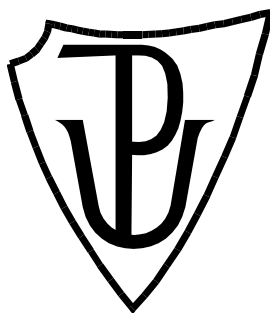


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Kvantifikácia proteínov pomocou redukívnej dimethylácie peptidov a MALDI-TOF MS analyzátora**

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Pavol Melicher</b>
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný obor:	Biotechnológie a genové inženýrství
Forma štúdia:	Prezenční
Vedúci práce:	<b>Mgr. René Lenobel, PhD.</b>
Rok:	2018

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne s vyznačením všetkých použitých zdrojov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som zoznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúci zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa ..... *podpis bakalára*

Rád by som poďakoval svojmu vedúcemu Mgr. Renému Lenobelovi, PhD. za jeho pomoc s vypracovaním bakalárskej práce. Ďakujem za jeho čas, trpezlivosť ale predovšetkým za cenné rady a skúsenosti, ktoré mi počas práce vždy ochotne poskytol.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Pavol Melicher
Názov práce	Kvantifikácia proteínov pomocou reduktívnej dimetylácie a MALDI-TOF-MS analyzátoru
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Oddelenie biochémie proteínov a proteomiky
Vedúci práce	Mgr. René Lenobel, PhD.
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Kvantitatívna proteomika je technológia zaoberajúca sa štúdiom zmien v abundancii proteínov v organizme. V súčasnosti je najvhodnejšou voľbou kvantitatívnej analýzy hmotnostná spektrometria. S využitím tejto metódy môžu byť proteíny kvantifikované priamo technikou label-free alebo sú pred analýzou stabilne izotopovo derivované. Po naviazaní izotopovej značky na proteín alebo peptid dochádza ku charakteristickej zmene v jeho hmotnosti, ktorá je detekovaná a po úspešnej identifikácii analytu využitá na kvantifikáciu. Medzi základné techniky izotopového značenia patrí aj reduktívna dimetylácia. Prepokladom úspešnej derivatizácie je dostatočné štiepenie proteínu. V proteomických analýzach sa využíva niekoľko enzýmov, prvenstvo si však stále udržiava vysoko špecifický trypsin. Časť tejto práce je venovaná kvantitatívnej proteomike, hmotnostnej spektrometrii a často využívaným proteomickým enzýmom. Cieľom experimentálnej časti bola optimalizácia pracovného postupu štiepenia proteínu BSA. Po značení vzniknutých peptidov reduktívnou dimetyláciou boli peptidy prečistené pomocou StageTips a prebehla kvantifikácia použitím dvoch techník – ESI-Q/TOF MS/MS a MALDI-TOF-MS. Získané kvantitatívne výsledky preukázali odlišnosť medzi použitými technikami a potvrdili, že MALDI-TOF-MS spojená s reduktívnou dimetyláciou je vhodná na kvantifikáciu jednoduchých proteínových vzoriek.

Kľúčové slová	Kvantitatívna proteomika, stabilné izotopové značenie, enzýmy, MALDI-TOF-MS, ESI-MS/MS
Počet strán	72
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Pavol Melicher
Title	Quantification of proteins by reductive dimethylation of peptides and MALDI-TOF MS analyser
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry of proteins and proteomics
Supervisor	Mgr. René Lenobel, PhD.
The year of presentation	2018

### Abstract

Quantitative proteomics is a technology that deals with the study of changes in protein abundance in the organism. At present, the most appropriate choice of quantitative analysis is mass spectrometry. Using this method, the proteins can be quantified directly or are stably isotopically derived before analysis. After the isotope label is bound to a protein or peptide, the characteristic change in its weight is detected and after successful identification of the analyte is used for its quantification. Reductive dimethylation is one of the basic isotopic labeling techniques. Sufficient protein digestion is a prerequisite for successful derivatization. Several enzymes are used in proteomic assays, but the specific trypsin is still the enzyme of choice. The part of this Bachelor Thesis is devoted to quantitative proteomics, mass spectrometry and the often used proteomic enzymes. The aim of the experimental part was to optimize the BSA protein digestion. After labeling of obtained peptides by reductive dimethylation, the peptides were purified by StageTips and quantitated using two techniques - ESI-Q/TOF MS/MS and MALDI-TOF-MS. The quantitative results obtained showed the difference between the techniques used and confirmed that MALDI-TOF-MS associated with reductive dimethylation is suitable for quantification of simple protein samples.

Keywords	Quantitative proteomics, stable isotope labeling, enzymes, MALDI-TOF-MS, ESI-MS/MS
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Slovak

## Ciele práce

- Vypracovanie literárnej rešerše obsahujúcej kľúčové slová: kvantitatívna proteomika, stabilné izotopové značenie, enzýmy, MALDI-TOF-MS, ESI-MS/MS
- Optimalizácia štiepenia nízkych koncentracii jednoduchých proteínov v roztoku.
- Purifikácia na mikrokolónkach StageTips s imobilizovanou reverznou fázou.
- Reduktívna dimethylácia peptidov pomocou formaldehydu, purifikácia na StageTips mikrokolónkach a finálna kvantitatívna analýza na MALDI-TOF MS analyzátore.
- Reprodukovateľnosť kompletného protokolu z hľadiska kvantitatívnej proteomickej analýzy - štiepenie, značenie a purifikácia na StageTips - finálna MALDI-TOF MS analýza.
- Príprava a premeranie kalibračných závislostí, definícia reprodukovateľného rozsahu kalibračných závislostí pre MALDI-TOF MS ionizáciu.
- Porovnanie kalibračných dát medzi MALDI (MALDI-TOF) MS a ESI (LC-MS) ionizáciou.

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>9</b>
2.1	Kvantifikácia v proteomike.....	9
2.1.1	Label-free kvantifikácia .....	10
2.1.2	Stabilné izotopové značenie.....	11
2.1.2.1	Metabolické (In vivo) značenie.....	11
2.1.2.2	Enzymatické značenie.....	12
2.1.2.3	Chemické značenie.....	13
2.1.2.4	Reduktívna dimetylácia.....	16
2.2	Hmotnostná spektrometria (MS – mass spectrometry).....	18
2.2.1	Ionizačné techniky .....	18
2.2.1.1	ESI verzus MALDI .....	20
2.2.2	Hmotnostné analyzátory.....	23
2.2.3	Detektory .....	24
2.3	Štiepenie proteínov v kvantitatívnej proteomike .....	25
2.3.1	Proteázy v kvantitatívnej proteomike.....	26
2.3.2	Trypsín .....	27
2.3.3	Ostatné proteolytické enzýmy.....	29
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>32</b>
3.1	Materiál .....	32
3.1.1	Chemikálie .....	32
3.1.2	Prístroje .....	32
3.2	Metódy .....	33
3.2.1	Štiepenie BSA v roztoku pomocou trypsínu .....	33
3.2.1.1	Príprava pracovných roztokov proteínu .....	33
3.2.1.2	Príprava proteínu na štiepenie.....	35
3.2.1.3	Prídavok enzýmu trypsínu.....	35
3.2.2	Značenie proteolytických peptidov reduktívnou dimetyláciou.....	37
3.2.3	Odsolenie peptidov pomocou C18 diskov metódou StageTip.....	39
3.2.4	LC-ESI-MS analýza .....	39
3.2.5	MALDI-TOF MS analýza.....	40
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA</b> .....	<b>41</b>
4.1	Optimalizácia postupu prípravy mikrogramových množstiev proteínu na MS analýzu s cieľom reprodukovateľnosti .....	41
4.1.1	Štiepenie BSA v roztoku s rôznym objemom .....	41
4.1.2	Skúška reprodukovateľnosti štiepenia proteínu s následnou kvantifikáciou .....	45
4.1.3	Úprava podmienok štiepenia štandardu a riedenie enzýmu.....	47
4.2	MALDI ionizácia a opakovateľnosť merania .....	51
4.2.1	Súčet spektier z jedného spotu .....	51
4.2.2	Súčet spektier z troch spotov .....	52
4.3	Kvantitatívna analýza použitím MALDI-TOF-MS a ESI-MS/MS.....	53
4.3.1	Účinky komerčného trypsínu na štiepenie proteínu.....	54
4.3.2	Kalibračná závislosť získaná MALDI-TOF-MS analýzou .....	55
4.3.3	Kalibračná závislosť získaná ESI-MS/MS analýzou .....	56
4.3.4	Porovnanie kvantitatívnych vlastností MALDI-TOF-MS a ESI-MS/MS .....	58
<b>5</b>	<b>ZÁVER</b> .....	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>LITERATÚRA</b> .....	<b>64</b>

<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK .....71</b>
----------	-----------------------------------------------------



# 1 ÚVOD

Proteomika je analytický prístup, ktorý sa už viac ako dve desaťročia zaoberá odhaľovaním a charakterizáciou proteínov a ich vlastností. Medzi tie patrí najmä expresia, bunková lokalizácia, interakcie, štruktúra, modifikácie alebo aktivita enzýmov (Han *et al.*, 2009). Sústreďí sa teda na určenie vlastností proteómu. Slovo „proteóm“ vzniklo v roku 1994 spojením slova proteín a genóm (Shah a Misra, 2011). Od genómu sa však líši svojou komplexitou a rozsiahlymi zmenami, ktoré nastávajú vplyvom vonkajších stimulov na bunku (Han *et al.*, 2009). Pôsobením vonkajšieho prostredia na bunku nedochádza iba ku zmene vlastností proteómu, ale aj početného zastúpenia jednotlivých proteínov – takzvanej abundancii. Technológia, ktorá sa zaoberá práve zmenami v abundancii proteínov sa nazýva kvantitatívna proteomika.

