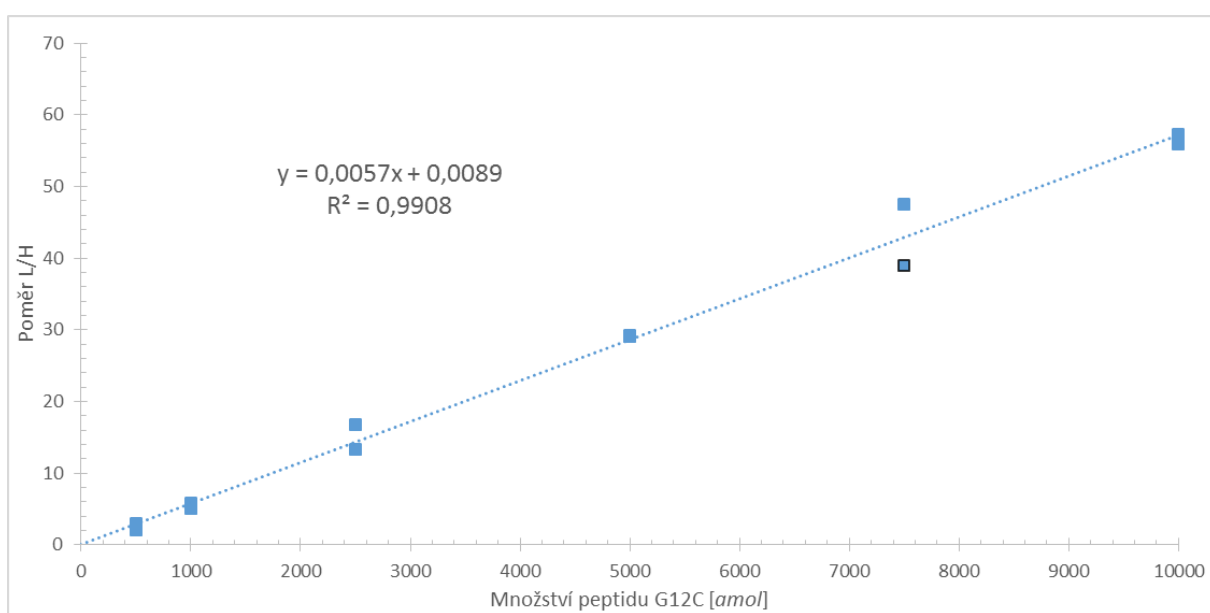
Tab. 7: Hodnoty směrnice, směrodatné odchylky směrnice, LOD, LOQ, relativní chyba (RC) a recovery pro peptidy G12D a G12C

	S	SOS	LOD [<i>amol</i>]	LOQ [<i>amol</i>]	RC [%]	Recovery [%]
G12D	0,0013549	0,0000085	22,19	52,30	1,88 ± 0,01	95,95 ± 0,06
G12C	0,0057187	0,0001661	15,26	49,40	7,79 ± 0,05	98,03 ± 0,07

Obr. 33: Lineární závislost hodnot L/H na množství peptidu pro peptid G12D



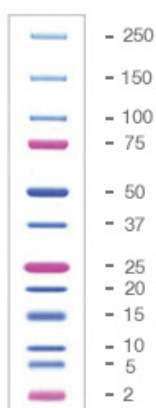
Obr. 34: Lineární závislost hodnoty L/H na množství peptidu pro peptid G12C



2.1.2. SDS-PAGE

Gely pro elektroforetickou separaci proteinů byly připraveny tak, aby separační gel měl co největší délku (~ 9 cm). Zaostrovací gel měl potom délku několik milimetrů. Použitý hmotnostní marker je kompatibilní s barvením gelu pomocí barviva Coomassie Blue. Marker po separaci tvoří modře a tři růžově zbarvené bandy (viz Obr.), které však po obarvení Coomassie Blue zmodrají. Rozlišení bandů markeru je po obarvení možné i podle jejich velikosti.

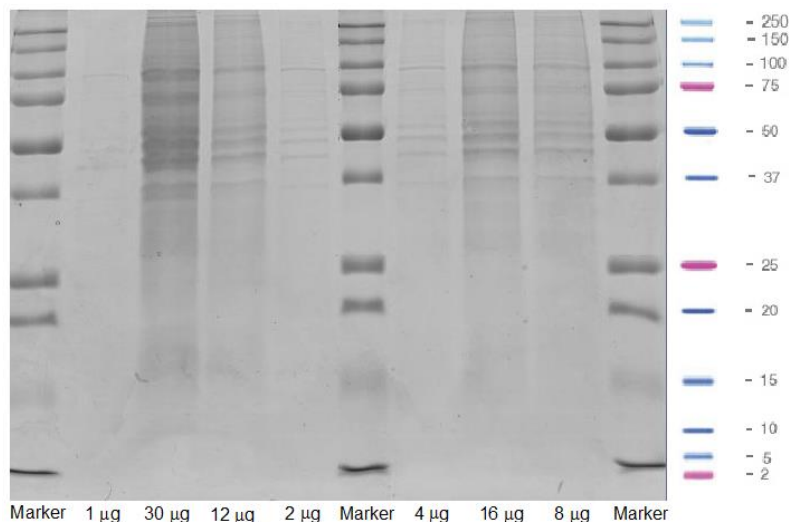
Obr. 35: Bandy hmotnostního proteinového markeru po SDS-PAGE separaci



Koncentrace proteinových lyzátů dovoľovala dávkovat maximálně 40 μg totálního proteinu do jamek o objemu 25 μl , do nichž je optimální dávkovat max. 20 μl vzorku. Vzorek se dávkuje po povaření s SDS loadovacím pufrem, což omezuje i množství dávkovaného lyzátu pro separaci.

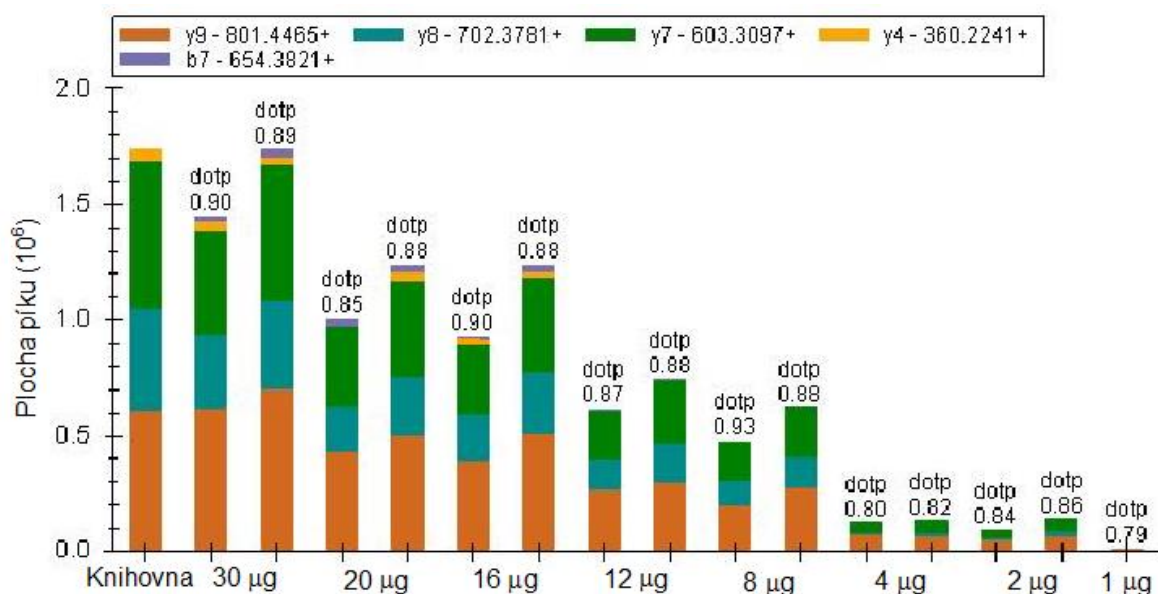
Lyzáty buněčné linie CCRF-CEM byly použity pro nadávkování množství totálního proteinu v rozsahu 1 – 30 μg . Vzorky o nízkém množství proteinu byly dávkovány vedle hmotnostního markeru z důvodu přesnějšího vyřezání oblastí (obr. 36). Vyřezány byly 3 oblasti, jak uvádí protokol (Příloha 6).

Obr. 36: Elektroforeogram lyzátu z linie CCRF-CEM v rozsahu 1 – 30 μg totálního proteinu



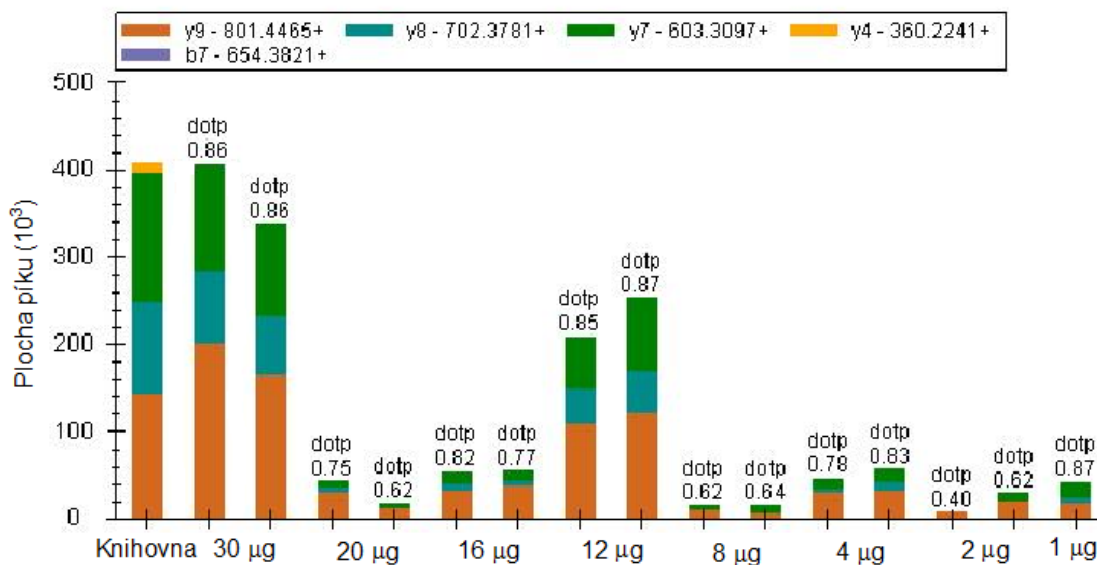
Použitá buněčná linie obsahuje mutaci G12D. Pomocí optimalizované tMS2 metody byly měřeny specifické přechody prekurzor/fragment pro odpovídající peptidy za účelem prokázání přítomnosti těchto peptidů ve vzorku. Změřená data ukazují (obr. 37), že k určení typu mutace, která aminokyselina nahrazuje glycin, je možné již při použití 8 μg totálního proteinu. Pro odlišení mutace G12D od G13D je potřeba vyšší množství totálního proteinu a to minimálně dvojnásobné. Od tohoto obsahu totálního proteinu jsou měřitelné fragmenty γ_4 a b_7 .

Obr. 37: Plochy píku peptidu G12D z oblasti gelu 20 – 25 kDa z buněčné linie CCRF-CEM po dávkování množství totálního proteinu v rozsahu 1 – 30 μg v jednom (1 μg), resp. dvou opakováních (zbytek)

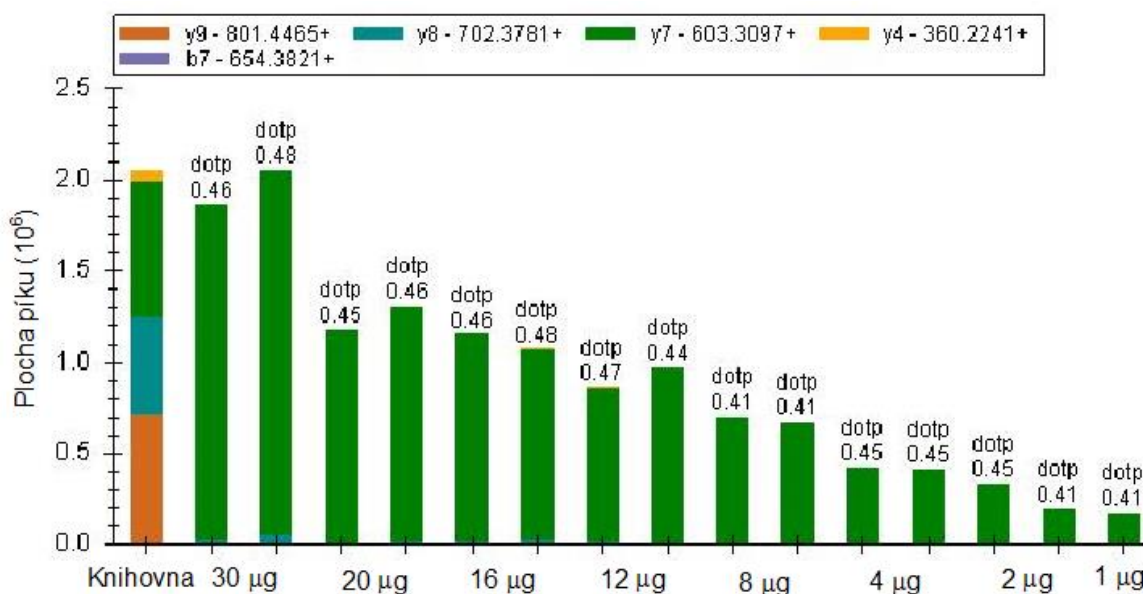


Elektroforetická separace neprobíhá vždy optimálně, ale i samotné vyřezávání nevede k očekávanému umístění K-ras proteinu v oblasti 20 – 25 kDa. V takovém případě lze peptidy detekovat i nad, či pod oblastí 20 – 25 kDa (obr. 38, 39 a 52)

Obr. 38: Plochy píku peptidu G12D pod zónou 20 – 25 kDa z buněčné linie CCRF-CEM po dávkování množství totálního proteinu v rozsahu 1 – 30 μg v jednom (1 μg), resp. dvou opakováních (*zbytek*)



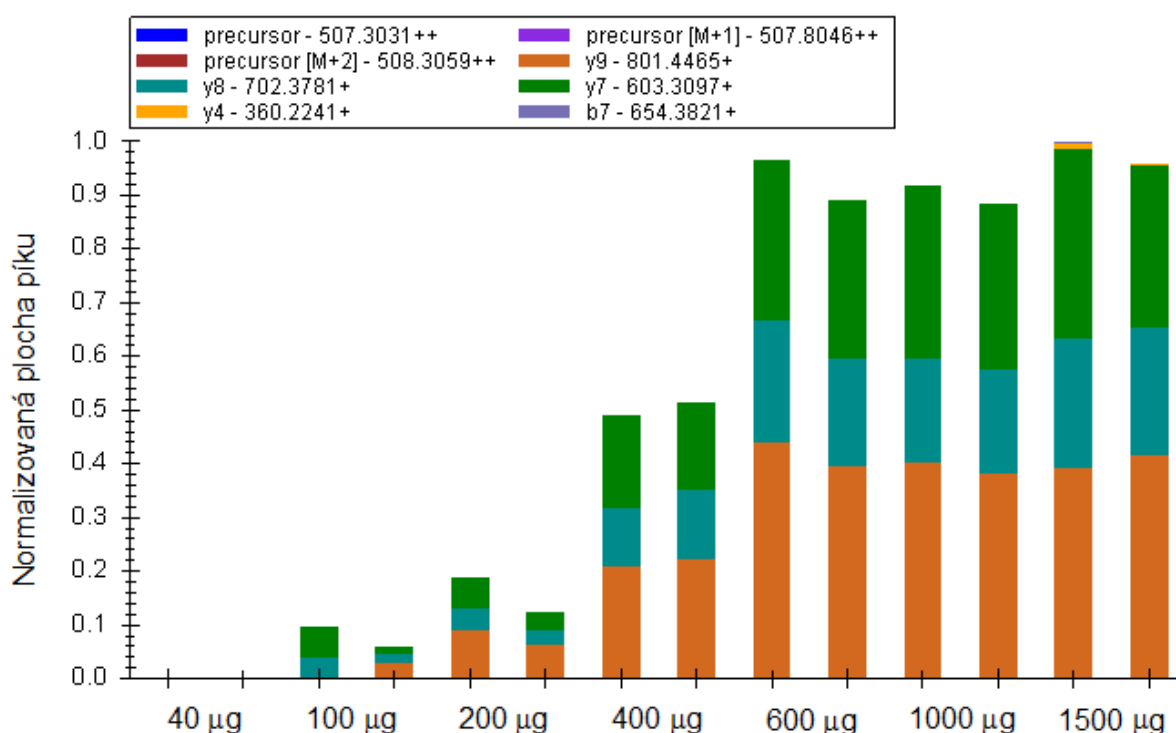
Obr. 39: Plochy píků fragmentů peptidu G12D nad zónou 20 – 25 kDa z buněčné linie CCRF-CEM po dávkování množství totálního proteinu v rozsahu 1 – 30 μg v jednom (1 μg), resp. dvou opakováních (*zbytek*)



2.1.3. Imunoprecipitace - magnetické kuličky protein A

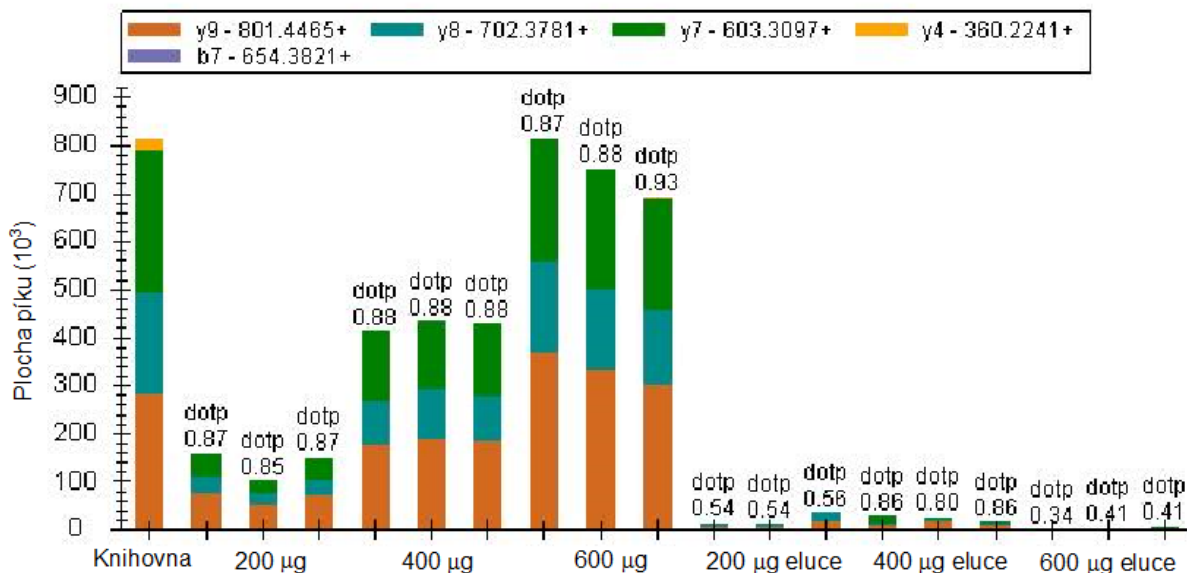
Imunoprecipitace na magnetických kuličkách s proteinem A byla nejprve použita na lyzátech z buněčné linie CCRF-CEM. Kuličky s navázanou protilátkou byly inkubovány přes noc s objemy lyzátu odpovídajících množství totálního proteinu o 40 – 1500 μg . Trypsinová digesce byla provedena v přítomnosti kuliček, tedy bez eluce. Změřená data ukázala, že v případě imunoprecipitace lze peptid G12D odlišit od G13D pouze s nejvyšším použitým množstvím totálního proteinu, tj. 1500 μg (Obr.). Pro určení typu mutace dostačuje množství 200 μg totálního proteinu.

Obr. 40: Plochy píku peptidu G12D normalizované ke vzorku s nejvyšší plochou píku po imunoprecipitaci na proteinu A pro vzorky o různém množství totálního proteinu lyzátu buněčné linie CCRF-CEM v rozsahu 40 – 1500 μg ve dvou opakováních



Následně byl experiment opakován s totálním proteinem v rozsahu 200 – 600 μg , protože při množství 600 μg dosahujeme přibližně stejné plochy píku jako u vyššího množství. Tentokrát digesci trypsinem předcházel eluční krok a digesce trypsinem byla provedena v získaném eluátu. Eluce bohužel nepřinesla příznivé výsledky (obr. 41) Optimalizace elučního kroku přesahuje rámec této práce a dále bude probíhat trypsinová digesce v přítomnosti magnetických kuliček s imobilizovaným proteinem A.

Obr. 41: Plochy píku peptidu G12D pro vzorky o různém množství totálního proteinu lyzátu buněčné linie CCRF-CEM ve třech opakováních bez eluce a s elucí imunoprecipitovaných proteinů z magnetických kuliček s proteinem A

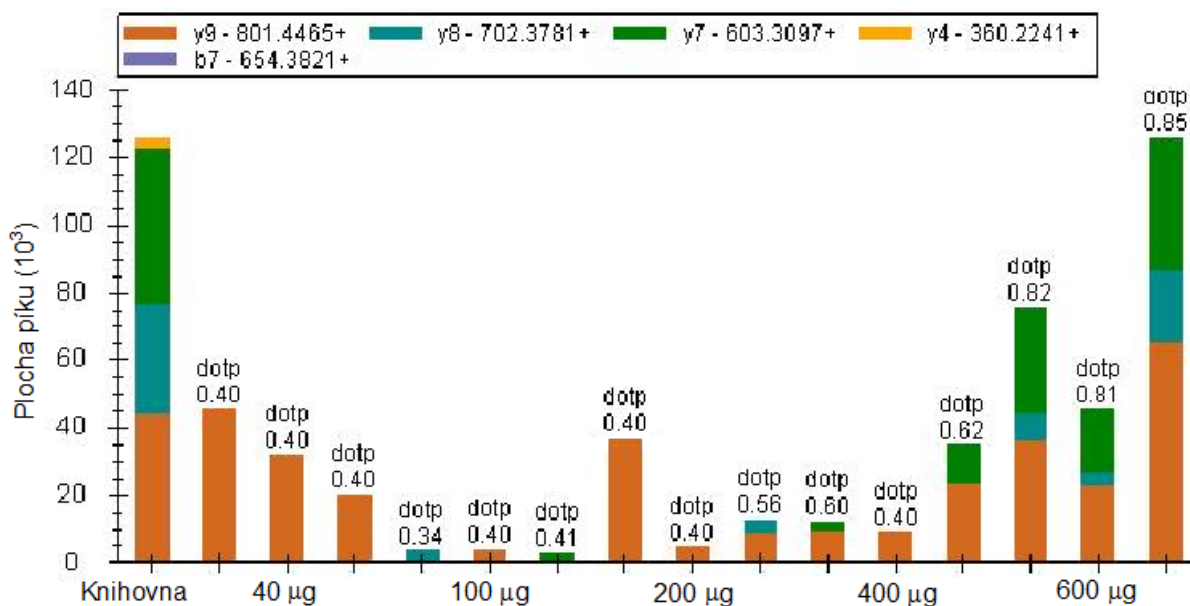


2.1.4. Imunoprecipitace – magnetické kuličky protein G

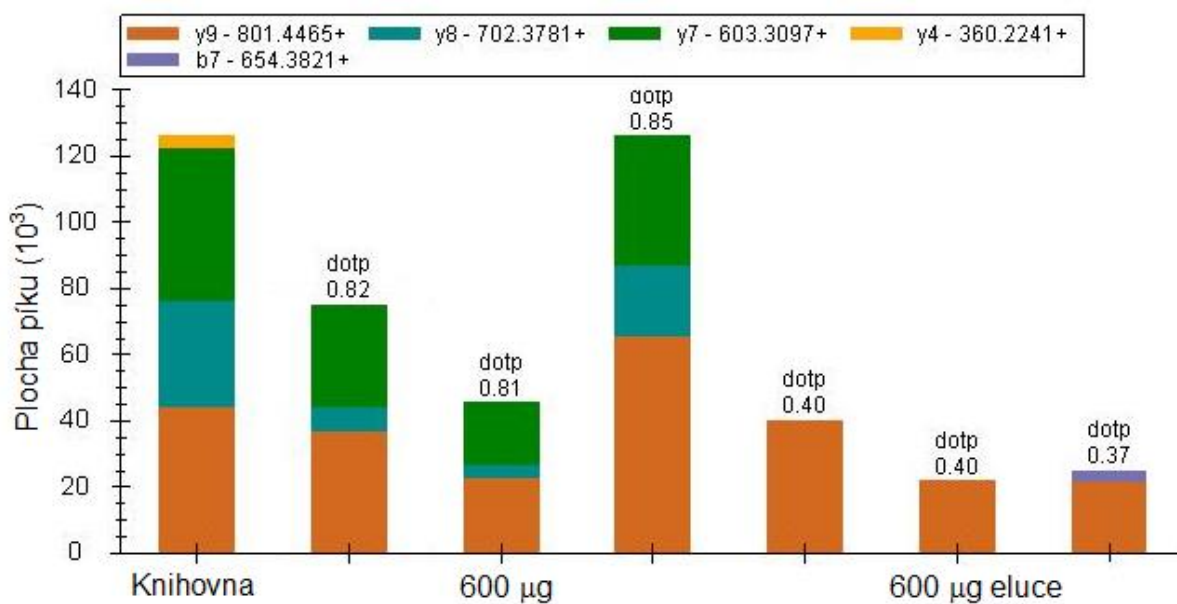
Imunoprecipitace na magnetických kuličkách s proteinem G byla odzkoušena nejprve na lyzátu buněčné linie CCRF-CEM. Nejprve bylo použito množství totálního proteinu v menším rozsahu 40 – 600 µg. Množství totálního proteinu k identifikaci typu mutace odpovídalo nejvyššímu množství, tj. 600 µg (obr. 42), což je horší výsledek ve srovnání s imunoprecipitací s proteinem A.

Byl proveden stejný experiment jako v případě imunoprecipitace s proteinem A. Imunoprecipitace byla provedena se 600 µg totálního proteinu a před trypsinovou digescí byl zařazen eluční krok. Eluce i v tomto případě vedla k negativnímu výsledku (obr. 43).

Obr. 42: Plochy píku peptidu G12D po imunoprecipitaci na proteinu G pro vzorky o množství totálního proteinu lyzátu CCRF-CEM v rozsahu 40 – 600 μg ve třech opakováních



Obr. 43: Plochy píku peptidu G12D pro vzorky z 600 μg totálního proteinu lyzátu CCRF-CEM ve třech opakováních bez eluce a s elucí imunoprecipitovaných proteinů z magnetických kuliček s proteinem G

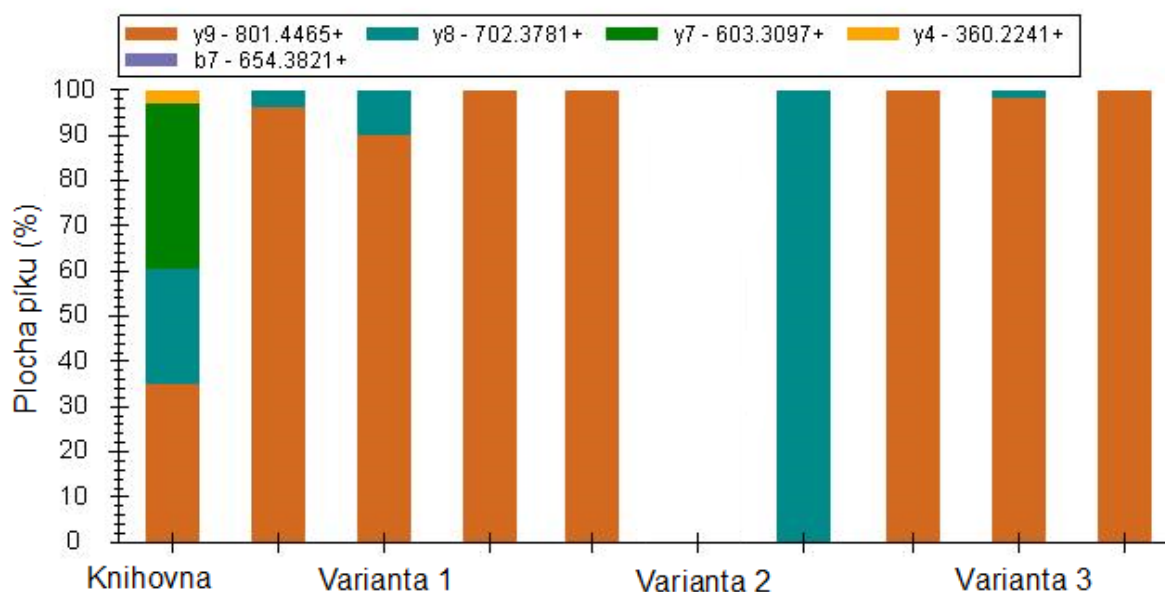


Imunoprecipitace na proteinu G vyžadovala větší množství totálního proteinu v porovnání s proteinem A. Pro analýzu reálných vzorků byla proto vybrána imunoprecipitace na magnetických kuličkách s imobilizovaným proteinem A, ačkoliv původní metoda využívala magnetické kuličky s imobilizovaným proteinem G (Wang, Q., 2010).

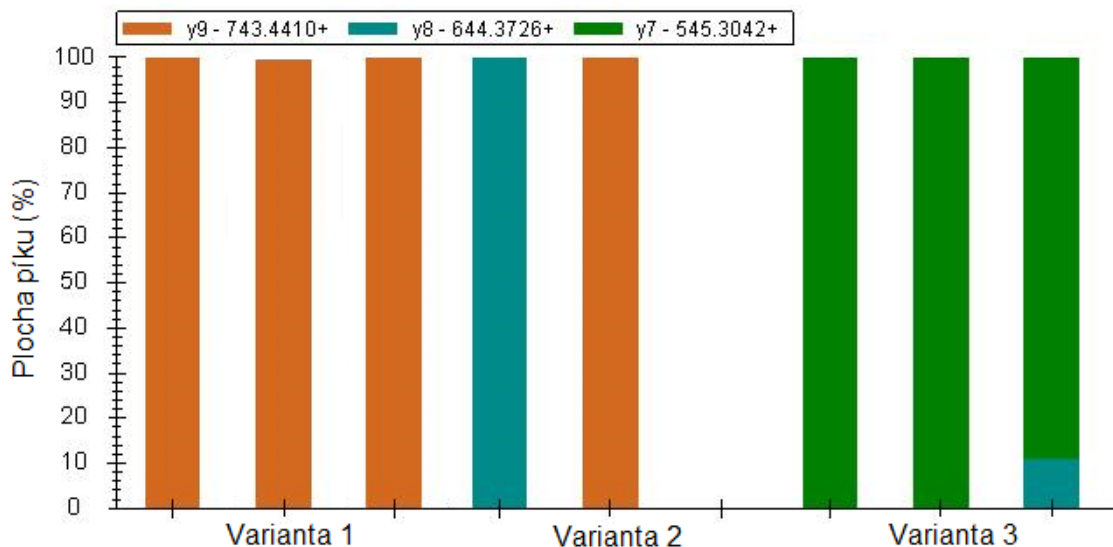
2.1.5. FASP_xFAST

Dvojitá filtrace na membránových filtrech byla provedena podle protokolu (Příloha 8). Odkoušeny byly všechny tři varianty, které vedou k rozrušení disulfidických můstků ve struktuře proteinu. Varianty byly vyzkoušeny na lyzátu buněčné linie CCRF-CEM s množstvím totálního proteinu 200 μ g, dále polovičním množstvím a množstvím 40 μ g. Ani jeden z přístupů nevedl k získání měřitelného signálu pro peptid G12D (obr. 44), ani WT peptid (obr. 45).

Obr. 44: Plochy píku peptidu G12D pro vzorky o 200 μ g totálního proteinu připravených metodou FASP_xFAST ve třech variantách a třech opakováních

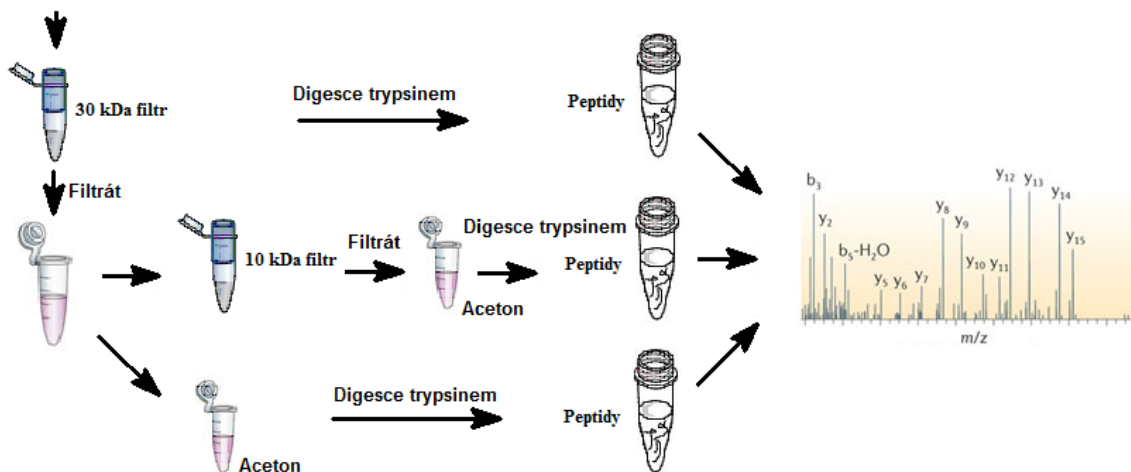


Obr. 45: Plochy píku WT peptidu pro vzorky o 200 μg totálního proteinu připravených metodou FASPxFAST ve třech variantách a třech opakováních



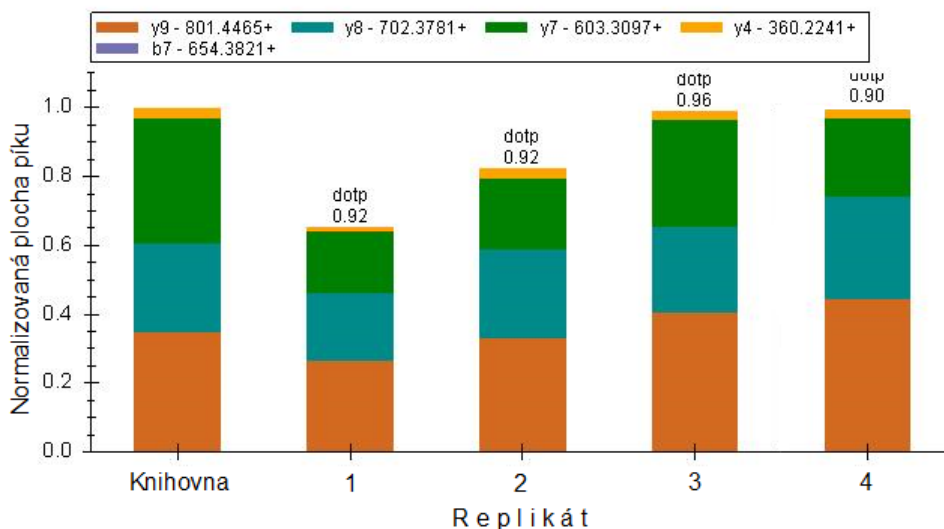
Hlubší analýza zahrnovala zopakování první varianty podle schématu na obr. 46. Byla provedena filtrace na 30 kDa filtru. Roztok proteinů prošlých 30 kDa filtrem byl rozdělen na dva alikvoty, kdy jeden byl precipitován acetonem (viz protokol: Příloha 9), aby došlo k odstranění detergentů a následně byl podroben digesci trypsinem. Druhý alikvot byl nanesen na 10 kDa filtr. Proteiny zachyceny na 30 kDa filtru byly převedeny na peptidy trypsinovou digescí. Digescce na 10 kDa filtru byla vynechána a filtrát, po filtraci přes 10 kDa filtr, byl zpracován jako první alikvot filtrátu po filtraci přes 30 kDa membránový filtr.

Obr. 46: Schéma experimentu pro nalezení místa zachycení peptidů K-ras proteinu v metodě FASPxFAST

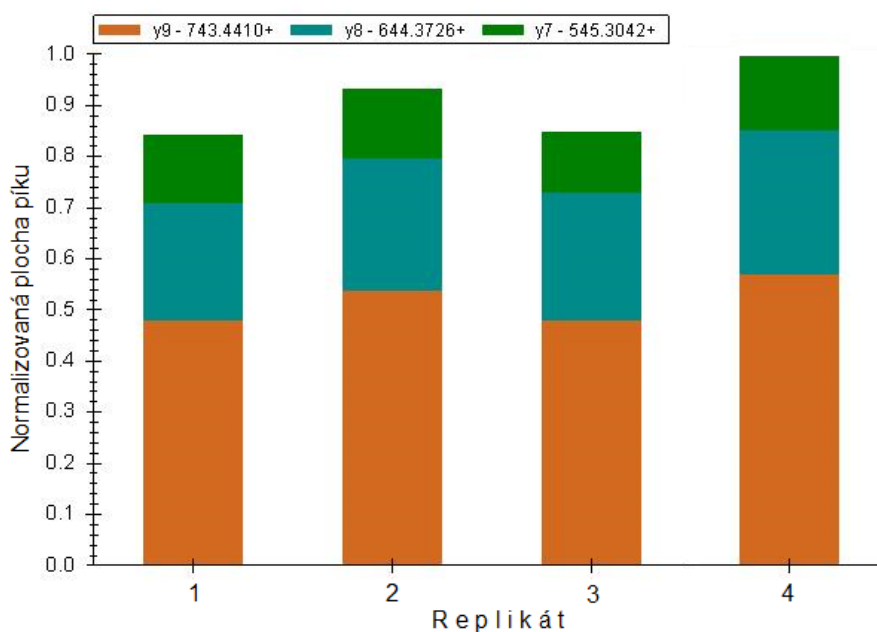


Pouze v případě proteinů zachycených na 30 kDa filtru byly nalezeny peptidy G12D (obr. 47) a WT (obr. 48). Jelikož dochází k zachycení K-ras proteinu na prvním filtru, nelze metodu použít v předpokládaném uspořádání. Nejedná se tedy o vhodný způsob přípravy vzorku, který byl zvolen pro účely této práce a nebude použit pro analýzu lyzátů ostatních buněčných linií.

Obr. 47: Plochy píku peptidu G12D normalizované ke vzorku s nejvyšší plochou píku po zachycení proteinů na 30 kDa membránovém filtru ze čtyř měření



Obr. 48: Plochy píku WT peptidu normalizované ke vzorku s nejvyšší plochou píku po zachycení proteinů na 30 kDa membránovém filtru ze čtyř měření



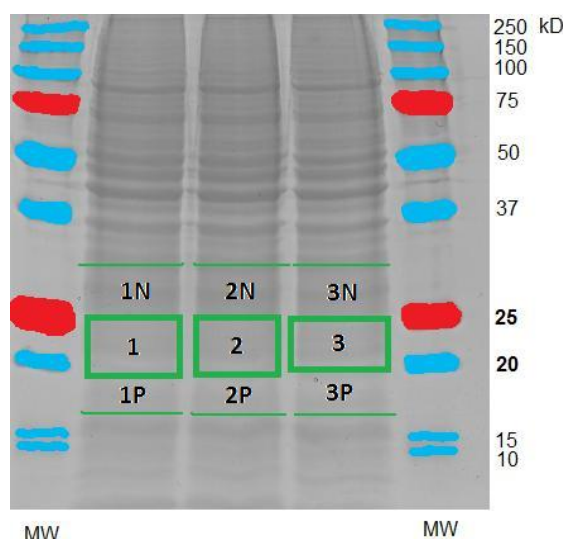
2.2. Analýza buněčných lyzátů

Analyzovány byly buněčné lyzáty všech 4 buněčných linií – CCRF-CEM, SNU-1, NCI-H358 a Calu-1. Použitými metodami pro přípravu vzorků byla SDS-PAGE elektroforéza a imunoprecipitace na magnetických kuličkách s proteinem A.

2.2.1. SDS-PAGE

K separaci bylo použito 40 μ g totálního proteinu od každé linie. Od všech linií byla separace provedena ve třech opakováních, kromě linie Calu-1, u níž byla opakování dvě. U každého opakování byly vyřezány tři oblasti a vzorky byly označeny zkráceným názvem linie a kódem, jak je uvedeno na obr. 49. Pro CCRF-CEM získáme: CEM-1, CEM-1P, CEM-1N, CEM-2, atd.

Obr. 49: Ukázka systému kódování vzorků podle vyříznuté oblasti po SDS-PAGE separaci

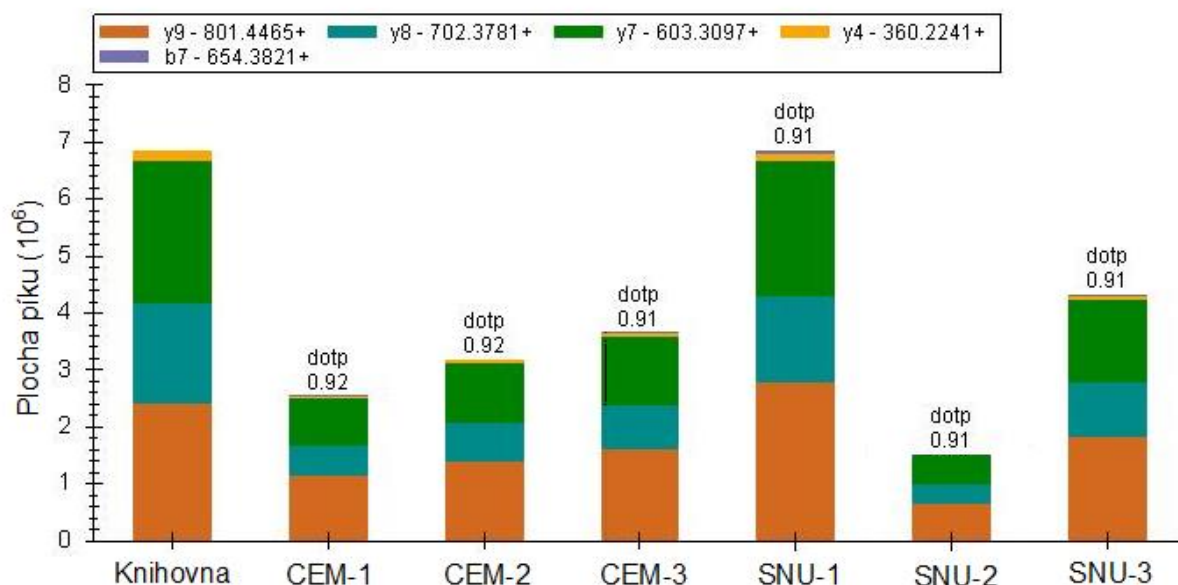


2.2.1.1. Linie s mutací G12D

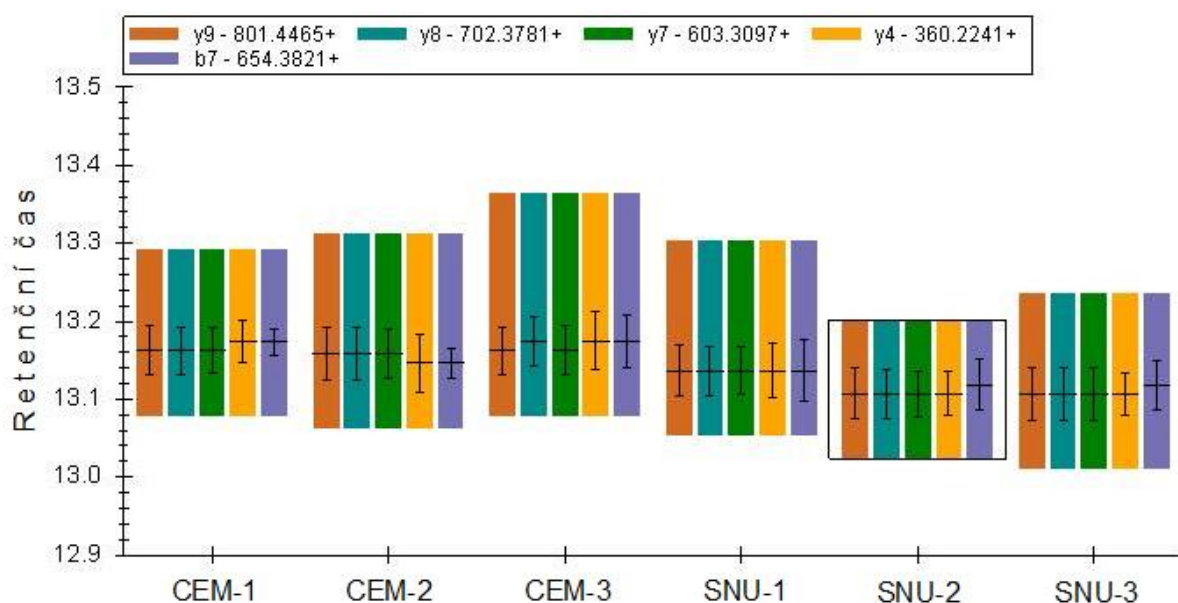
U obou linií (CCRF-CEM, SNU-1) byla úspěšně nalezena odpovídající mutace G12D (obr. 50). Pro každý peptid probíhá ověření na základě více několika parametrů. Prvním parametrem je přítomnost píků fragmentů pro daný peptid ve stejném retenčním čase. Z těchto píků jsou následně vygenerovány plochy píků. Pokud je přítomné spektrum peptidu v knihovně, je srovnána plocha píků s knihovnou. Míra shody je uvedena jako hodnota dotp. Pro úplnou shodu nabývá dotp hodnoty 1. Srovnání spektra s knihovnou je druhým parametrem. Třetím je srovnání retenčních časů. Retenční čas peptidu a stejného syntetického peptidu musí být za

dodržení stejných podmínek shodný. Retenční časy fragmentů mohou být transformovány do grafické podoby (obr. 51). Pokud všechny parametry odpovídají hodnotám naměřeným u standardů, pak je identifikace spolehlivá.