Cieľom kvantitatívnej proteomiky je v prvom rade identifikácia proteínov v komplexných vzorkách tvorených extraktom buniek alebo celých tkanív. Následne sa zameriava na určenie kvantitatívnych rozdielov v abundancii jedného alebo viacerých polypeptidov v analyzovaných vzorkách. Táto technológia vychádza z predpokladu, že konkrétny výsledok kvantitatívnej analýzy definuje zmenu fyziologického stavu bunky (Pan a Aebersold, 2007). Využíva sa preto v štúdiách biologických procesov, pri odhaľovaní klinických markerov alebo v diagnóze. Napomáha tak v riešení mnohých otázok biologického a klinického výzkumu. Tradičnou súčasťou kvantitatívnej analýzy bola spočiatku dvojdimenzionálna elektroforéza (Gygi *et al.*, 2000). Objavením stabilného izotopového značenia v roku 1999 bola do tejto oblasti proteomiky začlenená aj hmotnostná spektrometria (Bantscheff *et al.*, 2007).

Hmotnostná spektrometria (MS) je dnes neodmysliteľnou súčasťou chemickej analýzy. Každý deň prispieva k novým objavom v oblastiach chémie, fyziky alebo biochémie. Široké uplatnenie našla aj v potravinárskom alebo farmaceutickom priemysle (Urban, 2016). Analýza MS spočíva v ionizácii analytu, separácii iónov na základe hmotnosti a náboja a detekcii separovaných iónov. V kvantitatívnej analýze sú najčastejšie využívané hmotnostné analyzátory, ktoré na ionizáciu analytu využívajú elektrosprej (ESI) alebo laserovú desorpciu a ionizáciu s využitím matrice (MALDI). V tejto práci sa okrem opisu výhod a nevýhod týchto ionizačných techník v teoretickej oblasti sústreďíme aj na experimentálne porovnanie týchto ionizačných techník v kvantitatívnej analýze.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Kvantifikácia v proteomike

Kvantitatívna proteomika sa zameriava na rozoznanie kvantitatívnych rozdielov v abundancii všetkých zložiek analyzovaných zmesí proteínov. Pre kvantifikáciu existuje v proteomike niekoľko metód, ktoré sa líšia nielen prípravou vzorky ale aj detekciou vzniknutých produktov (Pan a Aebersold, 2007).

Tradičné metódy využívajú ku identifikácii proteínov dvojdimenzionálnu elektroforézu. Vizualizácia rozdelených proteínov v gély nastáva prostredníctvom širokého spektra fluoroforov, farbív a rádioaktívnych zlúčenín (Bantscheff *et al.*, 2007). Kvantifikácia spočíva v porovnávaní obrazových záznamov gélov z viacerých experimentov. Za použitia vhodného software je umožnená identifikácia spotov a kvantifikácia na základe relatívnych intenzít ich signálov. Táto metóda môže byť zároveň prepojená s hmotnostnou spektrometriou vďaka jej schopnosti výrazného zúženia výberu proteínov z komplexných vzoriek (Rabilloud a Lelong, 2011). Výhodou dvojdimenzionálnej elektroforézy je dobrá citlivosť, lineárnosť a dynamický rozsah. Trpí však aj niekoľkými nedostatkami. Hlavnou nevýhodou je v prvom rade potreba dostatočného rozdelenia proteínov. Nevýhodou je aj neschopnosť identifikácie prekrývajúcich sa proteínov (Bantscheff *et al.*, 2007) a membránových proteínov (Ong a Mann, 2005). Proteíny s nízkou abundanciou nemusia byť touto metódou vôbec detekované. Modernými metódami založenými na hmotnostnej spektrometrii je možné tieto nedostatky odstrániť (Bantscheff *et al.*, 2007).

Relatívna kvantifikácia pomocou MS využíva ako vnútorné štandardy peptidy alebo proteíny prítomné v skúmanej komplexnej vzorke. Princíp relatívnej kvantifikácie spočíva v detekcii peptidov, ktoré majú rovnakú aminokyselinovú sekvenciu ale sú odlišne označené. Určenie obsahu sledovaných peptidov vychádza zo vzájomného pomeru abundancie získaného z intenzít ich signálov. Tieto peptidy sú odlišne označené v samostatných vzorkách. Zmiešané sú až tesne pred analýzou (Cheng *et al.*, 2006).

Absolútna kvantifikácia (AQUA) využíva ako vnútorné štandardy syntetické peptidy, ktoré sú v stanovenej koncentrácii pridané do komplexnej zmesi proteínov pred jej štiepením. Synteticky pripravené peptidy sú identické s peptidmi, ktoré vznikajú pri proteolýze sledovaného proteínu. Líšia sa od nich iba stabilne zakomponovanými izotopmi (Kirkpatrick *et al.*, 2005).

### 2.1.1 Label-free kvantifikácia

Label-free kvantifikácia sa od stabilného izotopového značenia líši tým, že pri príprave vzorky nie sú nutné žiadne ďalšie kroky, pri ktorých by dochádzalo ku značeniu proteínov alebo peptidov. Pripravené vzorky sú analyzované v následných LC-MS experimentoch. Získané dáta vybraných peptidov sú následne porovnávané. Hlavnou výhodou je v porovnaní s metódami izotopového značenia výrazné zníženie celkovej ceny analýzy. Ďalšou výhodou tejto metódy je, že sú vynechané pracovné kroky, ktoré môžu v metódach stabilného izotopového značenia spôsobiť variabilitu medzi vzorkami a zároveň znižovať reprodukovateľnosť. Nevýhodou je dlhší čas analýzy a často náročné spracovanie získaných výsledkov.

V klinickej proteomike sa label-free kvantifikácia využíva v bioštatistickom profilovaní (Wang *et al.*, 2003), kde zmeny v intenzite peptidových iónov v sledovaných vzorkách reprezentujú potenciálne proteínové biomarkery (Asara *et al.*, 2008). Vo fosfoproteomike sa pre kvantifikáciu porovnávajú relatívne intenzity alebo plochy píkov fosforylovaných a nefosforylovaných proteínov (Tsay *et al.*, 2000). Label-free kvantifikáciou je možné určiť stechiometriu komplexných proteínov (Fabre *et al.*, 2014) alebo fosfoproteínov (Steen *et al.*, 2005).

V kvantitatívnej proteomike, ktorej úlohou je stanoviť relatívnu abundanciu proteínov vo vzorkách, je využívaných niekoľko label-free metód. Medzi metódy založené na identifikácii proteínov patria Peptide counting, Spectral counting, a rôzne kombinácie týchto metód (Blein-Nicolas a Zivy, 2016).

Peptide counting je metóda, u ktorej je kvantifikácia závislá na PAI indexe (peptide abundance index). Táto technika kvantifikuje pozorované peptidy iba v jednom meraní a nie je ju možné aplikovať na viac vzoriek v experimente. PAI vyjadruje pomer počtu identifikovaných peptidov ku teoretickému počtu identifikovateľných peptidov pre daný proteín (Rappsilber *et al.*, 2002). Index PAI bol neskôr modifikovaný a nahradený emPAI (exponenciálny modifikovaný PAI), ktorý je pre kvantifikáciu vhodnejší.