Obr. 50: Plochy píku peptidu G12D pro vzorky lyzátů linií CCRF-CEM a SNU-1 ve třech opakováních SDS-PAGE separace

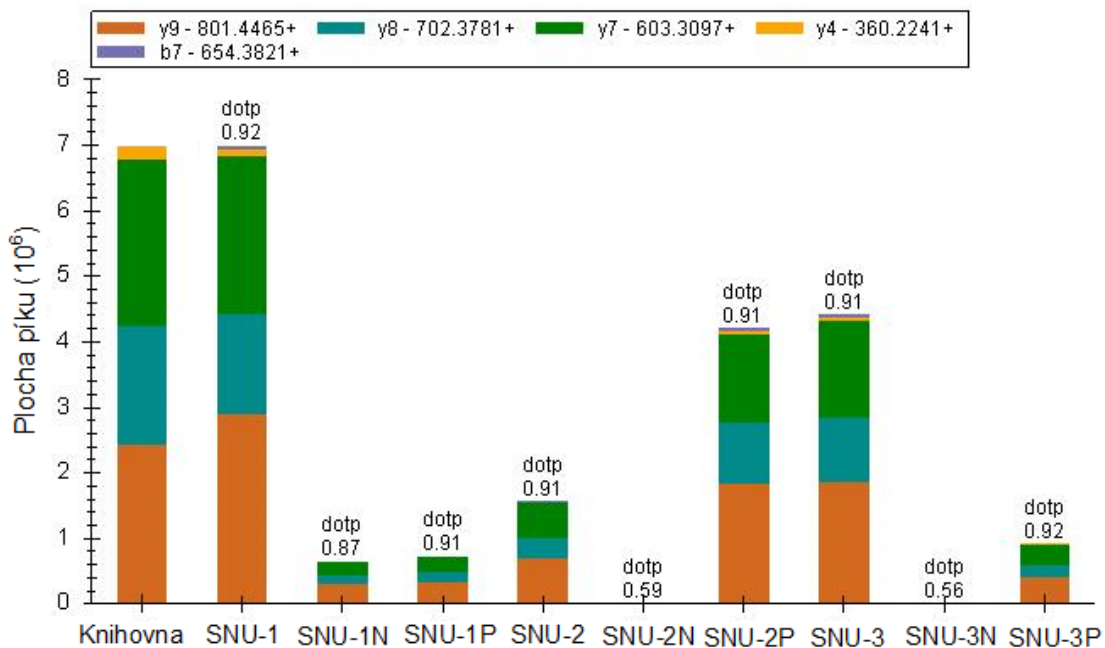


Obr. 51: Retenční časy fragmentů peptidu G12D pro vzorky lyzátů linií CCRF-CEM a SNU-1 ve třech opakováních SDS-PAGE separace

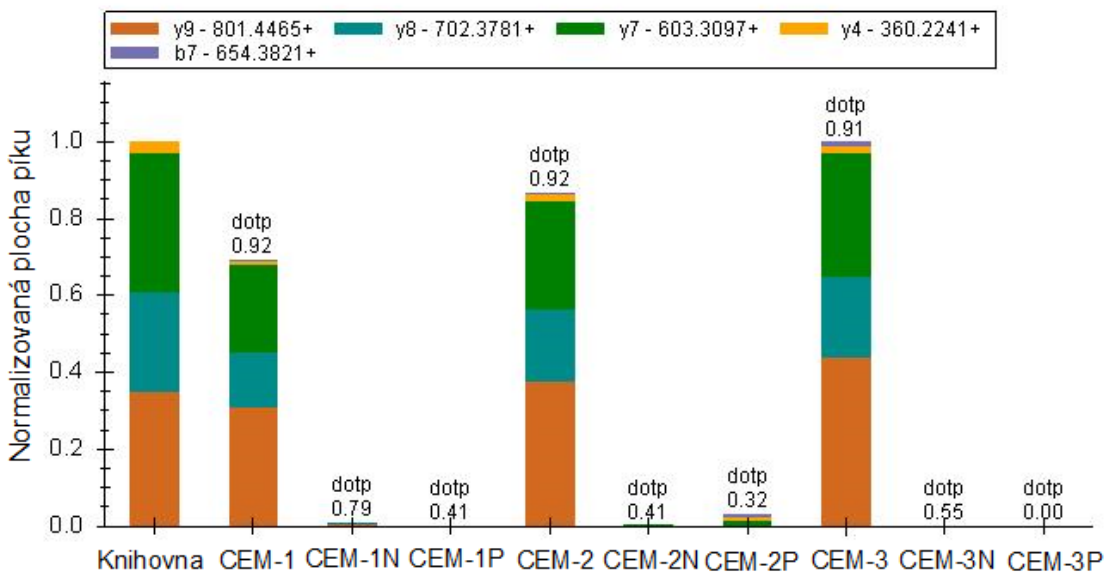


V případě linie SNU-1 se K-ras protein při vyřezávání oblastí dostal do obou oblastí nad i pod oblastí 20 – 25 kDa (obr. 52). U linie CCRF-CEM byly peptidy K-ras proteinu detekovány převážně v očekávané oblasti 20 – 25 kDa (obr. 53).

Obr. 52: Plochy píku peptidu G12D tří vyřezaných oblastí gelu pro lyzáty linie SNU-1 ve třech opakováních SDS-PAGE separace



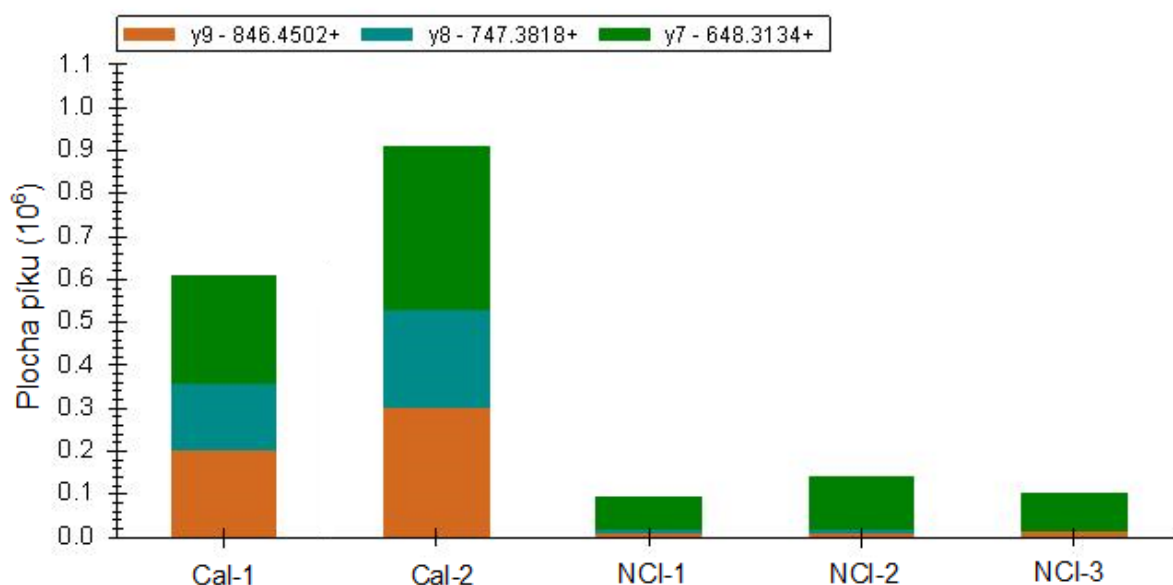
Obr. 53: Plochy píku peptidu G12D tří vyřezaných oblastí gelu pro lyzáty linie CCRF-CEM ve třech opakováních SDS-PAGE separace



2.2.1.2. Linie s mutací G12C

U obou linií (Calu-1, NCI-H358) byla nalezena odpovídající mutace G12C, ačkoliv změřený signál byl značně nízký, zejména u linie NCI-H358 (obr. 54). Tato skutečnost může být způsobena nižší mírou relativní exprese mutované formy K-ras proteinu ve srovnání s celým proteomem buňky.

Obr. 54: Plochy píku peptidu G12C pro vzorky lyzátu buněčné linie Calu-1 ve dvou a NCI-H358 ve třech opakováních SDS-PAGE separace



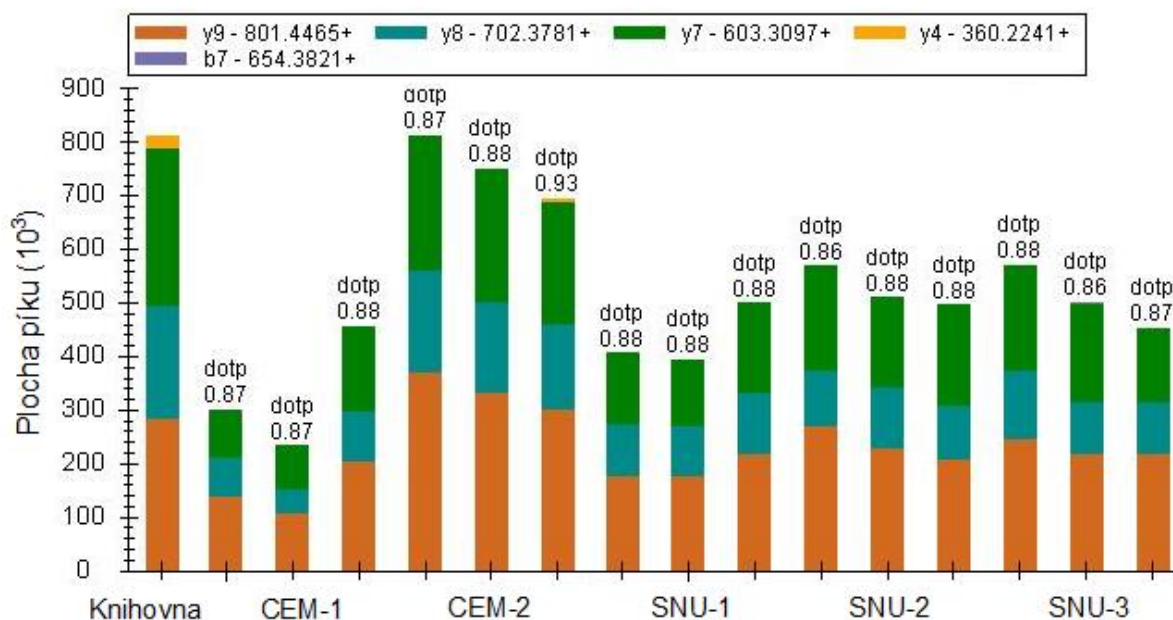
2.2.2. Imunoprecipitace – magnetické kuličky protein A

Imunoprecipitace na magnetických kuličkách s imobilizovaným proteinem A byla provedena s 600 μ g totálního proteinu. U linií SNU-1 a NCI-H358 byla imunoprecipitace provedena ve třech opakováních, u CCRF-CEM ve dvou a u Calu-1 v jednom opakování. Důvodem nižších počtů opakování bylo zejména malé množství proteinového lyzátu.

2.2.2.1. Linie s mutací G12D

U obou linií nesoucích mutaci G12D (CCRF-CEM, SNU-1), potvrzenou z SDS-PAGE experimentu, bylo možné potvrdit pouze přítomnost mutace, při níž je glycin nahrazen asparagovou kyselinou bez informace o její pozici na peptidu (obr. 55). Pro určení pozice by musel být zachycen signál pro fragment y_4 či b_7 peptidu G12D.

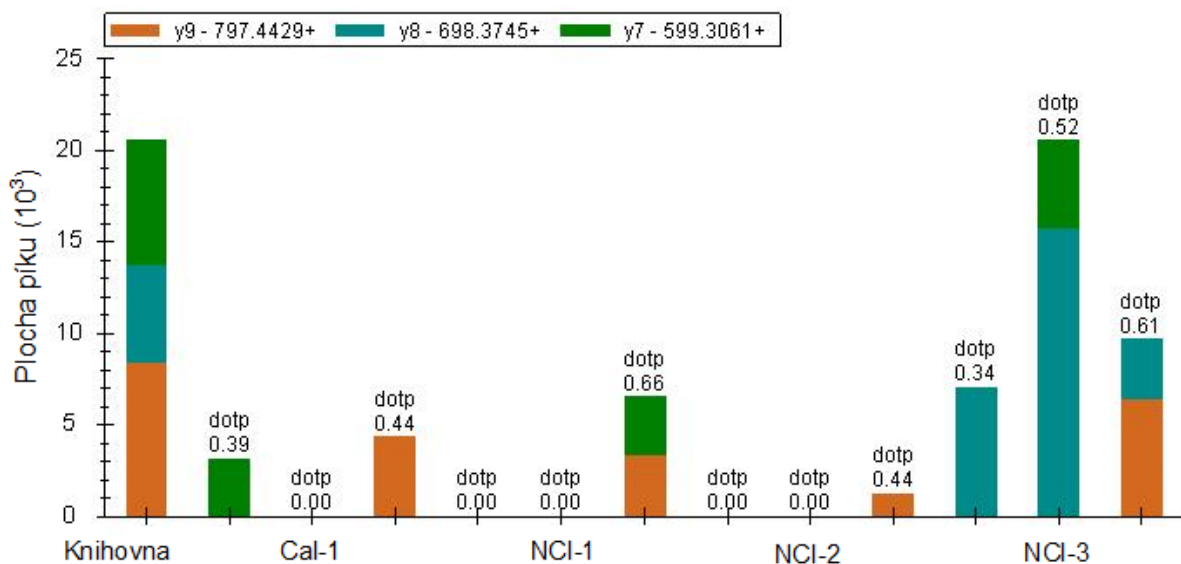
Obr. 55: Plochy píku peptidu G12D pro vzorky lyzátů buněčné linie CCRF-CEM ve dvou opakováních a SNU-1 ve třech opakováních imunoprecipitace na proteinu A získaných ze tří měření



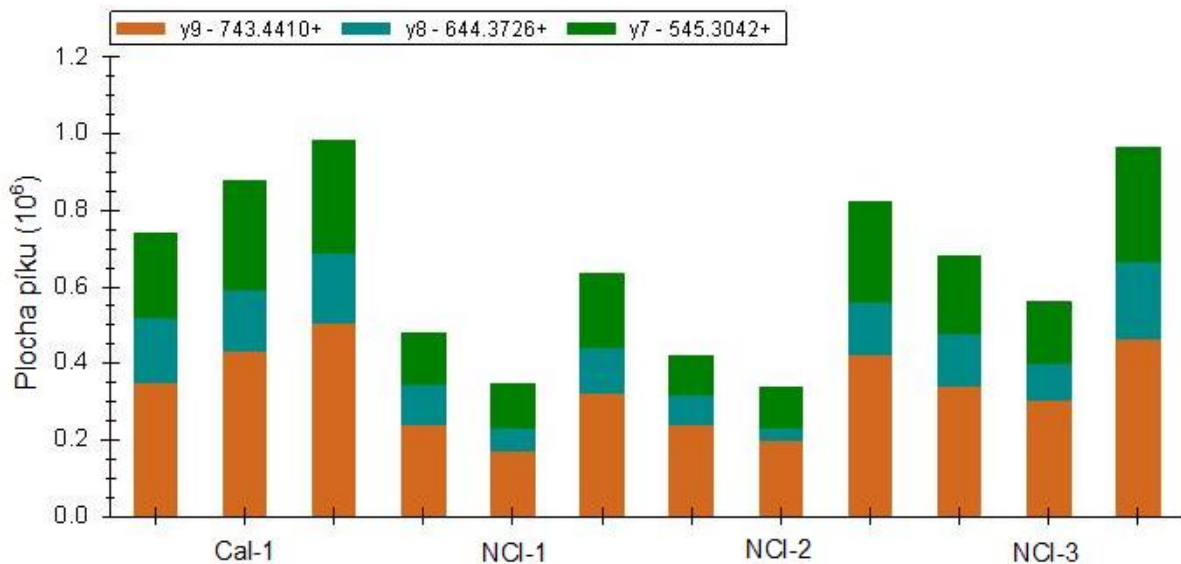
2.2.2.2. Linie s mutací G12C

Imunoprecipitační metoda u těchto linií (Calu-1, NCI-H358) nevedla k zachycení peptidu G12C (obr. 56), ačkoliv z SDS-PAGE experimentu víme, že tento mutovaný peptid je ve vzorcích lyzátů přítomný. WT peptid byl změřen v obou liniích (obr. 57). Při nezachycení mutovaného peptidu, by při použití metody v uvedeném provedení, mohlo dojít k falešně negativnímu výsledku přítomnosti mutace. Signál WT peptidu velmi pravděpodobně pochází vedle K-rasu i z H a N-ras proteinu.

Obr. 56: Plochy píku peptidu G12C pro vzorky lyzátu buněčné linie Calu-1 v jednom opakování a NCI-H358 ve třech opakováních imunoprecipitace na proteinu A získaných ze tří měření



Obr. 57: Plochy píku WT peptidu pro vzorky lyzátu buněčné linie Calu-1 v jednom opakování a NCI-H358 ve třech opakováních imunoprecipitace na proteinu A získaných ze tří měření



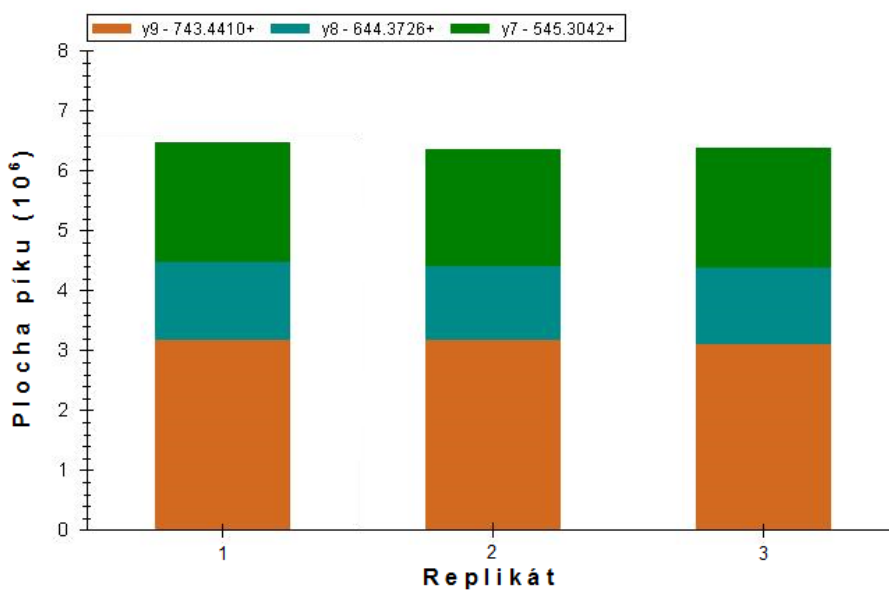
2.3. Analýza buněčného média

2.3.1. Imunoprecipitace – magnetické kuličky proteinem A

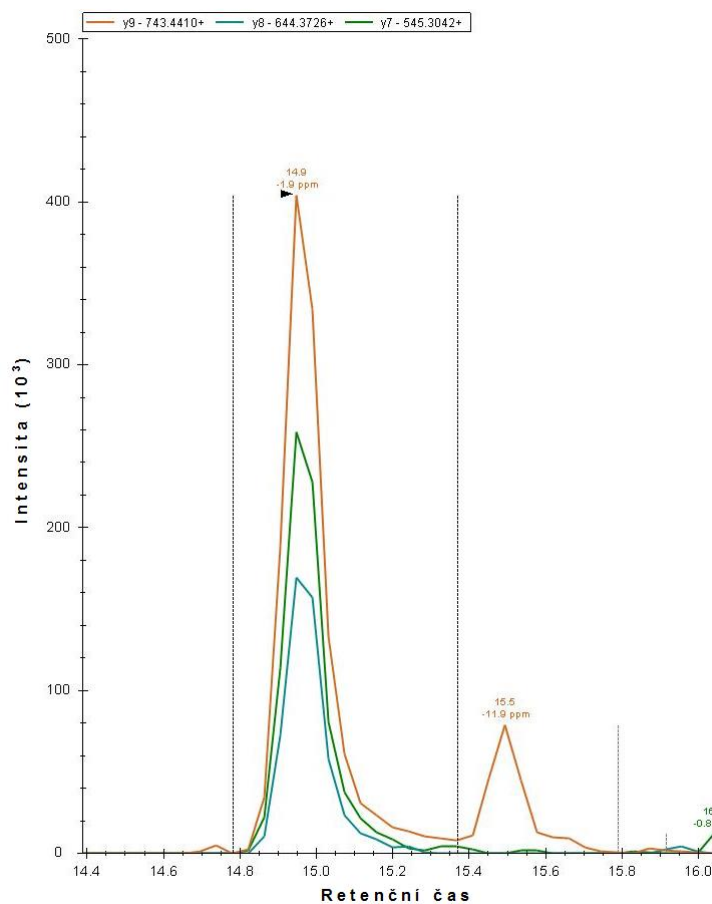
Imunoprecipitační metoda na magnetických kuličkách s imobilizovaným proteinem A byla použita i pro analýzu média po inkubaci buněk linie CCRF-CEM. Experiment byl realizován podle návodu, viz Příloha č. 7 část A. Postup se lišil pouze v tom, že inkubace probíhala v 50 ml flakonu, v němž bylo smícháno 25 ml média a 25 ml binding pufru. Množství magnetických kuliček použitých pro reakci bylo navýšeno 50krát, na 52,5 μ l. Protilátky bylo použito taktéž 50krát více ve zředění doporučeném pro imunoprecipitaci. Inkubační doba pro imunochemickou reakci byla prodloužena na 2 dny. Digescce proteinů proběhla přímo na magnetických kuličkách.

Analýza změřených dat přinesla pozitivní výsledek v detekci peptidů LVVVGAGGVGK a LVVVGADGVGK, čili WT (obr. 59 a 58) a G12D (obr. 60). V případě G12D byl detekován pouze jeden z fragmentů specifických pro pozici mutace, a to *b*₇. Zjištění, že tyto peptidy lze stanovit v buněčném médiu, může být přínosné, jelikož by mutaci K-ras proteinu bylo možné stanovit i v tělních tekutinách.

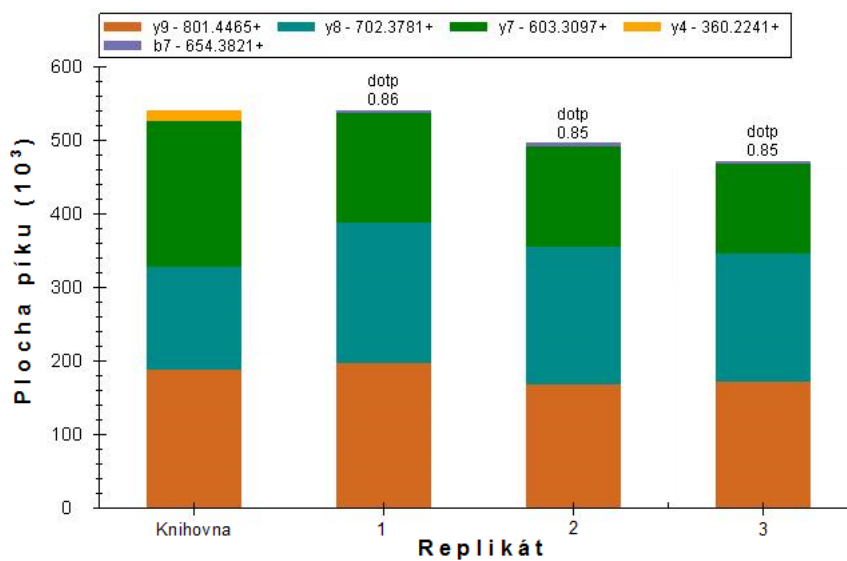
Obr. 58: Plochy píku WT peptidu nalezeného v médiu po inkubaci buněčné linie CCRF-CEM ze tří měření



Obr. 59: Pík fragmentů WT peptidu nalezeného v médiu po inkubaci buněčné linie CCRF-CEM ze tří měření



Obr. 60: Plochy píku peptidu G12D nalezeného ve vzorku média po inkubaci buněčné linie CCRF-CEM ze tří měření



III. Diskuze

1. Proteinové lyzáty

Největším úskalím práce s biologickým materiálem, zejména v oblasti proteomiky, je jeho dynamičnost. Inkubované buňky reagují na každý vnější vliv změnou složení proteinů, jejich exprese je jako odpověď na podnět zvýšena, či snížena. Tyto změny se následně projeví v připravených lyzátech. Rozdíly jsou patrné už při stanovení proteinové koncentrace lyzátů, kdy největší rozdíly nastávají u lyzátů z buněk po odlišném počtu pasáží, nebo inkubovaných z různých založených pasáží.

Vnější vlivy zahrnují skutečnosti, které se na první pohled zdají nedůležité, jako jsou tepelné výkyvy v inkubátoru při každém jeho otevření, doba, kterou láhve s buněčným obsahem stráví mimo prostředí inkubátoru při pasážování, či výměně média. Vliv má i to, jestli čerstvé médium má pokojovou teplotu, nebo jinou. Buňky v láhvi mohou být napadeny různými patogeny i přes dodržování sterilní práce.

Optimální by tedy z tohoto hlediska bylo, aby experimenty optimalizující metody byly prováděny na lyzátech, vytvořených z alikvotů buněk, odchovaných za stejných podmínek. Toho lze částečně dosáhnout tím, že se buňky namnoží do většího množství inkubačních láhví a zlyžují ve stejnou chvíli. To nám zaručí dostatečnou podobnost. V rámci experimentální práce byla snaha dodržet tento postup. Přesto ne vždy to bylo možné, jelikož je nemožné dopředu odhadnout, jaké množství lyzátu skutečně spotřebujeme, a je nepraktické vytvořit zbytečně velké množství lyzátu, které by pak nemělo využití.

Existuje velké množství lyzačních pufrů, které svým složením korespondují se zamýšleným zpracováním lyzátu. Složení některých lyzačních pufrů v sobě zahrnuje látky, které se řadí mezi prudké jedy, podléhající přísné kontrole. Tato skutečnost byla vzata v potaz při rozhodování, jaký lyzační pufr použít. Například v originálním lyzačním pufru, použitém Wangem (Wang, Q, 2011) jsou obsaženy látky jako fluorid sodný a fenylmethansulfonylfluorid. NaF je smrtelný při požití dávky 1 – 5 g (Marhold, J., 1980). Manipulace s PMSF by měla probíhat v ochranném obleku a při práci by se mělo vyvarovat veškerému kontaktu s touto látkou, včetně její inhalace (DMSF bezpečnostní list).

Použití mililitrového množství lyzátu na 50 milionů buněk vede u SDS-lyzačního pufru či lyzačního pufru použitého Wangem ke vzniku slizovité konzistence. Ke ztekutění lyzátu je následně nutné zařadit sonikační krok na ultrazvukovém homogenizátoru. Sonikace na homogenizátoru s sebou nese další zdravotní riziko, při nedodržení bezpečnosti práce, kterým je poškození sluchu.

Další nevýhodou lyzačních pufrů je častá nekompatibilita složek s činidly pro spektrofotometrické stanovení koncentrace totálního proteinu. Koncentrace některých složek musí být následně snížena vhodným ředěním pro dosažení kompatibility. Zředění však vede i ke snížení obsahu proteinů, což může absorpenci posunout mimo lineární rozsah vybrané metody.

Po zohlednění všech aspektů (toxicita složek, kompatibilita se spektrofotometrií, náročnost lyzace) byl vybrán RIPA lyzační pufr, který je kompatibilní se stanovením totálního proteinu pomocí spektrofotometrie s bicinchoninovou kyselinou bez nutnosti ředění. Použití RIPA pufru nevyžaduje homogenizaci na sonikátoru a obsahuje jen minimální množství jedovatých látek. Vytvořený lyzát s RIPA puforem nijak nebránil dalšímu zamýšlenému zpracování vzorku.

2. Srovnání metod pro izolaci K-ras proteinu

Pro analýzu buněčných lyzátů byly navrženy dvě imunoprecipitační metody a dvě metody separující proteiny na základě jejich molekulové hmotnosti. Všechny metody byly nejprve odzkoušeny na lyzátech buněk linie CCRF-CEM, jelikož tato linie byla nejlépe dostupná, protože se řadí k nejvíce používaným liniím na pracovišti, kde byla tato diplomová práce realizována.

Imunochemické reakce se řadí obecně k vysoce specifickým metodám. Podle výsledků to v této práci tak nevypadá. U obou navržených metod byla použita stejná protilátka, která na sebe váže všechny Ras proteiny. Tento fakt již výrazně snižuje její specifitu, která může stát za neúspěchem detekovat mutovaný peptid K-ras proteinu. Obě metody ve formě, jak byly realizovány, nepřinášejí požadované informace. Neměl by to být však důvod tyto metody zavrhnout. Místa, která jsou kritická a zasloužila by si zvýšenou pozornost je množství protilátky, efektivita navázání protilátky na protein A, resp. G a doba inkubace.

Zvýšené množství protilátky, spolu s efektivitou její vazby na protein A, či G, by měly být optimalizovány současně. Jelikož zvyšování množství protilátky bez znalosti, zdali se všechna dokáže navázat na protein na magnetických kuličkách, může vést ke značným ztrátám protilátky. Použité komerční magnetické kuličky měly v přiloženém datasheetu uvedenu předpokládanou vazebnou kapacitu, z níž jsme při tvorbě postupu metody vycházeli. Vazebné kapacity jsme však nemohli nikdy dosáhnout, jelikož protilátka byla používána v 30násobném zředění. Bylo by tedy vhodné toto zředění snížit a sledovat, zda snížené zředění povede ke změření intenzivnějšího signálu v hmotnostním spektrometru. Při nízkém množství použité protilátky může být její vazebná kapacita pro cílovou molekulu proteinu nasycena. Možností je i zakoupení jiné anti-Ras protilátky, případně specifitější anti-K-ras protilátky, která váže pouze K-ras protein. Efektivita vazby by mohla být zkoumána i záměnou pufru, použitého pro navázání protilátky i pro samotnou imunochemickou reakci mezi K-ras proteinem a protilátkou. Doba inkubace by mohla být jak prodloužena, tak případně zkrácena, pokud by bylo dosaženo stejných výsledků.

Eluce proteinů po imunoprecipitační reakci z magnetických kuliček by měla být optimalizována. V našem případě nedošlo k získání měřitelného signálu pro odpovídající peptidy. Jedním důvodem může být, že použité eluční činidlo (5% kyselina octová) není před přidáním trypsinu dostatečně zneutralizována a reakční směs má hodnotu pH v kyselé oblasti, v níž je trypsin inaktivní. Bylo by vhodné zejména ověřit pH finálního reakčního roztoku po přidání všech činidel z trypsinové digesce před přidáním trypsinu.

Metoda, kombinující filtraci přes membránové filtry, které propouští proteiny o molekulové hmotnosti pod 30, resp. 10 *kDa*, byla neúspěšná. Důvodem bylo zachycení K-ras proteinu na 30 *kDa* filtru, jak bylo ukázáno ve vyhodnocení naměřených výsledků. Zachycení na 30 *kDa* filtru se dá využít k normální FAST (z angl..filter-aided sample trypsinization) metodě neboli trypsinové digesce na filtru.

Elektroforetická metoda se řadí ke klasickým přístupům v přípravě proteomických vzorků. Neznamená to však, že se zde již nedá optimalizovat žádný parametr. Jak bylo patrné, tak ne vždy byly zóny vyřezány tak, aby K-ras protein byl čistě v odpovídající zóně. Toho by mohlo být dosaženo pomalejší elektroforetickou separací, při níž je použito nižší napětí, nebo změnou následujících parametrů gelu. Pokud to umožňuje vybavení, tak zvětšit délku separačního gelu a zároveň zvětšit i délku zaostřovacího gelu, aniž by to bylo na úkor

separačního gelu. Když vybavení dovoluje použít jen určitou délku gelu, tak je možností příprava gelu, který má vyšší obsah monomeru případně cross-linkeru. Vyšší obsah akrylamidu vede ve finálním gelu k odlišnému poměru polymeru a vody, což má za následek obecně menší póry. Ke zmenšení pórů vede i zvýšený obsah cross-linkeru. Běžně se používá koncentrace cross-linkeru 2,7 – 5 %. Gely v praktické části obsahovaly 3,3 % cross-linkeru.

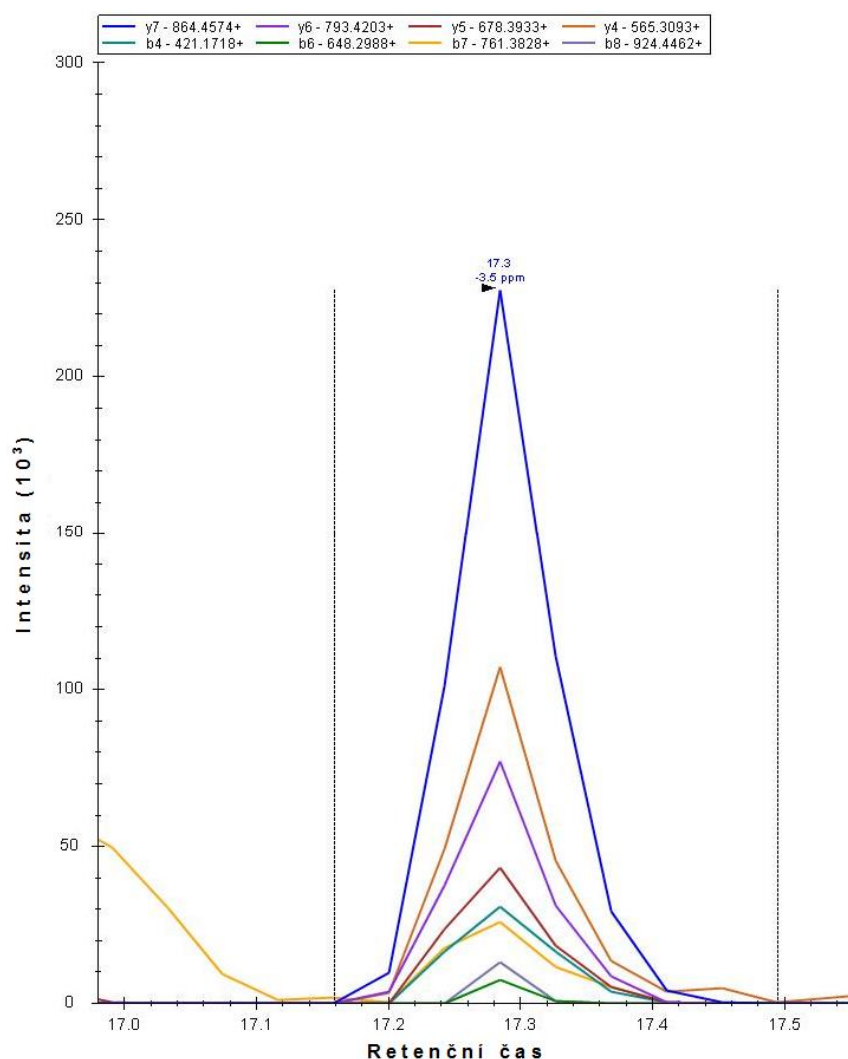
Srovnáme-li metody použité v praktické části diplomové práce, tak jako nejvhodnější prekoncentrační metoda pro analýzu mutací K-ras proteinu se jeví SDS-PAGE. Její předností je zde zejména malé množství totálního proteinu, potřebného pro identifikaci mutace na K-ras proteinu i její pozice. Ostatní metody potřebovaly vyšší množství totálního proteinu, nebo nefungovaly vůbec. Pro skutečně objektivní porovnání by bylo potřeba optimalizovat podmínky ostatních metod. Imunoprecipitační metoda na magnetických kuličkách je ve srovnání s SDS-PAGE elektroforézou méně náročná z pohledu práce laboranta, či vybavení. Problémem u magnetických kuliček by mohla být síla používaného magnetu, jelikož pro velmi jemné kuličky je nutné použít silný magnet. Obě metody mají svoje specifické nároky na vybavení, pro elektroforézu je to sestava pro její provedení a u imunoprecipitace rotátor a magnety. Toto vybavení není pro běžnou laboratoř příliš nákladné nebo bývá již její součástí. Zbylé vybavení obě metody sdílí. Nároky na chemikálie či magnetické kuličky a protilátku na provoz obou metod jsou taktéž přibližně srovnatelné. Z tohoto pohledu vychází jako vhodnější metoda optimalizovaná imunoprecipitace na magnetických kuličkách, jejíž další výhodou může být i možnost plné automatizace, která u SDS-PAGE není možná.

Imunoprecipitaci by mohla konkurovat ještě metoda FAST, protože je podobně nenáročná, zejména jak do chemikálií, vybavení i pomůcek. Z vybavení je zde nutná centrifuga s rotorem pro eppendorfky, ty ale bývají běžnou součástí laboratoří. Na rozdíl od imunoprecipitace zde není potřeba nakupovat protilátku a magnetické kuličky, ale je nutné kupovat centrifugační mikrozkmavky a membránové filtry.

Analýza buněčného média po inkubaci buněk vedla ke stanovení WT peptidu. Jak bylo uvedeno v části vyhodnocení, může tento peptid pocházet z K-ras proteinu, či z H-ras, resp. N-ras proteinu. Z naměřených dat vyplynulo, že nebyl detekován K-ras specifický peptid ani H-ras specifický peptid. Byl naměřen signál pro fragmenty N-ras unikátního peptidu (obr. 61). Tento výsledek naznačuje, že se do média uvolňuje N-ras protein.

Analýza však byla dosud provedena jen na nedostatečném počtu vzorků a nebyla nijak optimalizována. Výsledek by mohl být způsoben i tím, že doba inkubace byla příliš dlouhá a protilátka nejpevněji vážala N-ras protein a časem mohlo dojít k vytěsnění jiných proteinů z protilátky tímto proteinem. Dalším důvodem může být i možnost, že v reakční směsi dojde k rozpadu komplexu protilátka-protein A/G, či komplexu protein A/G-nosič. Množství a složení použitého binding pufru mohlo taktéž vést k podpoře zachycení N-ras proteinu na protilátce. Vysvětlení může být i velice prosté a to, že médium jako takové obsahuje N-ras protein, aniž by v něm byla inkubována buněčná linie. U analýzy média zůstává spousta nezodpovězených otázek, které by měly být zkoumány v dalším výzkumu. Na tomto místě není objektivně možné poskytnout jasný výsledek.

Obr. 61: Chromatogram vybraných fragmentů N-ras specifického peptidu ze vzorku média po inkubaci buněčné linie CCRF-CEM



IV. ZÁVĚR

Byla vyvinuta a optimalizována LC/MS metoda za účelem cílené detekce mutované a nemutované formy Kras proteinu z různých biologických vzorků. Optimalizace spočívala v nalezení vhodné fragmentační techniky, která umožnila vytvořit specifické fragmenty u syntetických mutovaných peptidů z Kras proteinu k odhalení místa a typu mutace. Navržená metoda byla ověřena na lyzátu buněčné linie CCRF-CEM, kde byl detekován mutovaný peptid G12D. Kapalinová chromatografie separovala získanou peptidovou směs 40minutovou gradientovou elucí. MS analýza probíhala v režimu tMS² metody s využitím CID fragmentace. Pro MS metodu byl pomocí značených a neznačených syntetických peptidů určen limit detekce: 22,19 *amol* pro peptid G12D a 15,26 *amol* pro peptid G12C; limit kvantifikace: 52,30 *amol* pro peptid G12D a 49,40 *amol* pro peptid G12C; recovery: (95,95 ± 0,06) % pro peptid G12D a (98,03 ± 0,07) % pro peptid G12C.

SDS-PAGE a imunoprecipitace na magnetických kuličkách s imobilizovaným proteinem A byly z navržených metod vybrány pro analýzu lyzátů dalších buněčných linií, které zahrnovaly vedle CCRF-CEM linie i linie SNU-1, NCI-H358 a Calu-1. U všech zmíněných linií byla úspěšně ověřena přítomnost mutovaného peptidu K-ras proteinu, který se shodoval s literaturou.

Imunoprecipitační metoda s proteinem A byla využita i pro analýzu buněčného média po inkubaci linie CCRF-CEM. Ve vzorku byl detekován nemutovaný peptid, který však pravděpodobně pochází z N-ras proteinu, jelikož byly nalezeny signály, odpovídající pouze N-ras specifickému peptidu.

Na základě získaných výsledků byly v diskuzi srovnány použité přístupy. Byl navržen další postup pro optimalizaci vybraných metod na základě získaných výsledků a byly doporučeny oblasti, na které by se měl zaměřit další výzkum buněčného média.

V. POUŽITÁ LITERATURA

- Abbott, A., A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis, *Nature* 402 (1990) 715-720.
- Adams, M.D., Celniker S.E., et al, The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science* 287 (2000), 2185-2195.
- Adjei, A.A., Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy, *J. Natl. Cancer. Inst.* 93 (2001) 1062-1594.
- Adjei, A.A., Farnesyltransferase inhibitors, *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* (2003) 137-144.
- Adjei, A.A., Dy, G.K., et al, A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer, *Clin. Cancer Res.* (2003) 115-123.
- Aebersold, R.H., Leavitt J., et al, Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 6970-6974.
- Aebersold, R.H., Pipes, G., et al, N-terminal and internal sequence determination of microgram amounts of proteins separated by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9 (1988) 520-530.
- Alberts, S.R., Schroeder, M., et al, Gemcitabine and ISIS-2503 for patients with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma: a North Central Cancer Treatment Group phase II trial, *J. Clin. Oncol.* (2004) 4944-4950.
- Alexander-Sefre, F., Salvesen, H.B., et al, Molecular assessment of depth of myometrial invasion in stage I endometrial cancer: a model based on K-ras mutation analysis, *Gynecol. Oncol.* (2003) 218-225.
- Amster, J., Fourier transform mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 1325-1337.
- Anderson, J.S., Mann, M., Functional genomics by mass spectrometry, *FEBS Lett.* 480 (2000) 25-31.
- Anderson, L., Sielhamer, J., A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18 (1997) 533-537.
- Anderson, N.G., Anderson, N.L., Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 17 (1996) 443-453.
- Anderson, S.M., Laboratory methods for KRAS mutation analysis, *Expert. Rev. Mol. Diagn.* (2011) 635-642.
- Andreyev, H.J., Norman, A.R., et al, Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the RASCAL II study, *Br. J. Cancer* (2001) 692-696.
- Appel R.D., Bairoch, A., et al, 2-D databases on the world wide web, *Methods. Mol. Biol.* 112 (1999) 383-391.
- Arvanitakis, M., Van Laethem, J.L., et al, Predictive factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis in association with K-ras gene mutations, *Endoscopy* (2004) 535-542.
- Barbacid, M., Ras genes, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 779-827.
- Bergo, M.O., Ambroziak, P., et al, Absence of the CAAX endoprotease Rce1: effects on cell growth and transformation, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 171-181.