Spectral counting určuje relatívnu abundanciu proteínov na základe počtu získaných MS/MS spektier z analýzy proteínu. V porovnaní s Peptide counting umožňuje táto metóda kvantifikáciu vybraných proteínov na základe porovnávania získaných dát z viacerých LC-MS meraní. Množstvo proteolytických peptidov je tým vyššie, čím väčší je obsah proteínu vo vzorke. Existuje lineárna súvislosť medzi počtom získaných MS/MS

spektier a abundanciou pozorovaného proteínu. Počet MS/MS spektier pozorovaného proteínu rastie priamo úmerne s jeho stúpajúcou abundanciou (Liu *et al.*, 2004).

Medzi metódy založené na štatistických výpočtoch vychádzajúcich z extrahovaného iónového chromatogramu (EIC) patrí napríklad TOP3 (Silva *et al.*, 2006), RRollup (Polpitiya *et al.*, 2008) alebo iBAQ (Schwanhäusser *et al.*, 2011).

## **2.1.2 Stabilné izotopové značenie**

Stabilné izotopové značenie je súčasťou proteomickej analýzy od roku 1999 (Bantscheff *et al.*, 2007). Princípom metód využívajúcich stabilné izotopové značenie je identifikácia ekvivalentov proteínov alebo peptidov so špecifickými rozdielmi v hmotnosti spôsobenými stabilne naviazanými izotopmi. Najbežnejší postup pozostáva z dvoch základných krokov. Najskôr sú proteíny alebo peptidy označené dvoma podobnými zlúčeninami, ktoré spôsobia charakteristický rozdiel medzi ich hmotnosťami alebo je označená iba jedna časť, pri čom druhá zostáva nezmenená. Rôzne označené vzorky sú následne zmiešané a analyzované pomocou hmotnostnej spektrometrie. Na základe relatívnej intenzity pík, dvoch odlišne značených identických peptidov v hmotnostnom spektre, je možné vypočítať ich relatívny pomer a stanoviť tak relatívnu abundanciu proteínu (Chahrour *et al.*, 2015).

Z dôvodu potreby kvantifikácie čoraz väčšieho množstva komplexných vzoriek bolo vyvinutých niekoľko metód vnesenia izotopových značiek do proteínov a peptidov. Na základe princípu zakomponovania izotopovej značky ich delíme do štyroch skupín a to: metabolicky, enzymaticky, chemicky alebo pridaním syntetického izotopovo značeného analóga (AQUA) (Ong a Mann, 2005).

### **2.1.2.1 Metabolické (*In vivo*) značenie**

Cieľom štúdií využívajúcich metabolické značenie je kvantifikácia izotopovo značených proteínov vznikajúcich v procese proteosyntézy v živých bunkách (Nakamura a Oda, 2007). Na dosiahnutie požadovaného výsledku sú do rastového média pridané izotopovo značené metabolické prekurzory. Proteosyntézou sú tieto prekurzory zakomponované do všetkých proteínových štruktúr v každej bunke vznikajúcej kultúry. Na to aby bolo možné vytvoriť dve izotopovo odlišné formy proteínov, je nutné aby kultúry rástli na dvoch médiách obsahujúcich odlišne stabilne izotopovo značené prekurzory. Rozdiely

v hmotnosti medzi proteínmi závisia od ich chemickej štruktúry a sú identifikovateľné iba pomocou hmotnostnej spektrometrie (Ong a Mann, 2005).

Ako prvá vznikla v roku 1999 metóda, ktorá využíva médium s prirodzeným obsahom  $^{14}\text{N}$  atómov dusíka a médium obohatené o  $^{15}\text{N}$  izotopy. Výsledkom je hmotnostné spektrum, v ktorom je rozdiel hmotnosti peptidov závislý na počte zakomponovaných  $^{15}\text{N}$  atómov v ich štruktúre (Oda *et al.*, 1999).

V roku 2002 vznikla metóda SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) (Ong *et al.*, 2002), v ktorej je na rozdiel od metódy  $^{15}\text{N}$  počet izotopových značiek presne definovaný a nie je závislý na peptidovej sekvencii. Do jedného z rastových médií sú najskôr pridané aminokyseliny, najčastejšie  $^{13}\text{C}_6$   $^{15}\text{N}_2$ -lysin a  $^{13}\text{C}_6$   $^{15}\text{N}_4$ -arginin. Tryptickým štiepením proteínov extrahovaných z buniek kultivovaných na tomto médiu sú získané peptidy, z ktorých každý nesie minimálne jednu izotopovo značenú aminokyselinu s výnimkou C-koncových peptidov (Bantscheff *et al.*, 2007).

Výhodou metabolického značenia je v porovnaní s chemickým značením najmä skutočnosť, že izotopovo značené aminokyseliny sú do proteínovej sekvencie zakomponované prirodzene v živých bunkách. Bunky nesúce rôzne izotopovo značené proteíny sú pred lýzou, frakcionáciou a purifikáciou zmiešané. Dochádza tak ku eliminácii niekoľkých chýb spôsobených pri príprave vzorky pred MS analýzou (Ong a Mann, 2005).

### 2.1.2.2 Enzymatické značenie

Táto metóda spája enzymatické štiepenie proteínov a značenie vzniknutých peptidov stabilným izotopom v jednom kroku. Princíp spočíva v štiepení jednej časti proteínov v proteolytickom roztoku obsahujúcom  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  a druhej časti v proteolytickom roztoku obsahujúcom  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  (Reynolds *et al.*, 2002). Podľa počtu naviazaných  $^{18}\text{O}$  atómov sa použité proteázy delia do dvoch skupín: (1) viažuce jeden atóm  $^{18}\text{O}$  a (2) viažuce dva atómy  $^{18}\text{O}$  (Miyagi a Rao, 2007).

Proteázy, ktoré sú zodpovedné za naviazanie jedného  $^{18}\text{O}$  atómu (napr. endoproteáza Lys-N), nie sú pre kvantifikáciu príliš vhodné. Dôvodom je malý rozdiel v hmotnosti medzi dvoma ekvivalentami vzniknutých peptidov (2 Da). Pri vyhodnocovaní vzniknutého hmotnostného spektra môže tak kvôli prekrývajúcim sa píkom nastať chyba (Rao *et al.*, 2005). Výhodou použitia takýchto proteáz je najmä úplné

vylúčenie variability v počte zakomponovaných  $^{18}\text{O}$  atómov. Po zmiešaní vzoriek nedochádza ku ďalším enzymaticky katalizovaným väzbám  $^{18}\text{O}$  atómov na peptidy.

Častejšie využívané sú proteázy, ktoré viažu na vzniknuté peptidy dva atómy  $^{18}\text{O}$ . Medzi najpoužívanejšie proteázy patrí trypsín, endopeptidáza Lys-C a endopeptidáza Glu-C (Miyagi a Rao, 2007). Pri proteolýze je dvoma  $^{18}\text{O}$  atómami stabilne značený každý nový vzniknutý C-koniec peptidu. Medzi dvoma ekvivalentami peptidov tak vzniká hmotnostný rozdiel 4 Da (Reynolds *et al.*, 2002). Nevýhodou tejto metódy je častý vznik zmesi izoforiem spôsobený nedokonalým naviazaním dvoch atómov  $^{18}\text{O}$ . Dôvodom je veľmi pomaly prebiehajúca reakcia, ktorá spôsobuje naviazanie druhého atómu  $^{18}\text{O}$ , najmä ak prebieha za nevhodných podmienok (Miyagi a Rao, 2007).

### 2.1.2.3 Chemické značenie

Teoreticky môžu byť chemickou reakciou označené bočné reťazce všetkých reaktívnych aminokyselín proteínov alebo peptidov. Najčastejšie sú pre tento účel využité bočné reťazce aminokyselín cysteinu a lyzínu (Bantscheff *et al.*, 2007).

Techniky neizobarického značenia sú založené na derivatizácii peptidov dvoch a viacerých vzoriek molekulami, ktoré sa vzájomne líšia vo svojej štruktúre. Po naviazaní takejto molekuly dochádza ku malej zmene v hmotnosti peptidu. Identické peptidy značené odlišnými formami tejto molekuly sa potom v MS1 spektre líšia v hodnote m/z (Rauniyar a Yates, 2014).

Ako prvá vznikla v roku 1999 technika ICAT (isotope-coded affinity tag), ktorá využíva afinitné značky s naviazaným izotopom (Gygi *et al.*, 1999). ICAT sú modifikačné molekuly, ktoré sa kovalentne viažu na bočné reťazce aminokyseliny cysteinu. Tieto molekuly sú značené buď ťažkým alebo ľahkým izotopom a obsahujú naviac molekulu biotínu, ktorá umožňuje afinitnú izoláciu značených peptidov (Unwin *et al.*, 2006). Na počiatku tvorili hmotnostný rozdiel atómy deutéria (Gygi *et al.*, 1999). Ak je rozdiel v hmotnosti medzi sledovanými proteínmi alebo peptidmi spôsobený nahradením atómov vodíka v jednej značke atómami deutéria v druhej značke, môže v analýze nastať niekoľko problémov. Aj keď je rozdiel v hmotnosti medzi dvoma variantmi rôzne označených peptidov veľmi nízky (Thompson *et al.*, 2003), v niektorých separačných metódach (napr. HPLC) dochádza v prípade deutériom značených peptidov ku posunu v ich retenčnom čase (Griffin *et al.*, 2001). Ťažkou značkou značené peptidy pretekajú rýchlejšie ako ľahkou značené. Pri elúcii môžu byť preto rôzne značené

identické peptidy súčasťou odlišných frakcií (Gygi *et al.*, 1999). Ak nedochádza ku spoločnej elúcii párov peptidov, nie je možné považovať jeden peptid v páre za vnútorný štandard voči druhému peptidu. Znižuje sa tak spoľahlivosť a presnosť kvantifikácie. Jeden z páru peptidov môže mať navyše potlačenú ionizáciu iným peptidom, ak je súčasťou inej frakcie (Thompson *et al.*, 2003). Z dôvodu nerovnomernej elúcie odlišne značených peptidov počas chromatografie (Thompson *et al.*, 2003) boli v technike ICAT atómy deutéria nahradené deviatimi atómami  $^{13}\text{C}$ . Odlišne značené peptidy sa tak líšia o 9 Da. Ku identifikácii a kvantifikácii izolovaných peptidov je použitá tandemová hmotnostná spektrometria.

Výhoda tejto metódy spočíva v príprave vzoriek. Proteíny sú najskôr označené a zmiešané ešte pred štiepením. Nedochádza tak ku variabilite (Li *et al.*, 2003), ktorá je v iných metódach (napr. iTRAQ) spôsobená oddeleným štiepením vzoriek pred značením. Nevýhodou je možnosť analyzovať iba dve vzorky v jednom experimente. V dôsledku purifikácie a izolácie iba cysteinových peptidov dochádza ku stratám ostatných peptidov z celkového proteómu (Unwin *et al.*, 2006). Táto metóda teda neumožňuje identifikáciu a kvantifikáciu post-translačne modifikovaných peptidov (Ross *et al.*, 2004).

ICPL (isotope coded protein label) je technika, ktorá podobne ako iTRAQ využíva pre značenie proteínov voľné aminoskupiny vedľajších reťazcov aminokyselín. Ako značky sa najčastejšie používajú deriváty N-hydroxysukcinimidu (NHS), napríklad N-nikotínoyloxy-sukcinimid (Nic-NHS) alebo estery, napríklad 2,5-dioxo-pyrolidín-1-yl-ester kyseliny butánovej (But-NHS) (Schmidt *et al.*, 2005). Každá z použitých značiek môže mať až štyri varianty, ktoré sa od seba líšia v hodnote m/z. Rozdiel v hodnote m/z je prvom prípade spôsobený náhradou atómov vodíka atómami deutéria. Druhý variant značky sa líši zastúpením  $^{13}\text{C}$  atómov v jej štruktúre. Tretí variant značky je kombináciou prvého a druhého variantu (Lottspeich a Kellermann, 2011).

Použitie derivátov NHS umožňuje identifikáciu aj nízko abundantných proteínov alebo analýzu vzoriek s nízkou koncentráciou proteínov. Značne tak zvyšujú citlivosť MS analýzy. Táto metóda poskytuje okrem spoľahlivej kvantifikácie a reprodukovateľnosti aj identifikáciu post-translačne modifikovaných proteínov a proteínových izoforiem. Nad ostatné techniky sa radí najmä jej kompatibilitou s akoukoľvek separačnou technikou. Nevýhodou tejto metódy je potreba vyhodnotiť veľké množstvo získaných dát a to najmä z analýz komplexných vzoriek proteínov izolovaných z vyšších organizmov. Niektoré peptidy sa z dôvodu neúspešného zakomponovania značky môžu v MS spektre objaviť

vo forme jedného píku. V mnohých prípadoch je nutné vyhodnotiť aj takéto peptidy, čo môže výrazne predĺžiť čas analýzy (Schmidt *et al.*, 2005).

Technika TMT (tandem mass tags) využíva na kvantifikáciu tzv. tandemové hmotnostné značky. Ako značky sa spočiatku používali peptidy tvorené piatimi základnými časťami: senzibilizačnou skupinou („sensitization group“), jednou hmotnosť odlišujúcou skupinou („mass differentiated group“), jednou hmotnosť normalizujúcou aminokyselinou („mass normalisation amino acid“), skupinou zvyšujúcou štiepenie („cleavage enhancement group“) a väzbovou skupinou na proteín („protein reactive group“). Od ostatných chemických značiek sa líšia tým, že majú úplne rovnakú celkovú hmotnosť a pri chromatografii označené peptidové páry migrujú v rámci jednej frakcie. Je tým zabezpečené, že sa v MS spektre peptidy prejavujú vo forme jedného píku. Neskôr boli vyvinuté ďalšie značky, ktoré pozostávajú len z troch základných častí. A to reportérovou skupinou, hmotnosť normalizujúcou skupinou a väzbovou skupinou na proteín (Dayon *et al.*, 2008).

Počas disociácie indukovanej kolíziou (CID) dochádza ku tvorbe TMT fragmentov, ktoré sú tvorené senzibilizačnou skupinou a hmotnosť odlišujúcou skupinou (Thompson *et al.*, 2003). V MS/MS spektre vznikajú charakteristické píky s definovanou hodnotou  $m/z$  pre každý TMT fragment (Schlosser a Lehmann, 2000). Z relatívnych intenzít týchto fragmentov je možné určiť relatívnu abundanciu pôvodných proteínov. Táto metóda zvyšuje v porovnaní s ostatnými metódami izotopového značenia celkovú citlivosť kvantifikácie (Thompson *et al.*, 2003) a umožňuje analýzu až desiatich vzoriek naraz (Werner *et al.*, 2014).

Izobarické značky sa od neizobarických líšia najmä z hľadiska štruktúry. Izobarické značky sú molekuly, ktoré majú rovnakú molekulovú hmotnosť. Rozdiel medzi týmito značkami je v usporiadaní ťažkých izotopov v ich štruktúre (Unwin, 2010). Identické, no rôznou formou značené peptidy, sa v MS1 spektre javia vo forme jedného píku, čím sa znižuje pravdepodobnosť prekryvu s píkami iných peptidov (Wiese *et al.*, 2007). Keď sa tieto peptidy podrobia analýze MS/MS, dochádza ku ich fragmentácii, kedy vznikajú charakteristické reporterové ióny s drobným rozdielom v hodnote  $m/z$ . Pomer relatívnych intenzít týchto iónov podáva informácie o relatívnom pomere v obsahu proteínu vo vzorkách (Ross *et al.*, 2004).

Technikou, ktorá je založená na naviazaní izobarických značiek prostredníctvom chemickej reakcie je iTRAQ. Ako vyplýva z jej názvu, iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) využíva izobarické značky, ktorými značí peptidy



a umožňuje tak relatívnu alebo absolútnu kvantifikáciu. Princíp spočíva v naviazaní jednou z niekoľkých štruktúrne podobných značiek na každú vzorku zvlášť (Unwin, 2010). Reaktívnou skupinou u iTRAQ značiek je N-hydroxysukcinimid (NHS). Prostredníctvom NHS sa značky kovalentne viažu na amino skupiny lyzínu a N-koncové aminy všetkých proteolytických peptidov (Ross *et al.*, 2004).

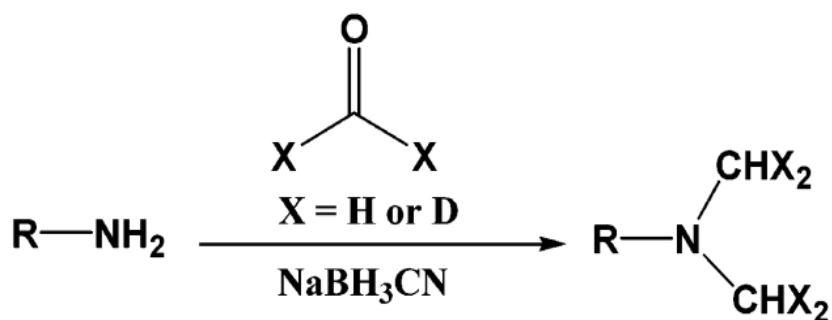
Výhodou komerčne dostupných iTRAQ činidiel je možnosť analýzy až ôsmich vzoriek naraz. Používajú sa napríklad pri porovnávaní výsledkov z rovnakého experimentu vykonaného v rôznych podmienkach (Bantscheff *et al.*, 2007). Nevýhodou tejto metódy je dlhší čas potrebný pre analýzu väčšieho množstva peptidov. Príprava vzoriek prebieha podľa prísnych protokolov a vyžaduje vysokú opatrnosť (Aggarwal *et al.*, 2006). Ďalšou nevýhodou je, že značeniu peptidov predchádza proteolýza, čo môže viesť ku zvýšeniu komplexity vzoriek a variabilite výsledkov spôsobenej rozdielnymi podmienkami štiepenia (Sur, 2013).