- Bernards, A., Settleman, J., GAP control: regulating the regulators of small GTPases, *Trends Cell Biol.* 14 (2004) 377-385.
- Bian, D., Su S., et al, Lysophosphatidic acid stimulates ovarian cancer cell migration via Ras-MEK kinase 1 pathway, *Cancer Res.* (2004) 4209-4217.
- Bjellqvist B., Paquali C., et al, A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 14 (1993) 1357-1365.
- Boldt, S., Weidle, U.H., et al, The kinase domain of MEKK1 induces apoptosis by dysregulation of MAP kinase pathways, *Exp. Cell Res.* 283 (2003) 80-90.
- Boonstra, J., Rijken, P., et al, The epidermal growth factor, *Cell Biol. Int.* (1995) 413-430.
- Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., et al, The structural basis of the activation of Ras by Sos, *Nature* 394 (1998) 337-343.
- Bossu, P., Vanoni, M., et al, A dominant negative RAS-specific guanine nucleotide Exchange factor reverses neoplastic phenotype in K-ras transformed mouse fibroblasts, *Oncogene* (2000) 2147-2154.
- Broder, S., Venter, J.C., Sequencing zhe entire genomes of free-living organisms: the foundation of pharmacology in the new milénium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40 (2000) 97-132.
- Brogard J., Clark, A.S., et al, Akt/protein kinase B is constitvely active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation, *Cancer Res.* 61 (2001) 3986-3997.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., et al, Stable suppresion of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference, *Cancer Cell* (2002) 243-247.
- Burley, S.K., Almo, S.C., et al, Structural genomics: beyond the human genome project. *Nat. Genet.* 23 (1999) 151-157.
- Burlingame, A.L., Boyd, R.K., et al, Mass spectrometry. *Anal. Chem.* 70 (1998) 647R-716R.
- Burris III, H.A., Moore, M.J., et al, Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pankreas cancer: a randomized trial, *J. CLin. Oncol.* (1997) 2403-2413.
- Cary, L.A., Han, D.C., et al, Integrin-mediated signal transduction pathways, *Histol. Histopathol.* (1999) 1001-1009.
- Cash, P., Proteomics in medical mikrobiology. *Electrophoresis* 21 (2000) 1187-1201.
- Caulin, C., Nguyen T., et al, Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity, *Cancer Res.* (2004) 5054-5058.
- Celis, J.E., Ratz, G.P., et al, Secreted proteins from normal and SV40 transformed human MRC-5 fibroblasts: toward establishing a database of human secreted proteins. *Leukemia* 1 (1987) 707-717.
- Clarke, S., Protein isoprenylation and methylation at carboxy-terminal cysteine residues, *Annu. Rev. Biochem.* 61 (1992) 355-386.
- Clauser, K.R., Baker, P., et al, Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2871-2882.
- Coleman, W.B., Throneburg, J.W., et al, Overexpression of c-K-ras, c-N-ras and transforming growth factor beta co-segregate with tumorigenicity in morphologically transformed C3H 10T1/2 cell lines, *Carcinogenesis* (1994) 1005-1012.

- Colledge, M., Scott, J.D., AKAPs: from structure to function, *Trends. Cell Biol.* 9 (1999) 216-221.
- Corral, T., Jimenez, M., et al, NF1 modulates the effect of Ras oncogenes: evidence of other NF1 function besides its GAP activity, *J. Cell. Physiol.* 197 (2003) 214-224.
- Courchesne, P.L., Luethy, R., et al, Comparison of in-gel and on-membrane digestion methods at low to sub-pmol level for subsequent peptide and fragment-ion mass analysis using matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 18 (1997) 369-381.
- Cowley, S., Paterson, H., et al, Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells, *Cell* 77 (1994) 841-852.
- Crespo, P., Schuebel, K.E., et al, Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product, *Nature* 385 (1997) 169-172.
- Crowe, M.C., Brodbell, J.S., Infrared multiphoton dissociation (IRMPD) and Collisionally activated dissociation of peptides in a quadrupole ion trap with selective IRMPD of phosphopeptides, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 15 (2004) 1581-1592.
- Cunningham, C.C., Holmlund, J.T., et al, A phase I trial of H-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma, *Cancer* (2001) 1265-1271.
- Damer, C.K., Partridge, J, et al, Rapid identification of protein phosphatase 1 binding proteins by mixed peptide sequencing and database searching. Characterization of a novel holoenzymic form of protein phosphatase 1, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24396-24405.
- Davies, H., Bignell, G.R., et al, Mutations of the BRAF gene in human cancers, *Nature* 417 (2002) 949-954.
- Der, C.J., Krontiris, T.G., et al, Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1982) 3637-3640.
- Dergham, S.T., Dugan, M.C., et al, Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma, *Int. J. Pancreatol.* (1997) 127-143.
- DMSF bezpečnostní list, dostupný online: <http://datasheets.scbt.com/sc-3597.pdf>.
- Downward, J., PI 3-kinase, Akt and cell survival, *Semin. Cell Dev. Biol.* (2004) 177-182.
- Drumm, M.L., Collins, F.S., Molecular biology of cystic fibrosis, *Mol. Genet. Med.* (1993) 33-68.
- Dunham, I., Shimizu, N., et al, The DNA sequence of human chromosome 22, *Nature* (1999) 489-495.
- Dunn, M.J., Studying heart disease using the proteomic approach, *Drug Discov. Today* (2000) 76-84.
- Duursma, A.M., Agami, R., Ras interference as cancer therapy, *Semin. Cancer. Biol.* (2003) 267-273.
- Dykes, D.C., Brandt-Rauf, P., et al, Activated conformations of the ras-gene-encoded p21 protein: I. An energy-refined structure for the normal p21 protein complexed with GDP, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 9 (1992) 1025-1044.
- Dykes, D.C., Brandt-Rauf, P., et al, Activated conformations of the ras-gene-encoded p21 protein: II. Comparison of the computed and high-resolution X-ray crystallographic structures of Gly-12 p21, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 10 (1993) 905-918.
- Edman, P., A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* (1949) 475-483.

- Ehrhardt, A., Ehrhardt, G.R.A., et al, Ras and relatives – Job sharing and networking keep an old family together, *Exp. Hematol.* 30 (2002) 1086-1106.
- Eisenberg, D., Marcotte, E.M., et al, Protein function in the post-genomic era, *Nature* (2000) 823-826.
- Eisenstein, E., Gilliland, G.L., et al, Biological function made crystal clear – annotation of hypothetical proteins via structural genomics, *Curr Opin. Biotechnol* (2000) 25-30.
- Ekstrom, S., Onerfjord P., et al, Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification, *Anal. Chem.* (2000) 286-293.
- End, D.W., Smets, G., et al, Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro, *Cancer Res.* (2001) 131-137.
- Fenn, J.B., Mann, M., et al, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* (1989) 64-71.
- Fenyo, D., Identifying the proteome: software tools, *Curr. Opin. Biotechnol.* (2000) 391-395.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., et al, Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*, *Rd. Science* (1995), 496-512.
- Fossum, B., Olsen, A.C., et al, CD8+ T cells from a patient with colon carcinoma, specific for mutant p21-Ras-derived peptide (Gly13->Asp), are cytotoxic towards a carcinoma cell line harbouring the same mutation, *Cancer Immunol. Immunother.* (1995) 165-172.
- Friday, B.B., Adjei, A.A., K-ras as a target for cancer therapy, *Biochim. Biophys Acta* 1756 (2005) 127-144.
- Galiana, C, Lozano, J.C., et al, High frequency of Ki-ras amplification and p53 gene mutations in adenocarcinomas of the human esophagus, *Mol. Carcinog.* (1995) 289-293.
- Garcia-Rostan, G., Zhao, H., et al, Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor progression in thyroid cancer, *J. Clin. Oncol.* (2003) 3226-3235.
- Georges, R.N., Mukhopadhyay, T., et al, Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral antisense K-ras construct, *Cancer Res.* (1993) 1743-1746.
- Ghobrial, I.M., Adjei, A.A., Inhibitors of the ras oncogene as therapeutic targets. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 16 (2002) 1065-1088.
- Gjertsen, M.K., Buanes, T., et al, Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma, *Int. J. Cancer* 92 (2001) 441-450.
- Gjertsen, M.K., Gaudernack, G, et al, Mutated Ras peptides as vaccines in immunotherapy of cancer, *Vox Sang.* (1998) 489-495.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., et al, Life with 6000 genes, *Science* (1996) 563-567.
- Gorg, A., Obermaier, C., et al, The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* (2000) 1037-1053.
- Graves, P.R., Haystead, T.A.J., *Molecular Biologist's Guide to proteomics*, *Microbiol. Mol. Rev.* (2002) 39-63.
- Grey, G.D., Hernandez, O.M., et al, Antisense DNA inhibition of tumor growth induced by c-Ha-ras oncogene in nude mice, *Cancer Res.* (1993) 577-580.
- Gross, J.H., *Mass spectrometry, a textbook*, Springer, New York, 2001.

- Gygi, S.P., Rochon, Y., et al, Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, *Mol. Cell. Biol* (1999) 1720-1730.
- Haluska, P., Dy, G.K., et al, Farnesyl transferase inhibitors as anticancer agents, *Eur. J. Cancer* (2002) 1685-1700.
- Halvey, P.J., Ferrone, C.R., et al, GeLC-MRM quantitation of mutant KRAS oncoprotein in complex biological samples, *J. Proteome Res.* (2012) 3908-3913.
- Hannon, G.J., RNA interference, *Nature* (2002) 244-251.
- Heinicke, T., Radziwill, G., et al, Retroviral gene transfer of dominant negative raf-1 mutants suppresses ha-ras-induced transformation and delays tumor formation, *Cancer Gene Ther.* 7 (2000) 697-706.
- Heinke, M.Y., Wheeler, C.H., et al, Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure, *Electrophoresis* (1999) 2086-2093.
- Hsu, C.-Y., Bristow, R., et al, Characterization of active mitogen-activated protein kinase in ovarian serous carcinomas, *Clin. Cancer Res.* (2004) 6432-6436.
- Hu, Q., Noll, R.J., et al, The orbitrap: a new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 430-443.
- Huang, J.W., Chen, C.I., et al, P120-GAP associated with syndecan-2 to function as an active switch signal for Src upon transformation with oncogenic ras, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 1087-1094.
- Hunt, D.F., Yates III, J.R., et al, Protein sequencing by tandem mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1986) 6233-6237.
- Hunter, T., Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell* (1995) 225-236.
- Chang, E.H., Gonda, M.A., et al, Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (1982) 4848-4852.
- Chen, C.H., Review of a current role of mass spectrometry for proteome research, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 16-36.
- Jackson, J.H., Li, J.W., et al, Polylysine domain of K-ras 4B protein is crucial for malignant transformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 12730-12734.
- Jancik, S., Drabek, J., et al, Clinical Relevance of KRAS in human cancers, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010).
- Jansen, M., Moor de, C.H., et al, Translational control of gene expression, *Pediatr. Res.* (1995) 681-686.
- Johnson, L.M., James, K.M., et al, Identification of key residues in the A-Raf kinase important for phosphoinositide lipid binding specificity, *Biochemistry* 44 (2005) 3432-3440.
- Jonscher, K.R., Yates III, J.R., The quadrupole ion trap mass spectrometer – a small solution to a big challenge, *Anal. Biochem.* (1997) 1-15.
- Jung, E., Heller, M., et al, Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. *Electrophoresis* (2000) 3369-3377.
- Kanapaux W., FDA rejects Johnson&Johnson's application of Tipifarnib as AML treatment. Dostupné online: <http://www.firstwordpharma.com/node/192918#axzz3S8F1uDG4>.
- Karandikar, M., Xu, S., et al, MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 40120-40127.

- Karas, M., Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.* (1988) 2299-2301.
- Karp, J.E., Lancet, J.E., et al, Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase I clinical-laboratory correlative trial, *Blood* (2001) 3361-3369.
- Kato, K., Cox, A.D., et al, Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1992) 6403-6407.
- Kaufmann, R., Chaurand P., et al, Post-source decay extraction in matrix-assisted laser desorption/ionization reflectron time-of-flight mass spectrometry, Are these trade-offs? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1996) 1199-1208.
- Khleif, S.N., Abrams, J.M., et al, A phase I vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors, *J. Immunother.* 22 (1999) 155-165.
- Kim, E., Ambroziak, P., et al, Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8383-8390.
- Kirschner, M., Intracellular proteolysis. *Trends Cell Biol.* (1999) M42-M45.
- Kiyonami, R., Ravnsborg, C., et al, Easy-to-use, Plug and spray ion source for robust and reproducible ultra high pressure nanoflow LC/MS, Technical note 63546, Thermo Scientific, 2012.
- Klose, J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* (1975) 231-243.
- Konstantinopoulos, P.A., Karamouzis, M.V., et al, Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* (2007) 541-555.
- Kovarova, H., Trebichavsky, I., et al, Odkud a kam míří proteomika?, *Ziva 1* (2005) 4-5.
- Kranenburg O., Gebbink, M.F., et al, Stimulation of angiogenesis by Ras proteins, *Biochim. Biophys. Acta* (2004) 23-37.
- Krishna, R.G., Wold, F., Post-translational modification of proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* (1993) 265-298.
- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (1970) 680-685.
- Larkin, J.M.G., Eisen, T., Renal cell carcinoma and the use of sorafenib, *Ther. Clin. Risk Mana.* (2006), 87-98.
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J., Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization, *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994) 459-463.
- Lewis, T.S., Hunt, J.B., et al, Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry, *Mol. Cell* (2000) 1343-1354.
- Lin, D., Tabb, D.L., et al, Large-scale protein identification using mass spectrometry, *Biochim. Biophys. Acta* 1646 (2003) 1-10.
- Link, A.J., Eng, J., et al, Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry, *Nat. Biotechnol* (1999) 676-682.
- Lintig von, F.C., Dreilinger, A.D., et al, Ras activation in human breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* (2000) 51-62.

- Little, D.P., Speir, J.P., et al, Infrared multiphoton dissociation of large multiply charged ions for biomolecule sequencing, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2809-2815.
- Lowy, D.R., Willumsen, B.M., Function and regulation of ras, *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 851-891.
- Lu, Y., Bellgrau, L.D., et al, Mutation-selective tumor remission with Ras-targeted, whole yeast-based immunotherapy, *Cancer Res.* 64 (2004) 5084-5088.
- Maekawa, M., Nishida, E., et al, Identification of the antiproliferative protein Tob as a MAPK substrate, *J. Biol. Chem.* (2002) 37783-37787.
- Makarov, A., Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1156-1162.
- Mann, M., Hojrup, P., et al, Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases, *Biol. Mass Spectrom.* (1993) 338-345.
- Mann, M., Wilm, M., Error-tolerant identification of peptides in sequence database by peptide sequence tags, *Anal. Chem.* (1994) 4390-4399.
- Marais, R., Light, Y., et al, Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation, *EMBO J.* (1995) 3136-3145.
- Margarit, S.M., Sondermann, H., et al, Structural evidence for feedback activation by Ras. GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS, *Cell* 112 (2003) 685-695.
- Marhold, J., Přehled průmyslové toxikologie, *Anorganické látky, Acicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p., Praha, 1980.*
- Mascaux, C., Iannino, N., et al, The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis, *Br. J. Cancer* (2005) 131-139.
- McCormack, W.H., Schietz, D.M., et al, Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Anal. Chem.* (1997) 767-776.
- Mesa, R., Tipifarnib: farnesyl transferase inhibitor at a crossroads, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 6 (2006) 313-319.
- Meyer, R.G., Kam, S., et al, An open-label, prospective phase I/II study evaluating the immunogenicity and safety of a ras peptide vaccine plus GM-CSF in patients with non-small cell lung cancer, *Lung Cancer* (2007) 88-97.
- Miura, Y., Ohnami, S., et al, Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense K-ras RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity. *Cancer Lett.* (2005) 53-62.
- Moores, S.L., Schaber, M.D., et al, Sequence dependence of protein isoprenylation, *J. Biol. Chem.* (1991) 14603-14610.
- Murray, K.K., Boyd, R.K., et al, Definition of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013) *Pure Appl. Chem.* 85 (2013) 1515-1609.
- Myers, E.W., Sutton, G.G., et al, A whole-genome assembly of *Drosophila*, *Science* (2000) 2196-2204.
- Newman, A., RNA splicing, *Curr. Biol.* (1998), R903-R905.
- O'Farrell, P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J. Biol. Chem.* (1975) 4007-4021.

- Odze, R.D., Brien, T., et al, Molecular alternations in chronic ulcerative colitis-associated and sporadic hyperplastic polyps: a comparative analysis, *Am. J. Gastroenterol.* (2002) 1235-1242.
- Ogino, S., Kawasaki, T., et al, Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by pyrosequencing, *J. Mol. Diagn.* (2005) 413-421.
- Ogiso, Y., Sakai, N., et al, Suppression of various human tumor cell lines by a dominant negative H-ras mutant, *Gene Ther.* (1994) 403-407.
- Olsen, J.V., Macek, B., et al, Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis, *Nat. Methods* 4 (2007) 709-712.
- Opiteck, G.J., Lewis, K.C., et al, Comprehensive on-line LC/MS/MS of proteins, *Anal. Chem.* (1997) 1518-1524.
- Pandey, A., Lewitter, F., Nucleotide sequence databases: a gold mine for biologists, *Trends Biochem. Sci.* (1999) 276-280.
- Pandey, A., Mann, M., Proteomics to study genes and genomes, *Nature* (2000) 837-846.
- Pappin, D.D.J., Hojrup, P., et al, Rapid identification of proteins by peptide-mass finger printing. *Curr. Biol.* (1993) 327-332.
- Patton, W.F., A thousand points of light: the application of fluorescence detection technology to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics, *Electrophoresis* (2000) 1123-1144.
- Pawson, T., Nash, P., Protein-protein interactions define specificity in signal transduction, *Genes Dev.* (2000) 1027-1047.
- Pincus, M.R., Development of new anti-cancer peptides from conformational energy analysis of the oncogenic ras-p21 protein and its complexes with target proteins, *Front. Biosci.* (2004) 3486-3509.
- Prendergast, G.C., Davide, J.P., et al, Farnesyltransferase inhibition causes morphological reversion of ras-transformed cells by a complex mechanism that involves regulation of the actin cytoskeleton, *Mol. Cell. Biol.* (1994) 4193-4202.
- Qin, J., Fenyo, D., et al, A strategy for rapid, high-confidence protein identification, *Anal. Chem.* (1997) 3995-4001.
- Quilliam, L.A., Huff, S.Y., et al, Membrane-targeting potentiates guanine nucleotide Exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1994) 8512-8516.
- Rain, J.C., Selig, L., et al, The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*, *Nature* (2001) 211-215.
- Rappsilber, J., Siniosoglou, S., et al, A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry, *Anal. Chem.* (2000) 267-275.
- Reifenberger, J., Knobbe C.B., Frequent alternations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas, *Int. J. Cancer* (2004) 377-384.
- Resh, M.D., Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins, *Sub-cell. Biochem.* (2004) 217-232.
- Reuther, G.W., Der, C.J., The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree, *Curr. Opin. Cell Biol.* (2000) 157-165.
- Reynolds, P.M., Browning, G.G., et al, Von Recklinghausen's neurofibromatosis: neurofibromatosis type I, *Lancet* (2003) 1552-1554.

- Rinehart, J., Adjei, A.A., et al, Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon and pancreatic cancer, *J. Clin. Oncol.* (2004) 4456-4462.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., et al, Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation, *EMBO J.*, (1996) 2442-2451.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., et al, Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras (1997) 457-467.
- Roepstorff, P., Fohlman, J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomed. Mass Spectrom.* (1984) 601.
- Rosenfeld, J., Capdevielle J., et al, In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* (1992) 173-179.
- Roux, P.P., Ballif, B.A., et al, Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivated Ras the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004) 13489-13494.
- Rubin, G. M., Yandell, M.D., et al, Comparative genomics of the eucaryotes. *Science* (2000) 2204-2215.
- Russell, M, Lange-Carter, C.A., Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (KEKK1), *J. Biol. Chem.* (1995) 11757-11760.
- Samowitz, W.S., Curtin, K., et al, Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location stage, and survival: a population-based study, *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2000) 1193-1197.
- Sebti, S.M., Adjei, A.A., Farnesyltransferase inhibitors, *Semin. Oncol.* (2004) 28-39.
- Shalon, D., Smith, S.J., et al, A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using twocolor fluorescent probe hybridization, *Genome Res.* (1996) 639-645.
- Shaw, A.C., Rossel, M., et al, Mapping and identification of HeLa cell proteins separated by immobilized pH-gradient two-dimensional gel electrophoresis and construction of a two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database, *Electrophoresis* (1999) 977-983.
- Shevchenko, A., Chernushevich, I., et al, Rapid de novo peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labelling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1997) 1015-1024.
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., et al, Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996a) 14440-14445.
- Shevchenko, A., Wilm, M., et al, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* (1996b) 850-858.
- Shevchenko, A, Loboda, A., et al, MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research, *Ana. Chem.* (2000) 2132-2141.
- Shih, C., Padhy, L.C., et al, Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts, *Nature* (1981) 261-264.
- Shimizu, K., Goldfarb, M., et al, Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (1983) 383-387.
- Shirasawa, S., Furuse, M., et al, Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras, *Science* (1993) 85-88.

- Scheele, G.A., Two-dimensional gel analysis of soluble proteins, Characterization of Guinea pig exocrine pancreatic proteins, *J. Biol. Chem.* (1975) 5375-5385.
- Scheler, C., Li, X.P., et al, Comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of heat shock protein Hsp27 species in normal and cardiomyopathic hearts, *Electrophoresis* (1999) 3623-3628.
- Schena, M., Shalon, D., et al, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* (1995) 467-470.
- Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinase, *Cell* (2000) 211-225.
- Schlesinger, T.K., Fanger, G.R., et al, The TAO of MEKK, *Front. Biosci.* (1998) D1181-D1186.
- Sondermann, H., Soisson, S.M., et al, Structural analysis of autoinhibition in the Ras aktivátor Son of sevenless, *Cell* (2004) 393-405.
- Song, G., Ouyang, G., et al, The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival, *J. Cell. Mol. Med.* (2005) 59-71.
- Spencer, J.M., Kahn, S.M., et al, Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas, *Arch. Dermatol.* (1995) 796-800.
- Spengler, B., Kirsch, D., et al, Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1992) 105-108.
- Stacey, D.W., Cyclic D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* (2003) 158-163.
- Sun, J., Qian, Y., et al, Ras CAAX peptidomimetic FTI 276 selectively blocks tumor growth in nude mice of a human lung carcinoma with K-ras mutation and p53 deletion, *Cancer Rec.* (1995) 4243-4247.
- Tabata, S., Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature* (2000) 823-826.
- Taberero, J., Salazar, E., et al, Targeted therapy in advanced colon cancer: the role of new therapies, *Ann. Oncol.* (2004) iv55-iv62.
- Takai, Y., Sasaki, T., et al, Small GTP-binding proteins, *Physiol. Rev.* (2001) 153-208.
- Tong, W., Link, A., et al, Identification of proteins in complexes by solid-phase microextraction/multistep elution/capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry (1999) 2270-2278.
- Traini, M., Gooley, A.A., et al, Towards an automated approach for protein identification in proteome projects, *Electrophoresis* (1998) 1941-1949.
- Trauger, S.A., Webb, W., et al, Peptide and protein analysis with mass spectrometry, *Spectroscopy* 16 (2002) 15-28.
- Trueblood, C.E., Boyartchuk, V.L., et al, The CaaX proteases, Afc1p and Rce1p, have overlapping but distinct substrate specificities, *Mol. Cell. Biol.* (2000) 4381-4392.
- Tsiatis, A.C., Norris-Kirby, A., et al, Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for detection of KRAS mutations: Diagnostic and clinical implications, *J. Mol. Diagn.* (2010) 425-432.
- Tuveson, D.A., Shaw, A.T., et al, Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects, *Cancer Cell* (2004) 375-387.

- Uetz, P., Giot, L., et al, A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* (2000) 623-627.
- Unlu, M., Morgan, M.E., et al, Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts, *Electrophoresis* (1997) 2071-2077.
- Urano, T., Emkey, R., et al, Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation, *EMBO J.* (1995) 810-816.
- Vanderkerchove, J., Bauw, G., et al, Protein-blotting on polybrene-coated glass fiber sheets. A basis for acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomole quantities of protein previously separated on sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel, *Eur. J. Bioch.* (1985) 9-19.
- Vanhaesebroeck, B., Leevers, S.J., et al, Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids, *Annu. Rev. Biochem.* (2001) 535-602.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., et al, Serial analysis of gene expression, *Science* (1995) 484-487.
- Vignot, S., Faivre, S., et al, mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives, *Ann. Oncol* (2005) 525-537.
- Voice, J.K., Klemke, R.L., et al, Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell mobility, *J. Biol. Chem.* (1999) 17164-17170.
- Wanqg, J.Y., Lian, S.T., et al, Unique K-ras mutational pattern in pancreatic adenocarcinoma from Taiwanese patients, *Cancer Lett.* (2002) 153-158.
- Wang, Q., Chaerkady, R., et al, Mutant proteins as cancer-specific biomarkers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*(2011) 2444-2449.
- Wilhelm, S.M., Carter, C., et al, Trail, BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis, *Cancer Res.* (2004) 7099-7109.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., et al, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, *Methods Mol. Biol.* (1999) 531-552.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., et al, Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* (1995) 19-50.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., et al, Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects, *Electrophoresis* (1996) 830-838.
- Wilm, M., Shevchenko, A., et al, Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry, *Nature* (1996) 466-469.
- Winter-Vann, A.M., Baron, R.A., et al, A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) 4336-4341.
- Wislez, M., Spencer, M.L., et al, Inhibition of mammalian target of rapamycin reverses alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic K-ras, *Cancer Res.* (2005) 3226-3235.
- Whyte, D.B., Kirschmeier, P., et al, K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protease inhibitors, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 14459-14464.
- Yarden, Y., Baselga, J., et al, Molecular approach to breast cancer treatment, *Semin. Oncol.* (2004) 6-13.
- Yates III, J.R., Protein structure analysis by mass spectrometry, *Methods Enzymol.* (1996) 351-377.

Yates III, J.R., Mass spectrometry and the age of the proteome, *J. Mass Spectrom.* (1998) 1-19.

Yates III, J.R., McCormack, A.L., et al, Direct analysis of protein mixtures by tandem mass spectrometry, *J. Protein Chem.* (1997) 495-497.

Zhang, W., Chait, B.T., ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal. Chem.* (2000) 2482-2489.

Zhang, Y., mukhopadhyay, L.A., et al, Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype, *Hum. Gene Ther.* (1993) 451-460.

Zubarev, R.A., Kelleher, N.L., et al, Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3265-3266.

VI. POUŽITÉ VYBAVENÍ

1. Seznam biologického materiálu

SNU-1 (ATCC, Velká Británie)

NCI-H358 (ATCC, Velká Británie)

CCRF-CEM (ATCC, Velká Británie)

Calu-1 (nedohledatelné, nedohledatelné)

2. Seznam syntetických peptidů

Tab. 8: Přehled syntetických peptidů použitých v rámci diplomové práce

Označení	Sekvence	Společnost	Stát
WT*+7 <i>Da</i>	L*VVVGAGGVGK	CRB	Velká Británie
WT*	LVVVGAGGVGK*	JPT Peptide Technologies	Německo
G12D*	LVVVGADGVGK*	JPT Peptide Technologies	Německo
G12C*	LVVVGAC(cam)GVGK*	JPT Peptide Technologies	Německo
G12D	LVVVGADGVGK	Thermo Scientific	USA
G13D	LVVVGAGDVGK	Thermo Scientific	USA
G12C	LVVVGACGVGK	Thermo Scientific	USA
G12A	LVVVGAAAGVGK	Thermo Scientific	USA
G12V	LVVVGAVGVGK	Thermo Scientific	USA
G12S	LVVVGASGVGK	Thermo Scientific	USA
G12R	LVVVGAR	Thermo Scientific	USA

3. Seznam chemikálií

0,5M Tris-HCl Buffer, pH 6,8 (BioRad, USA, 161-0799)

10 x TrisGlycine/SDS (BioRad, Německo, 161-0772, elektroforetický pufr)

2-propanol (J.T.Baker, Holandsko, 9830)

30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 3,3% Crosslinker (BioRad, China, 161-0156)

Aceton(Penta, Česká republika, 606-001-00-8)

Acetonitril (J.T.Baker, USA, 9821)

Ammonium Persulphate, perodisíran amonný (Sigma Aldrich, USA, A3678-100G)

BCA - Bicinchoninic Acid Solution (Sigma Aldrich, USA, B9643-1L)

BCA - Copper(II) sulfate solution 4% (w/v) (Sigma Aldrich, USA, C2284-25ML)

Bio-Safe Coomassie Blue G250 Stain (Biorad, USA, 161-0786)

Bromfenolová modř (nezjistitelný, nezjistitelná, nezjistitelný)

BSA - hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich, USA, A7906-100G)

Butanol (lach:ner, Česká republika, 20010-ATO)

Complete mini protease inhibitor Coctail Tablets (Roshe, Německo, 4693124001)

Cystein (Sigma Aldrich, USA, C-7755)

Deoxycholát sodný (USB, USA, 21026)

Dimethyl pimelimidát dihydrochlorid (Sigma Aldrich, USA, 80490-5G)

DL-Dithiothreitol (Sigma Aldrich, Kanada, D9779-5G)

Dynabeads® Protein G (Life Technologies, Norsko, 1003D)

EDTA (Serva Electrophoresis GmbH, Německo, lot130038)

Ethanol gradient grade for LC (Merck, Německo, 603-002-00-5)

Glycerol (Sigma Aldrich, USA, G5516-1L)

HEPES (Sigma Aldrich, USA, H3375-100G, H4034-256, 4-(2-hydroxyl)-1-piperazin-ethansulfonová kyselina)

Hydrogenuhličitan amonný BioUltra (Fluka, Německo, 09830-500G)

Hydroxid amonný (Sigma Aldrich, USA, A-6899)

Igepal NP-40 (Sigma Aldrich, USA, 18896-100ml, (oktylphenoxy)polyethoxyethanol)

Jodacetamid (Sigma Aldrich, USA, I-1149)

KCl (lach:ner, Česká republika, 30076-AP0)

KH_2PO_4 (lach:ner, Česká republika, 30016-AP0)

MagReSyn™ Protein A - Protein A magnetic microspheres (ReSyn Biosciences, JAR, 59019)

McCoy's 5A Medium modifikované NaHCO_3 , bez L-glutaminu (Sigma Aldrich, USA, M8403-500ML)

Methanol gradient grade for LC (Merck, Německo, 603-001-00-X)

Mravenčí kyselina (Fluka, Německo, 56302-50ML-F)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (lach:ner, Česká republika, 30388-AP0)

NaCl (lach:ner, Česká republika, 30093-AP0)

NaOH (lach:ner, Česká republika, 10006-AP1)

Octová kyselina (Fluka, Německo, 49199-50ML-F)

Penicilin (Sigma Aldrich, USA, P3032)

Phospo-STOP phosphoprotease inhibitor Cocktail Tablets (Roshe, Německo, 4906837001)

Precision Plus Protein™ Prestained Standards Dual Xtra 2 - 250 kDa (BioRad, USA, 161-0377, MW marker - 2, 25 a 75 kDa – růžová)

Pyruvát sodný (Sigma Aldrich, USA, S8636, 100 mM)

RabMAb® Anti-RAS antibody [EP1125Y] (Abcam, USA, ab52939, monoklonální, králičí IgG)

Resolving Gel Buffer 1,5M Tris-HCl Buffer pH 8,8 (BioRad, USA, 161-0798)
RPMI 1640 Medium s L-glutaminem a NaHCO₃ (Sigma Aldrich, USA, R8758)
SDS dodecylsulfát sodný (Sigma Aldrich, Japonsko, 71729-1KG)
Streptomycin (Sigma Aldrich, USA, S9137)
TEMED (BioRad, USA, 161-0800)
Triethanolamin BioUltra (Sigma Aldrich, USA, 90278-100ML)
Triflouroctová kyselina (Sigma Aldrich, USA, 73645)
TRIS HCl (Serva Electrophoresis GmbH, Německo, Lot1300133)
Trypanová modř (Sigma Aldrich, USA, T6146-100G)
Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade (Promega, USA, V5280, digesce)
Trypsin z prasečího pankreatu (Sigma Aldrich, USA, T4799-100G, uvolnění adher. buněk)
Tween 20 (Sigma Aldrich, USA, P2287-500ml, polyethylen glykol sorbitan monolaurát)
Urea (Sigma Aldrich, USA, U-5378)

4. Seznam přístrojového vybavení

Axio Lab.A1 (Zeiss, Německo, mikroskop)
Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Německo, Centrifuga – rotor na eppendorfky)
Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo, vakuová odparka)
Dionex Ultimate 3000 Series (Thermo Scientific, USA)
Direct-Q UV 3 ZRQSV030 (Millipore, Francie, Systém produkující čistou vodu)
EASY-Spray nano-electrospray ion source (Thermo Scientific, USA)
GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, USA)
Hanna pH Electrode, Glass, General Purpose, Z655341-1EA (Sigma-Aldrich, Německo)

HeraCell 150i (Thermo Scientific, USA, CO₂ inkubátor)

HeraSafe KS 12 (Thermo Scientific, USA, Flowbox)

Magnetic stirrer MSH 300 (Biosan, Litva, magnetická míchačka)

Milli-Q Direct 8 (Millipore, Francie, Systém produkující čistou vodu)

Mini Protean Tetra Cell (BioRad, China, vana na elektroforézu)

miniSpin (Eppendorf, Německo, mini centrifuga)

MS incubator Major Science (Biotech, Česká republika, pírka)

Multi Plate Reader Enspire (Perkin Elmer, USA, Spektrofotometr)

Multi RS-60 (Biosan, Litva, multitrotator)

Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer (Thermo Scientific, USA)

Power Pac Basic (BioRad, China, zdroj pro elektroforézu)

REaX control (Heidolph, Německo, třepačka)

Rotina 420R (Hettich Zentrifugen, Německo, Centrifuga – rotor na flakony)

SBC 21 (Scaltec, Německo, analytické váhy)

Sonorex (Bandelin, Německo, ultrazvuková lázeň)

SUB Aqua 12 Plus (P-LAB, Česká republika, vodní lázeň)

Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo, Thermomixer)

UltraBASIC UB-10 Denver Instrument (P-LAB, Česká republika, pH metr)

ultra-low temperature freezer U725 (Innova, Německo)

Vi-CELL™ XR (Beckman Counter, USA, analyzátor životnosti buněk)

vortex Genie 2T complex - Vortex V-1 Plus Scientific Industries (P-LAB, Česká republika, třepačka)

5. Seznam pomůcek

100 STERICAN \varnothing 1,20 x 40 mm hypodermic-needle (Braun Melsungen AG, Německo)

Acclaim PepMap100 (C18, 5 μ m, 100 Å, 300 μ m x 5 mm; Thermo Scientific, USA)

Blue Screw Caps (Agilent Technologies, USA)

Bürkerova komůrka (P-LAB, Česká republika)

Centrifuge Tube (TPP, Švýcarsko)

EASY-Spray column Pep/Map[®] C18 (3 μ m, 120 Å, 75 μ m x 15 cm; Thermo Scientific, USA)

Krycí sklíčko na Bürkerovu komůrku (P-LAB, Česká republika)

MacroTRAP (Michrom, USA)

Microcon - Ultracel-10 Membrane, 10 kDa (Millipore, Německo)

Microcon - Ultracel-30 Membrane, 30 kDa (Millipore, Německo)

Parafilm "M" (Bemis, USA)

Screw Caps Vials clear 100/PK (Agilent Technologies, EU)

Tissue Culture Testplate 96F (TPP, Švýcarsko)

Vial Inserts 250 μ l (Agilent Technologies, USA)

A další běžné vybavení laboratoře.

6. Seznam softwaru

Skyline (2.6.1.6899, 64-bit, MacCoss Lab, USA)

Thermo Xcalibur (3.0.63, Thermo Scientific, USA)

VII. PŘÍLOHY

Příloha č. 1

Příprava sterilního média a PBS pufru

A) Příprava média pro kultivaci buněčné linie

Chemikálie: složky příslušných médií podle údajů o buněčných liniích, 70% ethanol, dezinfekční roztok, antibiotika

Pomůcky: flowbox, automatické pipety, špičky, sterilní láhev, uzávěry se septem, alobal, membránový filtr (porozita 0,22 μm), vývěva

Postup:

- 1) Ve flowboxu smícháme příslušné složky média, např. pro buněčnou linii CCRF-CEM přidáme do komerčního RPMI média (500 *ml*), které obsahuje vše nezbytné pro výživu buněk odpovídající množství antibiotik (penicilin a streptomycin)
- 2) Medium přefiltrujeme přes membránový filtr umístěný na sterilní lahvi a připojený na vývěvu
- 3) Přefiltrované medium rozlijeme do dvou lahví o objemu 250 *ml* a uzavřeme víčkem se septem
- 4) Zátku vydezinfikujeme 70% ethanolem a obalíme kusem alobalu
- 5) Láhev při vytahování z flowboxu oťreme dezinfekčním roztokem a uskladníme v lednici

B) Příprava 10x PBS pufru

Chemikálie: chlorid sodný, chlorid draselný, deionizovaná voda, dihydrogenfosforečnan draselný, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný

Pomůcky: analytické váhy, váženky, kovové lžičky a špachtle, skleněná láhev, membránový filtr, vývěva, pH metr, magnetická míchačka, míchadlo, odměrný válec, automatická pipeta, špičky, flowbox

Postup:

- 1) Podle tab. 9 si připravíme navážky jednotlivých solí.

Tab. 9 : Složky 10x PBS pufru

Chemikálie	Navážka [g]
NaCl	800
KCl	2
KH_2PO_4	2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	32,1

- 2) Navážky rozpustíme v 800 ml deionizované vody a upravíme pH na hodnotu 7,4 pomocí jednomolárních roztoků HCl resp. NaOH
- 3) Doplníme deionizovanou vodou na konečný objem 1000 ml
- 4) Sterilujeme ve flowboxu pomocí filtrace přes membránový filtr o porozitě 0,22 μm
- 5) Sterilní PBS pufr skladujeme v lednici, pro práci je nutné provést ředění – 1 díl 10x PBS pufru smícháme s 9 díly deionizované vody

Příloha č. 2

Pasážování buněčných linií

A) Pasážování adherentních buněk (NCI-H358, Calu-1)

Pasážování provádíme při snížení nutriční hodnoty média a podle potřeby buňky rozdělujeme do více kultivačních lahví (max. 80% pokrytí dna kultivační lahve).

S kultivačními lahvemi pracujeme v biohazard flowboxu a dodržujeme pravidla práce ve sterilních podmínkách!

Chemikálie: příslušné médium podle požadavků dané buněčné linie, roztok trypsin/EDTA (2,5 g trypsinu a 0,37 g EDTA v 1000 μ l 1x PBS), fyziologický roztok (0,9% roztok NaCl)

Pomůcky: inkubátor, flowbox, kultivační láhve, mikroskop, injekční stříkačky, jehly

Postup:

- 1) Buňky vytáhneme z inkubátoru a pod mikroskopem je zkontrolujeme (vyloučení kontaminace)
- 2) Obsah kultivační lahve promícháme a nutričně vyčerpané médium vylijeme do odpadu
- 3) Buňky zachycené na dně lahve promyjeme alespoň 2x fyziologickým roztokem
- 4) Do baňky nalijeme odpovídající objem trypsinového roztoku:
 - a. kultivační láhev o ploše 25 cm^2 : 0,4 – 0,5 ml
 - b. kultivační láhev o ploše 75 cm^2 : 0,8 – 1,0 ml
 - c. kultivační láhev o ploše 150 cm^2 : 1,6 – 2,0 ml
- 5) Láhve vložíme na přibližně 8 minut do inkubátoru a průběžně sledujeme průběh uvolňování buněk proti světlu či pod mikroskopem. Pro úplné uvolnění je nezbytné mechanické uvolnění úderem dlaní do kultivační lahve
- 6) Po úplném uvolnění buněk nalijeme příslušné médium v objemu:
 - a. kultivační láhev o ploše 25 cm^2 : 5 ml
 - b. kultivační láhev o ploše 75 cm^2 : 15 ml

c. kultivační láhev o ploše 150 cm^2 : 35 ml

- 7) Buňky nyní můžeme nechat dál růst, nebo je rozdělíme do více lahví, nebo je zčásti či úplně spotřebujeme v zamýšleném experimentu. Po rozlití do více lahví je následně nutné doplnit objem media na hodnoty uvedené v kroku 6.

B) Pasážování suspenzních buněk (CCRF-CEM, SNU-1)

Chemikálie: příslušné médium podle požadavků dané buněčné linie

Pomůcky: inkubátor, flowbox, kultivační láhve, mikroskop, injekční stříkačka, jehla

Postup:

- 1) Buňky vytáhneme z inkubátoru a pod mikroskopem zkontrolujeme (vyloučení kontaminace)
- 2) Obsah láhve promícháme
- 3) $1/3$ buněk přenášíme do nové láhve a doplníme čerstvým médiem do objemu dle kroku 6 pasážování adherentních buněk

Poznámka:

Platí následující údaje (tab. 10) pro počet buněk CCRF-CEM a doba využitelnosti média do další pasáže. Limitní koncentrace je přibližně 2 miliony buněk/ ml . Ke zdvojení kolonie dochází za 1 den. Nižší koncentrace buněk, než uvedených 300 tisíc buněk/ ml , není pro inkubaci buněk vhodná.

Tab. 10: Využitelnost média podle počtu inkubovaných buněk

Počet buněk na ml	Využitelnost média [dn]
300 tisíc	2 – 3
1 milion	1

Příloha č. 3

Počítání buněk a stanovení jejich životnosti

A) Mikroskopová metoda

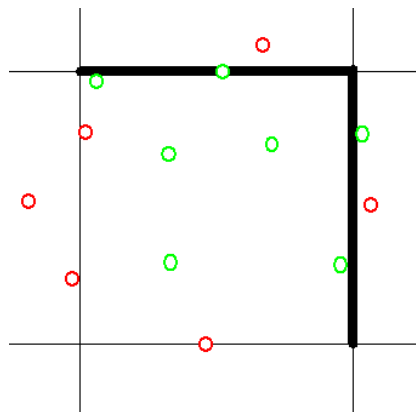
Chemikálie: 10x PBS (příprava viz protokol: Příloha č. 1 část B), trypanová modř (0,5% trypanová modř v 1x PBS), buněčná suspenze

Pomůcky: flowbox, mikroskop, Bürkerova komůrka, mřížka, automatické pipety, špičky,

Postup:

- 1) Z dobře promíchané buněčné suspenze odebereme 10 μl a na Bürkerově komůrce je smícháme se stejným objemem trypanové modři a důkladně pipetou promícháme
- 2) Pod krycí sklíčko kápneme 10 μl buněčné suspenze s trypanovou modří a umístíme na mikroskop
- 3) Pracujeme při zvětšení až 45x
- 4) Počítáme buňky ležící uvnitř 25 různých čtverců (např. 2 řádky a jeden čtverec z jiného řádku). Pokud se buňka uvnitř čtverce dotýká stěny, tak do celkového počtu zahrnujeme jen ty, které se dotýkají jedné ze dvou zvolených přilehlých stran, ostatní vyřadíme. Pokud se buňka dotýká jedné ze zvolených přilehlých stran a neleží uvnitř čtverce, je taktéž zahrnuta do celkového počtu

Obr. 62: Vzor pro počítání buněk ve čtvercích.



Buňky započítané (zeleně) a nezapočítané (červeně), zvolené strany (označeny silnou čarou).

- 5) Získaný počet se vynásobí faktory 2 a 10000 a vypočtená hodnota odpovídá počtu buněk v jednom mililitru

- 6) Životnost buněk se určí tak, že do celkového počtu započítáme i počet mrtvých buněk (buňky s tmavým středem) a vypočteme procentuální zastoupení živých buněk

B) Využití Vi-CELLu (pouze CCRF-CEM)

Chemikálie: fyziologický roztok (0,9% (w/v) NaCl), trypanová modř (0,5 g trypanové modři ve 125 ml fyziologického roztoku – umístěno v zásobníku přístroje), buněčná suspenze

Pomůcky: flowbox, Vi-Cell, eppendorka (1,5 ml), automatická pipeta, špičky

Postup:

- 1) Z dobře promíchané buněčné suspenze odebereme 0,5 ml a přeneseme do eppendorfky (1,5 ml)
- 2) Eppendorfku uzavřeme a přeneseme z flowboxu k přístroji, kde ji otevřenou vložíme do sampleru
- 3) Postupujeme podle návodu pro obsluhu přístroje – v příslušném softwaru vybereme metodu pro počítání a měření viability buněk příslušné linie, objemy, pozice a počet vzorků (metoda měření je již přednastavena), zahájíme měření a obdržíme výsledek tj. počet buněk v ml a jejich viabilitu v procentech

Příloha č. 4

Příprava buněčných lyzátů

! S buňkami pracujeme vždy ve flowboxu, přenosy probíhají v dobře uzavřených nádobách!