Existuje široké spektrum ďalších komerčne dostupných značiek, medzi ktoré patria napríklad anhydridy kyseliny jantárovej (napríklad NHS a jeho deriváty) (Ji *et al.*, 2000) alebo anhydridy kyseliny octovej (Che a Fricker, 2002). Metódy využívajúce izokyanáty (Mason a Liebler, 2003) a izothiokyanáty sa líšia tým, že za vhodných podmienok dochádza iba ku značeniu  $\alpha$ -aminoskupiny na N-konci peptidov (Guillaume *et al.*, 2006). Esterifikáciou deuterovanými alkoholmi môžu byť označené karboxylové skupiny kyseliny glutámovej, asparágovej a C-koniec každého peptidu (Goodlett *et al.*, 2001).

#### **2.1.2.4 Reduktívna dimetylácia**

V tejto práci využívame metódu reduktívnej dimetylácie s využitím formaldehydu a jeho deuterovanej formy. Toto chemické značenie sa okrem analýzy relatívnej proteínovej expresie (Munoz *et al.*, 2011) využíva k detekcii a kvantifikácii fosfoproteínov (Boersema *et al.*, 2009), glykoproteínov (Sun *et al.*, 2012) alebo proteínových interakcií (Dadvar *et al.*, 2009). Podstatou tejto metódy je dimetylácia  $\epsilon$ -aminoskupiny lyzínu a N-koncovej aminoskupiny proteolytických peptidov.

Pridaním formaldehydu ku zmesi peptidov vzniká najskôr medzi formaldehydom a N-koncovou  $\alpha$ -aminoskupinou alebo  $\epsilon$ -aminoskupinou lyzínu každého peptidu



Obr. 1 Priebeh derivatizácie aminoskupiny formaldehydom a deuterovaným formaldehydom.

(Prevzaté od Hsu et al., 2003)

Schiffova báza. Tá je následne prídavkom kyanoborohydridu sodného redukovaná za tvorby sekundárneho amínu. Sekundárny amín reaguje s ďalšou molekulou formaldehydu za vzniku dimetylamínu (Obr. 1). Použitím formaldehydu dochádza ku zvýšeniu hmotnosti peptidu o 28 Da pre každú aminokyselinu lyzín a N-koncovú aminoskupinu (Hsu *et al.*, 2003). Ak je N-koncovou aminokyselinou prolín, dochádza iba ku tvorbe monometylamínu a zvýšeniu hmotnosti o 14 Da (Hsu *et al.*, 2005). V prípade použitia ťažkej značky rastie hmotnosť peptidu o 32 Da pre každú aminokyselinu lyzín a N-koncovú aminoskupinu. Ak je vytvorený monometylamín na N-koncovom prolíne, rastie hmotnosť o 16 Da (Hsu *et al.*, 2003). Pri analýze troch vzoriek naraz je možné využiť aj ďalšiu značku, v ktorej je  $^{12}\text{C}$  uhlík formaldehydu nahradený  $^{13}\text{C}$  uhlíkom. Vzniknutá Schiffová báza je pomocou kyanoborodeuteridu sodného redukovaná za tvorby 4 Da ťažšej značky ako v prípade bežného deuterovaného formaldehydu (Boersema *et al.*, 2008). Použitím deuterovaného a nedeuterovaného formaldehydu s kyanoborohydridom alebo kyanoborodeuteridom sodným môže vzniknúť až 5 rôznych kombinácií značiek s odlišnou zmenou hmotnosti. Hmotnostný rozdiel medzi použitými značkami je však len 2 Da, čo môže v prípade viac nabitých peptidov spôsobovať ťažkosti pri MS analýze a jej vyhodnocovaní (Wu *et al.*, 2014).

Výhodou redukívnej dimetylácie je hlavne použitie pomerne lacných zlúčenín a laboratórnych nástrojov. V porovnaní s inými metódami ako iTRAQ alebo SILAC je rýchla a jednoduchá (Boersema *et al.*, 2009b). Ďalšou prednosťou tejto metódy je, že počas MS/MS analýzy nedochádza ku výraznej zmene iónového stavu, čoho dôsledkom je zachovanie jonizačnej efektivity vznikajúcich fragmentov. Na druhej strane, nedostatkom tejto metódy je, že značenie nasleduje až po úspešnej proteolýze (Hsu *et al.*

2003). Oddeleným štiepením porovnávaných vzoriek môže dochádzať ku variabilite a výsledok kvantifikácie v takom prípade nemusí byť správny (Boersema *et al.*, 2009a).

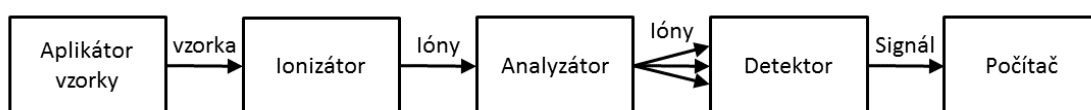
## 2.2 Hmotnostná spektrometria (*MS – mass spectrometry*)

Hmotnostná spektrometria sa stala veľmi užitočným nástrojom kvantitatívnej a kvalitatívnej analýzy veľkého množstva proteínov. Vysoká citlivosť, detekčný limit, rýchlosť a rôznorodosť aplikácií sú vlastnosti, ktoré postavili túto techniku na významnú pozíciu v proteomickej analýze. Ku analýze komplexných vzoriek je obvykle hmotnostná spektrometria navyše spojená s vhodnou separačnou technikou. Separované zložky komplexných zmesí sú rozdelené a podrobené MS analýze buď okamžite počas ich separácie alebo až po ich úplnej separácii off-line. Okrem proteomiky má vysoké využitie aj v iných analytických aplikáciách ako je kontrola znečistenia ovzdušia, forenzná chémia, potravinárstvo, atómová a reakčná fyzika, kinetika a mnoho ďalších.

Hmotnostný spektrometer pozostáva z piatich základných častí. Diagram základnej stavby hmotnostného spektrometra je zobrazený na obrázku (Obr. 2). Ako prvý je umiestnený aplikátor vzorky, ktorého úlohou je vnieť analyzovanú molekulu do MS systému. Ionizačný zdroj vytvára z analyzovanej molekuly ióny, ktoré sú jedným alebo niekoľkými za sebou nasledujúcimi analyzátormi rozdelené na základe hmotnosti  $m$  a náboja  $z$ . Detektor tieto ióny zachytáva a počíta, čím určuje ich relatívnu početnosť. Získané dáta odosiela na spracovanie do počítačového systému. Vynesením relatívnej abundancie proti hodnote  $m/z$  vzniká hmotnostné spektrum, ktoré tento systém vhodne upraví (de Hoffmann a Stroobant, 2007).

### 2.2.1 Ionizačné techniky

Ionizačné techniky sa na základe úrovne fragmentácie molekúl rozdeľujú na tvrdé a mäkké. Typickou tvrdou ionizačnou technikou, ktorá je zároveň aj jednou z prvých ionizačných techník hmotnostnej spektrometrie je ionizácia elektrónmi (EI – electron impact). Táto technika sa využíva pri analýzach organických zlúčenín s nízkou



Obr. 2 Schéma hmotnostného spektrometra.

molekulovou hmotnosťou, ktoré môžu byť jednoducho prevedené do plynnej fáze. Počas analýzy dochádza pôsobením vysokoenergetických elektrónov ku rozsiahlej fragmentácii molekúl vzorky. Z dôvodu tvorby veľkého množstva malých fragmentov nie je možné určiť hmotnosť molekúl. Na druhej strane je táto technika vhodná ku určeniu štruktúry analyzovanej vzorky (de Hoffmann a Stroobant, 2007; Maher *et al.*, 2015). Mäkké ionizačné techniky vytvárajú v hmotnostnom spektre molekulové ióny, ktoré poskytujú dostatok informácií o identite neznámej zlúčeniny. Počas analýzy dochádza ku nižšej fragmentácii ako v prípade tvrdých techník (Portolés *et al.*, 2011). Najčastejšie mäkké techniky využívajú ku ionizácii elektrosprej (ESI – electrospray ionization) alebo laser za prítomnosti matrice (MALDI – matrix-assisted laser desorption/ionization). Medzi ďalšie mäkké ionizačné techniky patrí napríklad desorpcia plazmou (PD – plasma desorption), bombardovanie rýchlymi atómami (FAB – fast atom bombardment) alebo chemická ionizácia (CI – chemical ionization).

Počas ESI ionizácie dochádza ku prevedeniu iónov kvapálnej fáze na ióny plynnej fáze za použitia elektrickej energie. Tento proces prebieha v troch krokoch. Najskôr je kvapalina rozprášená prechodom oceľovej alebo kremičitej kapiláry, ktorá je pod vysokým napätím. Vzniká tak para tvorená drobnými kvapkami s nábojom. Vzniknuté kvapky putujú gradientom tlaku a elektrického potenciálu smerom ku analyzátoru. Vplyvom zvýšenej teploty alebo dusíka ako inertného plynu, dochádza k znižovaniu týchto kvapiek, čím narastá ich povrchové napätie. K znižovaniu kvapiek môže dochádzať aj vplyvom Coulombovej explózie, pri ktorej sa kvapka rozpadne vplyvom vysokej hustoty náboja. V určitom momente je sila elektrického poľa kvapky tak vysoká, že umožňuje iónom opustiť kvapku vo forme plynnej fáze. Uvoľnené ióny sú na koniec urýchlené smerom ku hmotnostnému analyzátoru, kde sú rozdelené (Gaskell, 1997; Ho *et al.*, 2003). Zlepšenie techniky priniesol objav mikro- a nano-ESI, u ktorých je prietok aplikovanej vzorky kapilárou znížený na nanolitre za minútu. Citlivosť metódy je takýmto spôsobom zvýšená (Yates *et al.*, 2009). Vďaka produkcii viacnásobne nabitých iónov je použité ESI najčastejšie spojené s analyzátormi, ako je kvadrupól alebo iónová pasca (de Hoffmann a Stroobant, 2007).

MALDI je ionizačná technika, pri ktorej je využívaná energia lasera na prevedenie vzorky zmiešanej s vhodnou matricou do plynnej fáze s jej následnou ionizáciou. Matrica je malá organická zlúčenina, ktorá absorbuje energiu vlnových dĺžok lasera. V MALDI MS analýze má tri základné funkcie. Jej prítomnosť zabezpečuje, že sú molekuly analytu od seba oddelené a nedochádza ku ich agregácii. Absorbuje energiu fotónov lasera, kedy

dochádza ku excitácii elektrónov matrice na vyššiu hladinu. Nakoniec prenáša túto energiu molekulám analytu a tie sú následne ionizované (Hillenkamp a Karas, 1990).

Vzorka je najskôr zmiešaná s matricou a nanesená na MALDI vzorkovaciu doštičku, kde je táto zmes ponechaná voľnej kryštalizácii. Po ožiarení kryštalizovanej zmesi krátkym impulzom lasera s vysokou energiou dochádza ku absorpcii tejto energie matricou, ktorá je z povrchu doštičky odparená vo forme oblaku plynu neutrálnych, protonizovaných a deprotonizovaných molekúl. Tieto častice následne prenesú protóny na molekuly analytu v plynnej fáze, čím ich ionizujú. V závislosti od použitej matrice, intenzity lasera a napätia môžu vzniknúť jednoduché alebo niekoľkonásobne nabité kladné ióny analytu (Hillenkamp a Karas, 1990; Karas a Krüger, 2003). Ióny sú následne urýchlené vplyvom elektrostatického poľa smerom ku analyzátoru. Najčastejšie využívaným analyzátorom spojeným s MALDI je time-of-flight (TOF). Taktiež sa využívajú aj analyzátory, ktoré majú schopnosť zadržiavať ióny, ako iónová pasca alebo technika iónovej cyklotronovej rezonancie fourierovou transformáciou (FTICR) (de Hoffmann a Stroobant, 2007).

### **2.2.1.1 ESI verus MALDI**

MALDI a ESI sú dve najčastejšie využívané ionizačné techniky proteínovej hmotnostnej spektrometrii. Vďaka schopnosti vytvárať proteínové a peptidové ióny s veľmi ojedinelou fragmentáciou sa tieto techniky stali kľúčovými v takmer každej hmotnostnej analýze peptidov. Keďže sú proteíny niekoľkonásobne väčšie ako peptidy, majú v hmotnostnom spektrometri nižšiu rýchlosť a nižšiu schopnosť sekundárnej elektrónovej emisie ako peptidy, čoho výsledkom je nižšia citlivosť MS. Avšak, citlivosť oboch techník je na pikomolárnej a femtomolárnej úrovni celých proteínov uspokojivá (Trauger *et al.*, 2002).

Napriek tomu, že sú obe techniky veľmi efektívne a spoľahlivé, existujú medzi nimi rozdiely. V prípade ESI existuje iba niekoľko nutných krokov prípravy vzorky, ktoré sú jednoduché a rýchle. V porovnaní s MALDI táto technika nezahŕňa použitie matrice, vďaka čomu je celý proces prípravy vzorky skrátený. U MALDI je dnes možné skrátiť analýzu pomocou jej automatizácie. Analýza je kontrolovaná počítačom, ktorého úlohou je optimalizácia všetkých dôležitých faktorov s cieľom znížiť jej čas a maximalizovať kvalitu signálu (Trauger *et al.*, 2002).

Z hľadiska množstva použitej vzorky je u konvenčnej ESI na poskytnutie dostatočných informácií o molekulovej hmotnosti biomolekúl spotrebované množstvo vzorky približne 1 pikomol, zatiaľ čo u MALDI je to zvyčajne menej. Výhodnejšie je použitie nano-ESI, kedy sú spotrebované iba subpikomolárne množstvá.

Ďalším dôležitým parametrom je aj samotná ionizácia. MALDI tvorí ióny s rozsahom náboja 1+ až 4+. Ak sa jedná o peptidy, sú to najmä ióny s nábojom 1+ alebo 1-. ESI má schopnosť tvoriť niekoľkonásobne nabité peptidové ióny s nábojom až 4+. Schopnosť ESI-MS tvoriť niekoľkonásobne nabité ióny umožňuje analýzu aj veľkých proteínov s použitím analyzátorov s obmedzeným rozsahom m/z (Trauger *et al.*, 2002). Ióny s nábojom 2+ majú v MS/MS analýze navyše schopnosť vytvárať spoľahlivé fragmentačné spektrá. Táto vlastnosť je veľmi dôležitá v *de novo* sekvenovaní proteínov a peptidov (Covey *et al.*, 1991).

Jednou z najväčších výhod ESI je možnosť jej prepojenia s kvapalinovou chromatografiou, ktorá rozdeľuje vzorku na frakcie. Peptidy, ktoré sú súčasťou týchto frakcií môžu byť použitím tandemovej LC/ESI/MS okamžite analyzované (Covey *et al.*, 1991). MALDI môže byť s kvapalinovou chromatografiou prepojená on-line iba s využitím robotického dávkovača, ktorého úlohou je v definovaných časových intervaloch zmiešať matricu s pritekajúcou vzorkou a naniesť ju v malom množstve na MALDI doštičku (Bodnar *et al.*, 2003).

Jednou zo slabín techniky ESI je jej nízka tolerancia ku kontaminujúcim látkam. Použitím nano-ESI, ktorá je modifikovanou formou konvenčnej ESI, dochádza ku značnému zníženiu množstva vzorky vychádzajúcej z nanokapiláry a tým aj tvorbe menších kvapiek. Keďže sú tieto kvapôčky menšie hneď po výstupe z elektrospreja, majú vyšší náboj. Ku ich rozpadu na menšie kvapôčky dochádza okamžite. Nedochoádza preto ku zvyšovaniu koncentrácie solí v kvapôčkach počas ich rozpadu. Nano-ESI má preto v porovnaní s konvenčnou ESI vyššiu toleranciu ku soliam a iným interferujúcim látkam prítomným vo vzorke (Juraschek *et al.*, 1999). U techniky MALDI je tolerancia voči soliam vyššia, ale taktiež má určité hranice. Analýzu môže ovplyvniť pufor, v ktorom je analyt rozpustený. MALDI má veľmi vysokú toleranciu voči 50 mmol.l<sup>-1</sup> pufru kyseliny N,N-bis(2-hydroxyetyl)-2-aminoetánsulfónovej s použitím kombinovanej matrice kyseliny sinapovej (SA) a hydrogencitrónanu amónneho (DAHC). Avšak, pri použití fosfátového pufru s rovnakou koncentráciou a rovnakou matricou nie je možné pozorovať v spektre žiadne signály analytu (Kallweit *et al.*, 1996).