Chemikálie: 10x PBS pufr (příprava viz protokol: Příloha č. 1 část B), dezinfekční prostředek, Tris/HCl, chlorid sodný, Igepal (NP-40), deoxycholát sodný, dodecylsírán sodný (SDS), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), proteasové inhibitory, fosfoproteasové inhibitory, deionizovaná voda, trifluoroctová kyselina, hydroxid amonný, led

Roztoky:

RIPA lyzační pufr:

Tab. 11: Složky RIPA lyzačního pufru

Chemikálie	Koncentrace	Navážka
Tris/HCl	50 mmol/l	302,8 mg
NaCl	150 mmol/l	438,3 mg
Igepal (NP-40)	1 %	50 μ l
Deoxycholát sodný	0,5 %	250 mg
SDS	0,1 %	50 mg
EDTA	1 mmol/l	14,5 mg

Navážené chemikálie rozpustíme v deionizované vodě a doplníme do 50 ml, pH = 8, těsně před použitím rozpustíme v pufru 1 tabletu proteasových a fosfoproteasových inhibitorů.

pH₊: 10 % hydroxid amonný: 20 μ l hydroxidu amonného v 1980 μ l deionizovaná vody

pH₋: 10 % trifluoroctová kyselina: 20 μ l trifluoroctové kyseliny v 1980 μ l deionizovaná vody

Pomůcky: analytické váhy, váženky, kovové lžičky, flakony, automatické pipety, špičky, kádinky, odměrný válec, automatické pipety, špičky, pH metr, eppendorfky, flowbox, centrifuga s rotorem na flakony, centrifuga s rotorem na eppendorfky, nádoba na led, buničina, magnetická míchačka, magnetické míchadlo, vortex

Postup:

1. Adherentní buňky uvolníme ze dna nádoby inkubací s trypsinem, jako při pasážování (viz protokol: Příloha č. 2), suspenzní buňky lehce zamícháme. Spočítáme počet živých buněk (využití mikroskopu – viz protokol: Příloha č. 3 část A) nebo spočítáme všechny buňky a jejich viabilitu (využití přístroje Vi-CELL – viz protokol: Příloha č. 3 část B)
2. Ze získaného počtu živých buněk si buněčnou suspenzi rozaliquujeme do 50 ml flakonů podle požadovaného počtu buněk (25 či 50 milionů)
3. Flakony s buněčnou suspenzí centrifugujeme: 1600 *ot. za min.* / 5 *min* / 25 °C
4. Po vytažení slijeme médium do odpadní lahve s příslušným dezinfekčním prostředkem určeným pro likvidaci biohazard odpadu, necháme odkapat na buničině dnem vzhůru (paleta buněk by měla držet na dně flakonu)
5. V odkapaných flakonech rozklepeme v rukou paletu, přidáme 20 ml 1x PBS pufru a rozmícháme
6. Kroky 4. a 5. opakujeme ještě dvakrát
7. Po třetím promytí přidáme po rozklepání palety místo 1x PBS pufru 1 ml RIPA lyzačního pufru, důkladně rozmícháme a přeneseme suspenzi do eppendorfky (1,5 ml), kterou umístíme na led
8. Buňky lyzujeme po dobu 30 minut a každých 10 minut eppendorfky vortexujeme
9. Eppendorfky po lyzaci umístíme do vychlazené centrifugy a stočíme: 12 000 *g* / 30 *min* / 4 °C
10. Supernatant opatrně přeneseme do nové označené eppendorfky a zamrazíme (-20 °C pro další zpracování, -80 °C dlouhodobé uskladnění)

Příloha č. 5

Stanovení proteinové koncentrace pomocí bicinchoninové kyseliny

Chemikálie: hovězí sérový albumin (2 mg/ml), RIPA lyzační pufr (viz protokol: Příloha č. 4), deionizovaná voda, buněčné lyzáty o neznámé koncentraci totálního proteinu, roztok A (roztok bicinchoninové kyseliny), roztok B (4% pentahydrát síranu měďnatého)

Pomůcky: 96jamková destička, eppendorfky, pícka, automatické pipety, špičky, flakony, spektrofotometr

Postup:

- 1) Ze zásobního roztoku BSA si připravíme sadu kalibračních roztoků podle tab. 12 a do připravené 96jamkové destičky přeneseme 25 μ l každého kalibrantu ve třech opakováních

Tab. 12: Složení kalibračních roztoku BSA

	$V_{\text{BSA}} [\mu\text{l}]$	$V_{\text{H}_2\text{O}} [\mu\text{l}]$	$c_{\text{BSA}} [\mu\text{g/ml}]$
A	50	50	1000
B	40	60	800
C	30	70	600
D	20	80	400
E	15	85	300
F	10	90	200
G	5	95	100
H	2	98	40

- 2) Z lyzátů připravíme 100 μ l roztoků 5x a 10x naředěných a do jamek nadávkuje 25 μ l ve třech opakováních
- 3) Do jamek nadávkuje 25 μ l neředěného lyzátu opět ve třech opakováních
- 4) Jako blank pro kalibrační roztoky slouží voda, pro vzorky RIPA pufr v požadovaném zředění, tj. 1x, 5x a 10x. Dávkuje 25 μ l ve třech opakováních

- 5) Spočítáme počet zaplněných jamek a podle jejich počtu si připravíme roztok činidla smícháním roztoku A a B v poměru 49:1. Do každé jamky následně dávkujeme 200 μl důkladně promíchaného roztoku činidla. Hraniční hodnoty zachycuje tab. 13

Tab. 13: Objemy činidel pro 1 a 96 jamek

Počet jamek	A [μl]	B [μl]	Celkový objem [μl]
1	196	4	200
96	18816	384	19200

- 6) Destičku vložíme do pícky a inkubujeme 15 minut při 60 °C
- 7) Absorbanci měříme při vlnové délce 562 nm
- 8) Z absorbance kalibračních roztoků (obr. 63) o známé koncentraci BSA sestavíme kalibrační křivku a podle její rovnice vypočítáme proteinovou koncentraci lyzátu, kterou v posledním kroku vynásobíme faktorem zředění. Hodnoty absorbance standardů korigujeme na absorbanci blanku tvořeného vodou a absorbanci vzorků korigujeme na absorbanci blanku tvořeného RIPA pufrem v příslušném zředění.

Obr. 63: Ukázka oblasti 96jamkové destičky se standardy včetně hodnoty jejich absorbance.

	1	2	3
A	1.736	1.733	1.724
B	1.461	1.431	1.429
C	1.093	1.069	1.040
D	0.788	0.813	0.797
E	0.640	0.634	0.640
F	0.495	0.504	0.526
G	0.320	0.321	0.323
H	0.090	0.088	0.088

Příloha č. 6

SDS-PAGE

A) Příprava gelu a elektroforetická separace

Chemikálie: Tris/HCl, dodecylsírán sodný (SDS), glycerol, dithiothreitol (DDT), bromfenolová modř, 10x TrisGlycine pufr, 70% ethanol, 30% Acrylamide/Bis Solution, 1,5 M-Tris pH 8, 1,0 M-Tris pH 6,8, TEMED, peroxosírán amonný (APS), butanol, deionizovaná voda

Roztoky:

10% SDS: 0,2 g SDS rozpustíme ve 2 ml deionizované vody

10% APS: 0,2 g APS rozpustíme ve 2 ml deionizované vody

5x loadovací SDS pufr: Složení na přípravu 10 ml roztoku:

Tab. 14: Složky 5x loadovacího SDS pufru

Chemikálie	Koncentrace	Navážka
Tris/HCl	250 mM	302,8 mg
SDS	10 %	1,0 g
Glycerol	30 %	3 ml
DTT	0,5 M	771,3 mg
Bromfenolová modř	0,02 %	2 mg

Navážky rozpustíme v deionizované vodě a doplníme do 10 ml.

Elektrodový pufr: 100 ml 10x TrisGlycine pufru v 900 ml deionizované vody

Pomůcky: flakony, eppendorfky, automatické pipety, špičky, vortex, Termomixer, elektroforetická vana, odměrný válec, stříčka v deionizovanou vodou, stojan na nalévání gelu, elektroforetická sklíčka, hřebínek, držák s elektrodami, plastová stěrka, Petriho miska, kabely, zdroj napětí, buničina

Postup:

- 1) Skla důkladně umyjeme (70% ethanol, destilovaná voda) a sestavíme aparaturu na nalévání gelu

- 2) Mezi skla nalijeme stříčkou destilovanou vodu, abychom ověřili těsnost sestavy. Pokud dochází k vytékání vody (pokles hladiny vody mezi skly), rozebereme a znovu sestavíme, dokud voda nebude vytékat
- 3) Namícháme si roztoky pro separační a zaostřovací gel, jak je uvedeno v tab. 15, resp. 16, ale bez přídavku APS

Tab. 15: Složení 12% separačního gelu.

	1 gel (7,5 ml)	2 gely (15 ml)	3 gely (22,5 ml)	4 gely (30 ml)
H ₂ O	2,475 ml	4,950 ml	7,425 ml	9,900 ml
30% Acrylamide/Bis	3,000 ml	6,000 ml	9,000 ml	12,000 ml
1,5 M-Tris (pH 8,8)	1,875 ml	3,750 ml	5,625 ml	7,500 ml
10% SDS	75 μ l	150 μ l	225 μ l	300 μ l
TEMED	3 μ l	6 μ l	9 μ l	12 μ l
10% APS	75 μ l	150 μ l	225 μ l	300 μ l

Tab. 16: Složení zaostřovacího gelu.

	5 ml	10 ml
H ₂ O	3,500 ml	7,000 ml
30% Acrylamide/Bis	0,825 ml	1,650 ml
1,0 M-Tris (pH 6,8)	0,625 ml	1,250 ml
10% SDS	50 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	20 μ l
10% APS	50 μ l	100 μ l

- 4) Z aparatury vylijeme všechnu vodu a zbylou odsajeme buničinou dosucha
- 5) Do roztoku pro separační gel přidáme APS a zamícháme na vortexu a co nejrychleji přeneseme pipetou mezi skla tak, aby v gelu nevznikly bubliny vzduchu. Gel nalijeme do přibližně $\frac{3}{4}$ výšky skel
- 6) Nalítý gel převrstvíme butanolem vytřepaným s vodou (horní vrstva) až po okraj skel. Butanol zajistí dokonale rovnou hladinu gelu

- 7) Gel necháme tuhnout alespoň 45 minut
- 8) Vylijeme butanol, vypláchneme prostor mezi skly vodou a přebytečnou vodu odsajeme buničinou dosucha
- 9) Do roztoku pro zaostřovací gel přidáme APS a zamícháme na vortexu a co nejrychleji přeneseme pipetou mezi skla až po okraj tak, aby v gelu nevznikly bubliny vzduchu
- 10) Okamžitě po nalití zaostřovacího gelu do něj vložíme hřebínek na vytvoření jamek a necháme se zasunutým hřebínkem tuhnout minimálně 20 minut
- 11) Sestavíme aparaturu pro provedení elektroforézy, skla s gelem vložíme do držáku tak, že menší sklíčko je uvnitř
- 12) Do elektroforetické vany nalijeme část elektrodového pufru, pufrem naplníme i prostor mezi dvěma gely v držáku (hladina musí sahat nad menší sklíčko)
- 13) Opatrně vysuneme z gelu hřebínek, nesmí dojít ke zborcení jamek
- 14) Do jamek dávkujeme vzorky o požadovaném množství celkového proteinu předem povařené 4 minuty na 95°C s 5x loadovacím SDS pufrem v poměru (4:1) v Termomixeru, dávkovaný objem vzorku musí respektovat objem jamek (max 20 μ l)
- 15) Spustíme zdroj napětí s nastavením na 100 V, které necháme po celou dobu separace, nebo můžeme po přechodu vzorků do separačního gelu zvýšit napětí na 120 V, kontrolujeme případný úbytek elektrolytu a úroveň bromfenolové modři, podle níž určíme okamžik pro ukončení separace
- 16) Po ukončení elektroforézy odpojíme elektroforetickou vanu od zdroje napětí, vyjmeme držák s gely a vylijeme elektrolyt, skla s gelem vytáhneme z držáku
- 17) Pomocí plastové stěrky opatrně rozevřeme skla, odřízneme zaostřovací gel a vyhodíme jej do odpadu, samotný gel opatrně překlopíme do Petriho misky a překročíme k jeho obarvení

B) Barvení gelu roztokem Coomassie Blue a skenování gelu

Chemikálie: Coomassie Brilliant Blue R-250, methanol, kyselina octová, deionizovaná voda

Roztoky:

Staining roztok: Složení na příprava 1000 ml roztoku (tab. 17):

Tab. 17: Složení staining roztoku

Chemikálie	Složení [%]	Navážky
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,1	1 g
Methanol	50	500 ml
Octová kyselina	10	100 ml
Deionizovaná voda	70	400 ml

Destaining roztok: Složení na přípravu 1000 ml roztoku (tab. 18):

Tab. 18: Složení destaining roztoku

Chemikálie	Složení [% (v/v)]	Potřebný objem [ml]
Methanol	50	500
Octová kyselina	10	100
Deionizovaná voda	40	400

Pomůcky: Petriho miska, skleněné láhve s uzávěrem, elektrická třepačka, plastová stěrka, automatická pipeta a špičky, skener gelů, stříčka s destilovanou vodou, sklíčko, buničina

Postup:

- 1) Ke gelu v Petriho misce nalijeme tolik staining roztoku, aby byl celý gen ponořený
- 2) Misku uzavřeme víčkem a umístíme na třepačku, kde jej necháme za mírného třepání barvit přibližně hodinu
- 3) Po obarvení odebereme staining roztok zpět do zásobní láhve pomocí pipety (o max. objemu 5 ml)
- 4) Do misky nalijeme trochu destaining roztoku a vypláchneme přebytečný staining roztok

- 5) Gel zalijeme destaining roztokem a necháme jej na třepačce odbarvovat 30 minut a poté vylijeme do odpadu
- 6) Krok 5 opakujeme, dokud intenzita zbarvení pozadí gelu není uspokojivě nízká a bandy proteinů nejsou dostatečně viditelné
- 7) Zapneme skener a na skleněnou plochu nalijeme trochu destilované vody ze stříčky
- 8) Přeneseme na sklo skeneru gel tak, aby pod gelem nebyly žádné bubliny. Pokud je gel zkroucený, je možné použít menší sklíčko z elektroforézy a položit ho na gel zalitý vodou a následně i sklíčko zalít vodou
- 9) V softwaru ke skeneru vybereme metodu pro skenování gelů obarvených Coomassie Blue, uděláme pre-scan, vybereme oblast, kde leží gel, případně upravíme pozici gelu na skle skeneru
- 10) Naskenujeme gel a uložíme
- 11) Ze skla skeneru sejmeme sklíčko, gel vrátíme do Petriho misky a zalijeme jej vodou (zpracujeme jej dále, nebo uskladníme v lednici do dalšího dne)
- 12) Sklo skeneru vysušíme buničinou, vypneme přístroj

C) Trypsinová digesce proteinů v gelu

Chemikálie: acetonitril, hydrogenuhličitan amonný, dithiothreitol, jodacetamid, trypsin (100 μg trypsinu ve 200 μl 50 mM kyseliny octové), trifluoroctová kyselina, kyselina mravenčí, hydroxid amonný, deionizovaná voda

Roztoky:

50% ACN: smícháme 20 ml acetonitrilu s 20 ml deionizované vody

ABC: 200 mg hydrogenuhličitanu amonného (50 mM) v 50 ml deionizované vody, pH = 8

DTT: 15,4 mg dithiothreitolu (100 mmol/l) v 1000 μl ABC

IAA: 13,89 mg jodacetamidu v 1500 μl ABC

TRY: na 1 vzorek: 2 μl trypsinu ve 198 μl ABC

TFA: 10% trifluoroctová kyselina: 20 μl trifluoroctové kyseliny v 1980 μl deionizované vody

pH₊: 10 % hydroxid amonný: 20 μl hydroxidu amonného v 1980 μl deionizované vody

pH₋: viz TFA

eluční roztok: 60% ACN s 0,1% FA: 1200 μl acetonitrilu a 2 μl kyseliny mravenčí s 798 μl deionizované vody

Pomůcky: skleněná destička, jednorázové skalpely, eppendorfky, stříčka s deionizovanou vodou, automatické pipety a špičky, Thermomixer, ultrazvuková lázeň, vakuová odparka, píčka

Postup:

- 1) Gel přeneseme na sklo s trochou vody a pomocí skalpelu vyřízneme oblasti:
 - a. mezi bandy MW markeru 20 a 25 kDa – umístění K-ras proteinu
 - b. mezi bandy MW markeru 15 a 20 kDa – kontrola pod oblastí K-ras proteinu
 - c. mezi bandy MW markeru 25 a 37 kDa – kontrola nad oblastí K-ras proteinu
 - v případě b a c se snažíme vyříznout stejně velké oblasti jako v případě a
 - d. celý pruh kromě oblasti mezi bandy MW markeru 15 a 37 kDa – příprava peptidové směsi bez obsahu peptidů z K-ras proteinu

- 2) Vyříznutou oblast přeneseme do kapky vody a nařežeme na kostky o hraně cca 1 mm
- 3) Nakrájený gel následně přeneseme do eppendorfky tak, aby všechny kousky byly ponořeny pod hladinou (případně dolijeme vodu ze stříčky)
- 4) Po připravení všech eppendorfek odsajeme pipetou vodu a vyměníme ji za ABC (100 či 200 μ l – všechny kousky gelu musí být ponořeny)
- 5) Přidáme 10 μ l DDT a inkubujeme v Thermomixeru při 50 °C po dobu 20 minut
- 6) Po inkubaci vytáhneme eppendorfky z Thermomixeru a necháme je vychládnout na laboratorní teplotu
- 7) Přidáme 10 μ l IAA a inkubujeme za laboratorní teploty ve tmě po dobu 20 minut
- 8) Odsajeme roztok z eppendorfek
- 9) Napipetujeme 100 či 200 μ l 50% ACN a umístíme eppendorfky do ultrazvukové lázně a sonikujeme 5 minut (dojde k uvolnění barviva a částečné dehydrataci gelu)
- 10) Tekutinu z eppendorfky odsajeme do odpadu a rehydratujeme stejným objemem ABC v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut.
- 11) Kroky 7, 8 a 9 cyklicky opakujeme, dokud není vymyto veškeré modré barvivo
- 12) Po poslední rehydrataci odsajeme tekutinu z eppendorfek a gely dehydratujeme 100% ACN, podle potřeby tento krok opakujeme 2x. Dehydratovaný gel je čistě bílý a kostky jsou zmenšeny
- 13) Kostky gelu rehydratujeme 200 μ l TRY a inkubujeme při 37 °C přes noc
- 14) Do čistých eppendorfek přeneseme tekutinu po inkubaci
- 15) Peptidy eluujeme 200 μ l elučního roztoku v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut
- 16) Tekutinu přeneseme do odpovídající eppendorfky s roztokem po inkubaci
- 17) Zopakujeme kroky 15 a 16
- 18) Smíchané roztoky v eppendorfce částečně či úplně odpaříme (snížení obsahu ACN) a naředíme alespoň 200 μ l ABC
- 19) Vzorky purifikujeme přes kolonku MacroTRAP (viz protokol: Příloha č. 10)

Příloha č. 7

Imunoprecipitace na magnetických kuličkách

A) S imobilizovaným proteinem A

Chemikálie: deionizovaná voda, magnetické kuličky s imobilizovaným proteinem A, anti-Ras protilátka, Tris-HCl, NaCl, Tween20, hydroxid amonný, trifluoroctová kyselina, kyselina octová, hydrogenuhličitan amonný, dithiothreitol, jodacetamid, cystein, methanol, trypsin (100 μ g trypsinu ve 200 μ l 50 mM kyseliny octové)

Roztoky:

Binding pufr: Složení na přípravu 50 ml roztoku (tab. 19):

Tab. 19: Složky binding pufru

Chemikálie	Složení	Navážky
Tris-HCl	50 mM	302,8 mg
NaCl	150 mM	438,3 mg
Tween 20	0,05 %	25 μ l

Navážky rozpustíme v deionizované vodě a pH upravíme na hodnotu 7,5 – 8,0

AA: 5 % octová kyselina: 100 μ l octové kyseliny v 1900 μ l deionizované vody

ABC: 200 mg hydrogenuhličitanu amonného (50 mM) v 50 ml deionizované vody, pH = 8

DTT: 15,4 mg dithiothreitolu (100 mmol/l) v 1000 μ l ABC

IAA: 13,89 mg jodacetamidu v 1500 μ l ABC

Cys: Zásobní roztok (125 mM): 15 mg cysteinu v 1 ml ABC

Pracovní roztok (5 mM): na 4 vzorky: 60 μ l zásobního roztoku s 1440 μ l ABC

TRY: na 4 vzorky: 8 μ l trypsinu ve 192 μ l ABC

TFA: 10% trifluoroctová kyselina: 20 μ l trifluoroctové kyseliny v 1980 μ l deionizované vody

pH+: 10% hydroxid amonný: 20 μ l hydroxidu amonného v 1980 μ l deionizované vody

pH-: viz TFA

Pomůcky: eppendorfky (0,5; 1,5; 2 ml), automatické pipety a špičky, magnetický separátor, vortex, rotátor, neodymový magnet, kádinky nebo skleněné lahve, pH-metr, skleněná elektroda, magnetická míchačka, míchadlo, parafilm, Thermomixer, pírka, analytické váhy, eppendorfky

Postup:

I) Imobilizace protilátky na magnetických kuličkách

1. Kuličky v zásobní lahvičce resuspendujeme na vortexu
2. Požadované množství (1,05 μ l/vzorek) suspenze přeneseme do eppendorfky (0,5 ml) s 50 μ l binding pufru
3. Eppendorfku umístíme na magnetický separátor, jakmile jsou kuličky zachyceny magnetem na straně, odebereme supernatant
4. Ke kuličkám přidáme 200 μ l binding pufru a přemístováním eppendorfky na magnetickém separátoru promyjeme kuličky jejich „přeskakováním“ z jedné strany na druhou
5. Kuličky necháme zachytit magnetem na jedné straně a odebereme supernatant
6. Promytí opakujeme celkem 3x
7. Kuličky resuspendujeme ve 100 μ l binding pufru. Takto připravené kuličky jsou připraveny pro imobilizaci protilátky