V rámci štúdia post-translačných modifikácií je vhodnejšie použiť techniku MALDI. Najmä ak sa jedná o štúdium glykoproteínov. ESI poskytuje v štúdiu glykoproteínov spektrá, ktoré sú veľmi komplikované a ťažko spracovateľné. Ku spoľahlivej interpretácii spektra z ESI-MS analýzy je potrebná veľmi vysoká čistota vzorky (Trauger *et al.*, 2002). Vzhľadom ku tomu, že MALDI vytvára glykopeptidy väčšinou len s jedným nábojom, vzniká spektrum, ktorého vyhodnotenie je jednoduchšie (Liu *et al.*, 2014).

V kvantitatívnych štúdiách sa MALDI-MS používa z niekoľkých dôvodov. Má schopnosť analyzovať molekuly v širokom rozmedzí hmotnosti, má vysokú citlivosť a vyžaduje krátky čas na prípravu vzorky a analýzu (Bucknall *et al.*, 2002). Taktiež má aj niekoľko nevýhod, ktoré v niektorých prípadoch neumožňujú dostatočne presnú kvantifikáciu. Hlavným nedostatkom je nízka reprodukovateľnosť meraní. Heterogenita vzorky s matricou spôsobuje variabilitu medzi nameranými hodnotami intenzít signálov zo vzoriek pripravených v rovnakých podmienkach, ale aj medzi nameranými hodnotami rovnakej vzorky. Táto heterogenita je spôsobená vznikom miest na doštičke, v ktorých dochádza ku vyššej agregácii kryštálov a vzorky. Merania rovnakej vzorky je preto nutné niekoľkokrát zopakovať (Szájli *et al.*, 2008). Ďalšou nevýhodou je, že v prípade komplexných vzoriek proteínov, sa môžu signály detekovaných iónov s rovnakou hodnotou  $m/z$  prekrývať v spektre. Týmto pádom narastá intenzita signálu a nie je preto vhodný na kvantifikáciu. Taktiež, ak je v komplexnej vzorke koncentrácia jedného analytu, prípadne matrice omnoho vyššia ako koncentrácia pozorovaného analytu, dochádza ku potlačeniu signálu nízkoabundantného analytu signálom vysokoabundantného analytu. Ku tomuto javu dochádza najmä, ak je molárny pomer matrice ku analytu 3000:1 a menej. Ak je intenzita signálu príliš nízka, môže byť náročné rozoznať signál analytu od signálu pozadia (Wilkinson *et al.*, 1997). Napriek nevýhodám je MALDI ionizácia spojená s TOF analyzátorom využívaná v mnohých kvantitatívnych experimentoch. Najčastejšie v spojení so stabilným izotopovým značením analyzovaných vzoriek ale aj vo forme label-free kvantifikácie, kedy môže byť offline prepojená s ultra vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (UHPLC – ultra-high performance liquid chromatography) (Benk a Roesli, 2012).

V kvantitatívnych analýzach je častejšie využívaná technika ESI-MS. Vo forme tandemovej hmotnostnej spektrometrie MS/MS umožňuje aj kvantifikáciu s použitím izobarických značiek. Pri kvantifikácii je veľmi dôležitá inkorporácia vnútorného štandardu. Použitie štandardu znižuje variabilitu spôsobenú citlivosťou systému. Taktiež

je zabezpečená kompenzácia straty vzorky počas jej prípravy (Ho *et al.*, 2003). Najpodstatnejšou nevýhodou kvantifikácie použitím ESI-MS je prítomnosť efektu potlačenia ionizácie, ktorý vzniká interferenciou nežiaducich zlúčenín s analyzovanou vzorkou. Tento efekt sa objavuje v prípade analýzy biologických vzoriek obsahujúcich vysokú koncentráciu neprchavých zlúčenín. Fyzikálno-chemické mechanizmy tohto deja nie sú úplne popísané. Pravdepodobne dochádza ku potlačeniu tvorby menších kvapôčok pri odparovaní tým, že je zvýšené ich povrchové napätie. Ďalším z dôvodov môže byť zvýšenie bodu varu, ktorý má na tvorbu kvapôčok rovnako negatívny vplyv (King *et al.*, 2000). Zavedenie purifikačného procesu pred analýzou dokáže tento problém vyriešiť. Preto sa na kvantifikáciu najčastejšie používa ESI-MS v spojení s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC – high performance liquid chromatography) (Ho *et al.*, 2003).

### 2.2.2 Hmotnostné analyzátory

Hmotnostné analyzátory sú súčasťou každého hmotnostného spektrometra. Umožňujú zadržať alebo rozdeliť ióny vznikajúce vplyvom ionizátora na analyt na základe pomeru ich hmotnosti a náboja  $m/z$ . Kvadrupól (Q – quadrupole) využíva  $m/z$  stabilitu iónu. Iónové pasce (IT – ion trap), Orbitrap a iónová cyklotrónová rezonancia (ICR – ion cyclotron resonance) rozdeľujú ióny na základe  $m/z$  rezonančnej frekvencie a analyzátory doby letu (TOF – time of flight) zaznamenávajú čas za ktorý pozorovaný ión preletí hmotnostným spektrometrom. Existuje niekoľko hmotnostných spektrometrov, v ktorých je niekoľko analyzátorov zapojených tandemovo za sebou. Dochádza tak ku zvýšeniu citlivosti a splneniu špecifických požiadaviek mnohých analýz. Každý z analyzátorom má vlastnosti, ktorými sa líši od ostatných. Môže to byť z hľadiska rozmedzia  $m/z$ , rýchlosti analýzy, citlivosti alebo dynamického rozsahu (Yates *et al.*, 2009).

Kvadrupól je analyzátor, ktorý využíva stabilitu trajektórie v oscilujúcom elektrickom poli. Je tvorený štyrmi tyčami, medzi ktorými je voľný priestor. Do tohoto priestoru vchádza ión, ktorý je priťahovaný ku tyči s opačným nábojom. Zmenou potenciálu tyče, predtým než dopadne na ňu ión, dochádza ku zmene jeho smeru letu. Pôsobením nastaveného jednosmerného napätia a rádiových frekvencií sa ustáli trajektória iónov so špecifickou  $m/z$ , prípadne iónov v určitom rozsahu  $m/z$  a tie opustia analyzátor. Ostatné ióny nemajú usmernenú trajektóriu a narážajú do tyčí. V mnohých analýzach je využívaný tandemovo usporiadaný trojitý kvadrupól (QqQ – triple



quadrupole). V takom prípade sú prvý a posledný kvadrupól hmotnostnými analyzátormi a prostredný kvadrupól kolíznou celou. Rôznym nastavením týchto analyzátorov je možné analyzovať vzorky v niekoľkých módoch (de Hoffmann a Stroobant, 2007).

Iónovú pascu si možno predstaviť ako ohnutý kvadrupól s tvarom uzavretej slučky. Preto sa tento analyzátor nazýva aj kvadrupólová iónová pasca. Ióny sú po vstupe do iónovej pasce zadržané vo vnútri pôsobením rádiovfrekvenčného napätia aplikovaného na prstencovú elektródu. Do pasce vstúpia najskôr všetky ióny bez ohľadu na ich hodnotu  $m/z$ . Ióny majú charakteristickú  $m/z$  a teda aj špecifickú oscilačnú frekvenciu. Nárast amplitúdy prstencovej elektródy spôsobí zvýšenie oscilačnej frekvencie vybraného iónu. Ku vymršteniu iónu z iónovej pasce dochádza vtedy, ak je jeho oscilačný pohyb dostatočne vysoký na to aby sa stal nestabilný (Lane, 2005).