II) Imobilizace protilátky na magnetických kuličkách

1. Připravíme si dostatečné množství zředěné protilátky, pro potřeby imunoprecipitace je doporučené ředění 30x (tj. 1 μ l protilátky se rozmíchá ve 29 μ l binding pufru)
2. Nabereme požadovaný objem zředěné protilátky (1 μ l/vzorek) a přeneseme jej do eppendorfky s ekvilibrovanými magnetickými kuličkami
3. Eppendorfku následně utěsníme parafilmem a umístíme na rotátor, který nastavíme tak, aby každé 3 minuty obsah eppendorfky vibračně zamíchal
4. Na rotátoru inkubujeme 30 minut za laboratorní teploty

5. Po inkubaci umístíme eppendorfku na magnetický separátor a odstraníme supernatant s nenačkanými protilátkami
6. Kuličky promyjeme 100 μ l binding pufru způsobem, jak bylo popsáno výše a to celkem 3x
7. Kuličky s načkanými protilátkami resuspendujeme v požadovaném objemu binding pufru, abychom dávkovali 20 μ l/vzorek

III) Imunoprecipitace

1. Do eppendorfky (2 ml) napipetujeme takový objem binding pufru, aby byl celkový reakční objem 2000 μ l (reakční objem = binding pufr + vzorek + kuličky s protilátkou)
2. K binding pufru přidáme odpovídající objem vzorku (obsahující 400 nebo 600 μ g celkového proteinu) a následně 20 μ l rozmíchané suspenze magnetických kuliček s protilátkou
3. Eppendorfky utěsníme parafilmem a umístíme na rotátor, který nastavíme tak, aby běžel minimálně 12 hodin a roztoky vibračně promíchával každé 3 minuty
4. Rotátor i s eppendorfkami umístíme do chladicí místnosti nebo lednice s teplotou 4 °C a inkubujeme přes noc
5. K eppendorfce přiložíme silný neodymový magnet, aby došlo k zachycení všech magnetických kuliček na jedné straně eppendorfky a opatrně odebereme supernatant
6. Kuličky promyjeme 3x 100 μ l binding pufru (v původní eppendorfce s využitím neodymového magnetu, nebo při prvním promývání přeneseme suspenzi do 0,2 ml eppendorfky a promytí provedeme na magnetickém separátoru)
7. Proteiny eluujeme 100 μ l AA a eluát přeneseme do označené čisté eppendorfky, přidáme 200 μ l ABC a přikročíme k digesci, nebo kuličky resuspendujeme v 300 μ l ABC (s přenesením do větší eppendorfky 1,5 či 2 ml), pokud provádíme digesci v přítomnosti magnetických kuliček

IV) Trypsinová digesce

1. K 300 μl resuspendovaných kuliček či zředěného eluátu přidáme 10 μl DTT a inkubuje na termomixeru při 60 °C po dobu 30 minut
2. Po vychladnutí přidáme 15 μl IAA a inkubujeme ve tmě za laboratorní teploty po dobu 60 minut
3. Přidáme 375 μl pracovního roztoku Cys
4. Přidáme 50 μl methanolu
5. Přidáme 5 μl TRY a inkubujeme při 37 °C v pícce za stálého míchání přes noc
6. Štěpení zastavíme přidávkem 2,5 μl TFA
7. Zpracujeme dále purifikací přes kolonku MacroTRAP (viz protokol: Příloha 10), nebo uskladníme při – 20 °C

B) S imobilizovaným proteinem G

Chemikálie: deionizovaná voda, magnetické kuličky s imobilizovaným proteinem G, anti-Ras protilátka, Tris-HCl, NaCl, Tween20, hydroxid amonný, trifluoroctová kyselina, kyselina octová, hydrogenuhličitan amonný, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), deoxycholát sodný, Igepal (NP-40), diethanolamin, dimethylpimelimidát·2HCl, glycerol

Roztoky:

ACRB (pufr protilátkové konjugační reakce): 265,46 μ l diethanolaminu s 10 μ l 20 μ M dimethylpimelimidátu v 9724,5 μ l deionizované vody

20 μ M dimethylpimelimidát·2HCl:

10 μ l 20 mM dimethylpimelimidátu (5,18 mg v 1 ml deionizované vody) v 9990 μ l deionizované vody

Binding pufr: Složení na přípravu 50 ml roztoku (tab. 20):

Tab. 20: Složení binding pufru

Chemikálie	Složení	Navážky
Tris-HCl	50 mM	302,8 mg
NaCl	150 mM	438,3 mg
Tween 20	0,05 %	25 μ l

Tris: 50 mM Tris-HCl: 302,8 mg Tris-HCl v 50 ml deionizované vody, pH= 7,5

RIPA: složení na 10 ml roztoku (tab. 21)

Uvedené složky rozpustíme v malém množství deion. vody a doplníme do 100 ml.

AA: 5% octová kyselina: 100 μ l octové kyseliny v 1900 μ l deionizované vody

ABC: 200 mg hydrogenuhličitanu amonného (50 mM) v 50 ml deionizované vody, pH = 8

pH+: 10% hydroxid amonný: 20 μ l hydroxidu amonného v 1980 μ l deionizované vody

pH-: 10% trifluoroctová kyselina: 20 μ l trifluoroctové kyseliny v 1980 μ l deionizované vody

Tab. 21: Složení RIPA roztoku

Složka	Příprava	Dávkované množství
NaCl	-	87,66 mg
1M-Tris-HCl	7,88 g v 50 ml deionizované vody, pH = 7,4	500 μ l
EDTA	-	3,72 mg
Igepal (NP-40)	-	100 μ l
10% deoxycholát sodný	1 mg deoxycholátu v 10 ml deionizované vody	250 μ l

Pomůcky: eppendorfky, automatické pipety a špičky, magnetický separátor, vortex, rotátor, neodymový magnet, kádinky nebo skleněné lahve, pH-metr, skleněná elektroda, magnetická míchačka, míchadlo, parafilm, analytické váhy

Postup:

- 1) Resuspendujeme magnetické kuličky a odebereme požadované množství, tak aby na jednu reakci byl použit 1 μ g protilátky (4,17 μ l resuspendovaných kuliček váže 1 μ g protilátky)
- 2) Ke kuličkám přidáme odpovídající množství zředěné protilátky (1 μ l protilátky zředěný 29 μ l binding pufri) za předpokladu, že 1 μ l zředěné protilátky odpovídá 1 μ g
- 3) Reakční objem upravíme ACRB alespoň na celkový objem 200 μ l
- 4) Inkubujeme za laboratorní teploty na rotátoru 1,5 hodiny
- 5) Po inkubaci promyjeme 2x 200 μ l Tris
- 6) Kuličky resuspendujeme v 200 μ l Tris a na 15 minut umístíme na rotátor
- 7) Po inkubaci odstraníme supernatant na magnetickém separátoru a resuspendujeme v Tris, přidáme glycerol v poměru 3:2 tak, abychom dávkovali alespoň 20 μ l suspenze kuliček na reakci (např. na 10 reakcí: 120 μ l Tris a 80 μ l glycerolu), podle potřeby přenášíme do větší eppendorfky

- 8) Do 2 *ml* eppendorfky přeneseme alespoň čtyřnásobek RIPY, než je vypočítaný objem lyzátu o požadovaném množství celkového proteinu
- 9) Následně k RIPĚ přidáme vypočítaný objem lyzátu a 20 μ l suspenze kuliček s protilátkou
- 10) Eppendorfku utěsníme parafilmem a umístíme na rotátor, který nastavíme tak, aby běžel minimálně 12 hodin a roztok vibračně promíchával každé 3 minuty
- 11) Rotátor i s eppendorfkou umístíme do chladicí místnosti nebo lednice s teplotou 4 °C a inkubujeme přes noc
- 12) Po inkubaci kuličky 3x promyjeme 200 μ l RIPY
- 13) Provedeme eluci 100 μ l AA a eluáty zředíme 200 μ l ABC nebo po resuspendování v 300 μ l ABC rovnou přikročíme k trypsinové digesci
- 14) Trypsinová digesce – viz protokol: Příloha 7 část A oddíl IV

Příloha č. 8

FASP×FAST (Filter Aided Sample Preparation × Filter Aided Sample Trypsinization)

Chemikálie: močovina, dithiothreitol, hydrogenuhličitan amonný, jodacetamid, trypsin (100 μg trypsinu ve 200 μl 50 mM kyseliny octové), trifluoroctová kyselina, hydroxid amonný, Tris/HCl, deionizovaná voda

Roztoky:

UA: 24,024 g močoviny (8 mol/l) a 607 mg Tris/HCl (0,1 mol/l) doplněno deionizovanou vodou do 50 ml, pH = 8,5

ABC: 200 mg hydrogenuhličitanu amonného (50 mM) v 50 ml deionizované vody, pH = 8

DTT: 15,4 mg dithiothreitolu (100 mmol/l) v 1000 μl ABC

IAA: 13,89 mg jodacetamidu v 1500 μl UA

TRY: na 4 vzorky: 8 μl trypsinu ve 192 μl ABC

TFA: 10% trifluoroctová kyselina: 20 μl trifluoroctová kyseliny v 1980 μl deionizované vody

pH+: 10% hydroxid amonný: 20 μl hydroxidu amonného v 1980 μl deionizované vody

pH-: viz TFA.

Pomůcky: analytické váhy, flakony, kádinky, odměrný válec (50 ml) eppendorfky, centrifugační mikrozkuřavky, membránové filtry 30 kDa a 10 kDa, centrifuga s rotorem na eppendorfky, mlžná komora, pH metr, automatické pipety, špičky, Thermomixer, magnetická míchačka, míchadlo, stojánek

Postup:

Varianta 1:

1. Požadovaný objem vzorku o požadovaném množství totálního proteinu smícháme s 200 μl UA a přidáme 80 μl DTT
2. Povaříme v Thermomixeru při 95 °C po dobu 4 minut

3. Po vychladnutí přeneseme na 30 *kDa* filtr zasunutý v mikrozkuhavce a pokračujeme krokem č. 2 v obecném postupu

Varianta 2:

1. Pracujeme podle kroků 1. – 3. obecného postupu
2. Do mikrozkuhavky pod 30 *kDa* filtrem přidáme 80 μ l DTT a pokračujeme bez filtru
3. Povaříme v Thermomixeru při 95°C po dobu 4 minut a necháme vychladnout
4. Pokračujeme krokem č. 4 v obecném postupu

Varianta 3:

1. Pracujeme podle kroků 1. – 4. obecného postupu
2. Na filtr nanese 80 μ l DTT, zamícháme a inkubujeme 60 minut za laboratorní teploty
3. Stočíme podle kroku 2. obecného postupu
4. Pokračujeme krokem č. 5 v obecném postupu

Obecný postup:

1. Na 30 *kDa* filtr vložený do mikrozkuhavky nanese 200 μ l UA a do něj přeneseme vzorek o požadovaném obsahu celkového proteinu
2. Zkuhavku s filtrem uzavřeme víčkem a centrifugujeme (14000 *g* / 15 *min* / 25 °C), dokud veškerá tekutina neproteče do mikrozkuhavky
3. Na filtr napipetujeme 50 μ l UA a stočíme, opakujeme celkem 3x
4. Roztok v mikrozkuhavce nadávkuje na 10 *kDa* filtr v čisté mikrozkuhavce a stočíme, dokud všechen neproteče do mikrozkuhavky
5. Odstraníme roztok v mikrozkuhavce pod filtrem
6. Na filtr přidáme 100 μ l IAA, zamícháme a necháme inkubovat 20 minut ve tmě za laboratorní teploty
7. Po skončení inkubace stočíme

8. Filtr propláchneme 100 μ l ABC, celkem 3x
9. Vyměníme mikrozkuřavku pod filtrem za řistou a na filtr nadávkujeme 50 μ l TRY
10. Mikrozkuřavku s filtrem ve stojánku následně vložíme do vodní lázně vytemperované na 37 °C a inkubujeme přes noc.
11. Po inkubaci stočíme a okyselíme 2,5 μ l TFA
12. Filtr vypláchneme 50 μ l ABC, opakujeme 3x
13. Vzorky purifikujeme přes kolonku MacroTRAP (viz protokol: Příloha ř. 10), nebo uskladníme při -20 °C

Příloha č. 9

Precipitace proteinů acetonem

Chemikálie: aceton, deionizovaná voda, hydrogenuhličitan amonný, trifluoroctová kyselina, hydroxid amonný, buněčný lyzát

Roztoky:

80% aceton: 160 ml acetonu a 40 ml deionizované vody

ABC: 200 mg hydrogenuhličitanu amonného (50 mM) v 50 ml deionizované vody, pH = 8

pH+: 10% hydroxid amonný: 20 μ l hydroxidu amonného v 1980 μ l deionizované vody

pH-: 10% trifluoroctová kyselina: 20 μ l trifluoroctové kyseliny v 1980 μ l deionizované vody

Pomůcky: skleněná láhev s uzávěrem, automatické pipety a špičky, odměrný válec, eppendorfky, centrifuga s rotorem na eppendorfky, mrazicí box

Postup:

- 1) Do skleněné láhve si připravíme 80% aceton a necháme vychladit v mrazicím boxu alespoň na -20 °C
- 2) V eppendorfce smícháme lyzát o požadovaném množství celkového proteinu alespoň se čtyřnásobným objemem vychlazeného acetonového roztoku
- 3) Inkubujeme v mrazicím boxu minimálně 1 h při teplotě -20 °C, či nižší
- 4) Po inkubaci eppendorfku stočíme ve vychlazené centrifuze na 4 °C při 12000 g po dobu 10 min
- 5) Odebereme supernatant a resuspendujeme v 80% acetonu a opakujeme kroky 3 a 4
- 6) Po odebrání supernatantu necháme zbylý aceton z otevřené eppendorfky odpařit při laboratorní teplotě
- 7) Resuspendujeme proteiny zbavené detergentů v požadovaném roztoku podle zamýšleného experimentu. Pro trypsinovou digesci je resuspendujeme ve 300 μ l ABC; trypsinová digesce – viz protokol: Příloha 7 část A oddíl IV

Příloha č. 10

Purifikace (odsolení) peptidové směsi na kolonce MacroTRAP

Pomůcky: kolonka MacroTRAP, šroubovací aparatura pro kolonku, 500 μ l stříkačka Hamilton, kádinky či malé skleněné lahve, eppendorfky

Chemikálie: acetonitril (ACN), 2-propanol, trifluoroctová kyselina (TFA), deionizovaná voda

Roztoky:

Eluční roztok: 0,1% TFA v 80% ACN (40 ml acetonitrilu, 10 ml deionizované vody a 50 μ l trifluoroctové kyseliny)

Odsolovací roztok: 0,1% TFA (50 μ l trifluoroctové kyseliny v 50 ml deionizované vody)

Skladovací roztok: 50% 2-propanol (1 ml 2-propanolu v 1 ml deionizované vody)

Postup:

1. Kolonku vytáhneme ze skladovacího roztoku a vložíme do aparatury, utáhneme
2. Hamiltonku propláchneme 3x 100% ACN a následně 3x kolonku v aparatuře
3. Sestavenou aparaturu promyjeme 500 μ l elučního roztoku a následně stejným objemem odsolovacího roztoku, kdy dojde k ekvilibraci kolonky
4. Vzorek nabere do Hamiltonky a přes kolonku jej necháme zvolna prokapat
5. Zachycené peptidy odsolíme malým průtokem 500 μ l odsolovacího roztoku
6. Eluci peptidů provedeme prokapáním 300 μ l elučního roztoku přes kolonku do čisté označené eppendorfky (1,5 ml)
7. Pro purifikaci dalšího vzorku opakujeme kroky 3 – 6
8. Pro ukončení práce propláchneme aparaturu 500 μ l elučního roztoku a následně 500 μ l skladovacího roztoku
9. Rozebereme aparaturu a kolonku umístíme do eppendorfky (2 ml) s 1500 μ l skladovacího roztoku a uskladníme v lednici
10. Hamiltonku propláchneme 3x 100% ACN

Příloha č. 11

Příprava vzorků pro LC/MS analýzu a spikování

Chemikálie: acetonitril (ACN), kyselina mravenčí (FA), deionizovaná voda, zásobní roztoky syntetických značených peptidů (1 ng/ μ l)

Roztoky:

5% ACN 0,1% FA: 100 μ l acetonitrilu a 2 μ l kyseliny mravenčí v 1898 μ l deionizované vody

Spikovací roztok: 2,5 μ l roztoku G12D* či G12C* a 2,5 μ l roztoku WT* v 195 μ l 5% ACN 0,1% FA (výsledná koncentrace jednotlivých peptidů je 12,5 fmol/ μ l)

Pomůcky: vakuová odparka, centrifuga Minispin, automatické pipety, špičky, inserty, skleněné vialky, víčka s teflonovým septem

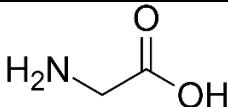
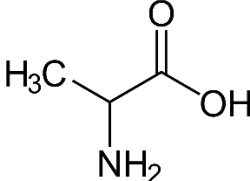
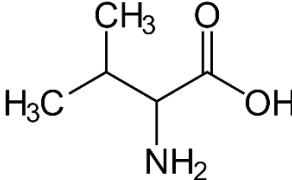
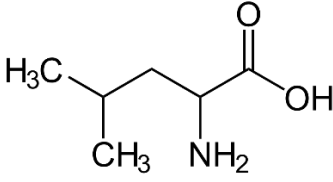
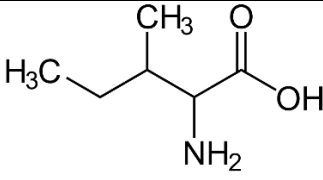
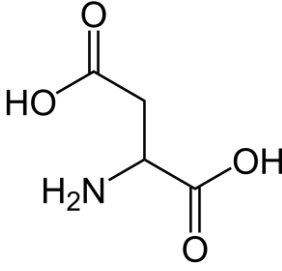
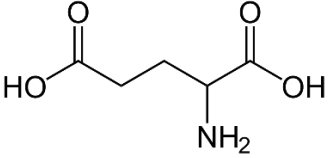
Postup:

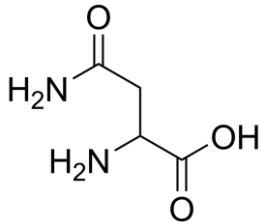
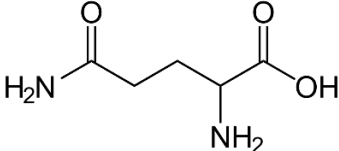
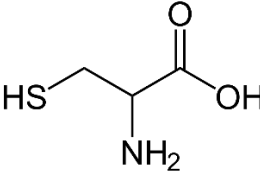
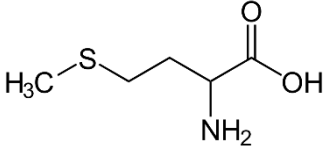
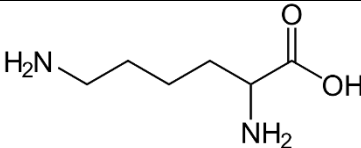
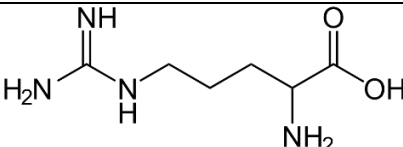
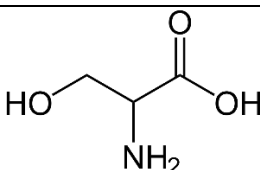
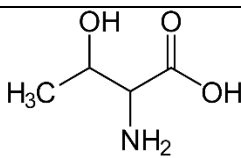
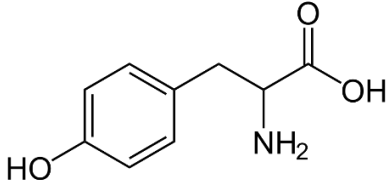
- 1) Vzorky po purifikaci na kolonce MacroTRAP odpaříme do sucha ve vakuové odparce
- 2) Peptidy v eppendorfce rozpustíme ve 40 μ l 5% ACN 0,1% FA
- 3) Vzorek naspikujeme 10 μ l spikovacího roztoku s odpovídajícím složením (značený peptid podle mutace v příslušné buněčné linii + značený peptid WT*)
- 4) Pomocí pipety důkladně opláchneme stěny eppendorfky a případně stočíme v Minispinu, aby veškerá tekutina byla na dně eppendorfky
- 5) Obsah eppendorfky přeneseme do insertu, který vložíme do označené vialky a uzavřeme plastovým víčkem s teflonovým septem
- 6) Vzorek je připraven na LC/MS analýzu

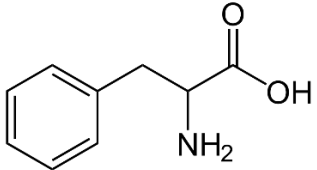
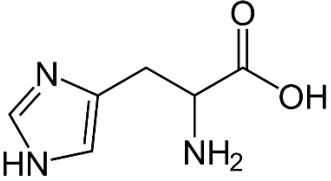
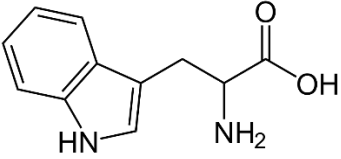
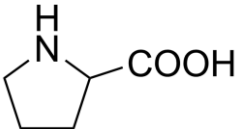
Příloha č. 12

Přehled kódovaných aminokyselin a jejich zkratk

Tab. 22: Přehled kódovaných aminokyselin, jejich strukturních vzorců a zkratk

Název	Strukturní vzorec	Zkratka	
		Třípísmenná	Jednopísmenná
Glycin		Gly	G
Alanin		Ala	A
Valin		Val	V
Leucin		Leu	L
Isoleucin		Ile	I
Asparagová kyselina		Asp	D
Glutamová kyselina		Glu	E

Asparagin		Asn	N
Glutamin		Gln	Q
Cystein		Cys	C
Methionin		Met	M
Lysin		Lys	K
Arginin		Arg	R
Serin		Ser	S
Threonin		Thr	T
Tyrosin		Tyr	Y

Fenylalanin		Phe	F
Histidin		His	H
Tryptofan		Trp	W
Prolin		Pro	P