TOF analyzátor je jedným z najjednoduchších analyzátorov používaných v hmotnostnej spektrometrii. Počas analýzy je  $m/z$  iónu vypočítané z času, za ktorý preletí vzdialenosť medzi zdrojom iónov a detektorom v komore analyzátora. Rozlíšenie analyzátora môže byť znížené niekoľkými faktormi, ktoré spôsobujú, že ióny s rovnakou  $m/z$  majú odlišný čas letu. Existujú dve vylepšené techniky TOF, ktoré tento problém riešia. Prvý prípad sa nazýva oneskorená extrakcia. Vniknuté ióny najskôr expandujú do priestoru bez pôsobenia elektrického poľa, kde sú na krátky čas udržané. Následným pôsobením napätia sú vymrštené smerom ku detektoru. Druhá technika využíva takzvané reflektory. Úlohou reflektrov je poslať ióny, ktoré sa ku nim priblížia, späť do preletovej trubice smerom ku detektoru. Uhol, pod ktorým sú poslané späť, je odlišný od uhla pod akým dorazia ku reflektromu. Je tým zabezpečené, aby sa nezrazili s iónmi, ktoré prichádzajú zo zdroja. Zníženiu variability v čase letu iónov s rovnakou  $m/z$  napomáha tým, že zrovná odlišnosti v ich kinetickej energii (Yates, 1998; Lane, 2005).

### **2.2.3 Detektory**

Detektory slúžia na zaznamenanie dopadajúcich iónov a ich premenu na vhodný signál. V minulosti sa najčastejšie využívali fotografické doštičky, ktoré boli zároveň aj medzi prvými detektormi využité v hmotnostnej spektrometrii. Niektoré novšie typy týchto detektorov sa používajú dodnes. Majú však niekoľko nevýhod, medzi ktoré patrí nízka, až priemerná citlivosť, krátky dynamický rozsah a v dnešnej dobe nízky počet výrobcov fotografických doštičiek. Jedným z prvých detektorov v MS je aj Faradayov detektor. Umožňuje efektívne zachytenie iónov a minimalizáciu straty spôsobenej ich rozptýlením.

Faradayove detektory sa používajú najmä v monitorovaní vysokointenzívnych a nízko-intenzívnych signálov alebo v analýzach izotopov. Elektrónové násobiče sú dnes najpoužívanejšími detektormi v MS. Typický sekundárny elektrónový násobič je tvorený dynódou, do ktorej vrážajú ióny prichádzajúce z analyzátoru. Po náraze vznikajú sekundárne elektróny, ktoré vrážajú do ďalších dynód a vzniká kaskáda. Počas tejto kaskády môže byť signál jedného iónu vynásobený  $10^6$ -krát a viac. Bežne používané sú aj elektro-optické iónové detektory zvané Dalyho detektory (Koppelaar *et al.*, 2005).

### 2.3 Štiepenie proteínov v kvantitatívnej proteomike

Základom všetkých kvantitatívnych metód využívajúcich stabilné izotopové značenie a analýzu použitím MS je prevedenie proteínu na proteolytické peptidy (Ong a Mann, 2005). V závislosti na použitej metóde značenia môžu obsahovať vo svojej štruktúre izotopovo značené skupiny už pred štiepením alebo je ich možné izotopovo označiť až po štiepení. Štiepenie proteínov vysoko selektívnymi proteázami je nutné najmä z dôvodu zvýšenia citlivosti analýzy. Štiepenie síce zvýši komplexitu vzorky, ale zníži biochemickú heterogenitu tým, že umožní odlišiť post-translačne modifikované proteíny a izoformy proteínov. Vzhľadom ku tomu, že je každý proteín reprezentovaný niekoľkými peptidmi, je zvýšená aj možnosť jeho identifikácie (Zhang *et al.*, 2013). Porovnanie väčšieho množstva odlišne značených peptidov taktiež zvyšuje spoľahlivosť kvantifikácie.

Na prevedenie proteínov extrahovaných z biologických materiálov na peptidy vhodné pre hmotnostnú spektrometriu, existujú dva spôsoby. V prvom prípade sú proteíny rozpustené v detergentoch a následne separované použitím SDS polyakrylamidovej gélovej elektroforézy. Po separácii sú proteíny štiepené priamo v gély (Shevchenko *et al.*, 1996). Druhou alternatívou prípravy proteínov je ich extrakcia silným chaotropným činidlom, ako napríklad močovinou alebo tiomočovinou. Následne dochádza ku precipitácii týchto proteínov a ich štiepeniu v denaturačných podmienkach. Prítomnosť nečistôt počas štiepenia môže narušiť výsledok proteomickej analýzy a spôsobiť nesprávnu interpretáciu získaných dát. V porovnaní so štiepením v roztoku, má štiepenie v gély výhodu, že nedochádza pôsobením iných látok ku narušeniu štiepenia. Na druhej strane uvoľnenie štiepených peptidov z gélu je komplikované a nemusí byť dosiahnutý ich 100% výtlačok (Wiśniewski *et al.*, 2009).

Na dosiahnutie požadovaného výsledku je v prvom rade nutné zvoliť vhodný protokol štiepenia. Nedokonalé štiepenie proteínov vedie ku neschopnosti stanovenia koncentrácie proteínu vo vzorke a teda aj ku nepresnej kvantifikácii. Každý protokol štiepenia musí byť preto optimalizovaný s cieľom zabezpečiť čo najefektívnejšie štiepenie (Norrgran *et al.*, 2009). Existuje zároveň veľké množstvo protokolov, ktorých výsledkom nie je iba štiepenie proteínov, ale aj následné odstránenie zvyškov použitých látok, solí alebo detergentov, ktorých prítomnosť neumožňuje analýzu MS (Medzihradzsky, 2005).

### **2.3.1 Proteázy v kvantitatívnej proteomike**

Proteázy sú enzýmy, ktoré spôsobujú hydrolýzu peptidovej väzby medzi aminokyselinami polypeptidového reťazca. V proteomických analýzach sa obvykle používajú vysoko špecifické proteázy, ktoré obvykle štiepia peptidovú väzbu za jednu alebo dvoma konkrétnymi aminokyselinami. V dôsledku štiepenia špecifickou proteázou vznikajú peptidy, ktoré majú na svojom N- alebo C-konci charakteristické aminokyseliny. Tieto peptidy obsahujú chemické skupiny, ktoré môžu byť rôzne derivované, čím môžu byť peptidy porovnávaných vzoriek proteínov vzájomne odlišené. Kvantitatívne metódy hmotnostnej spektrometrie sa spoliehajú na výskyt peptidov, ktoré sú po štiepení proteínu identifikované vždy a s dostatočnou intenzitou. Abundancia vybraného peptidu reprezentuje abundanciu celého proteínu. Avšak, akákoľvek zmena v štiepení ovplyvňuje reprodukovateľnosť a spoľahlivosť celej analýzy (Proc *et al.*, 2010).

Podľa Enzyme Commission patria proteázy do podskupiny 3.4, teda hydrolázy, ktoré pôsobia na peptidovú väzbu. Podľa miesta štiepenia sa ďalej delia na endopeptidázy a exopeptidázy. Endopeptidázy štiepia polypeptidový reťazec v jeho vnútri, zatiaľ čo exopeptidázy štiepia reťazec od jedného z jeho koncov ku druhému postupne. Exopeptidázy, ktoré štiepia proteín od jeho N-konca sa označujú ako aminopeptidázy. Exopeptidázy, ktoré štiepia od C-konca nazývame karboxypeptidázy. Proteázy sa delia aj na základe katabolického mechanizmu, špecificity a teplotného alebo pH optima. Rozdelenie proteáz do skupín je dané nukleofilnou aminokyselinou v ich katalytickom mieste, teda aminokyselinou, ktorá spôsobuje štiepenie peptidovej väzby (Tsiatsiani a Heck, 2015).

Všetky serínové proteázy využívané v kvantitatívnej proteomike patria do skupiny S1. Aktívne miesto týchto proteáz je tvorené Asp, Ser a His katalytickou triádou (Tsiatsiani a Heck, 2015).

### 2.3.2 Trypsín

V tejto bakalárskej práci používame ku štiepeniu proteínu enzým trypsín. Trypsín (EC 3.4.21.4) bol objavený v roku 1876 Wilhelmom Freidrichom Kühnem. Je serínová proteáza vyskytujúca sa v tráviacej sústave väčšiny stavovcov, kde hydrolyzuje proteíny. Produkovaný je v pankrease vo forme proenzýmu trypsinogénu. Aktívna forma trypsínu vzniká pôsobením enterokinázy alebo trypsínu na trypsinogén. Optimálne pH trypsínu je 8, ale medzi živočíšnymi druhmi sa mierne líši. Dlhodobú stabilizáciu trypsínu je možné dosiahnuť jeho lyofilizáciou alebo rozpustením v roztoku s hodnotou pH 3, pri ktorej je vysoko inaktivovaný (Baird a Craik, 2013).

Jeho biochemická stabilita a špecificita, odolnosť v širokom spektre prípravy vzoriek a analýz a relatívne nízka cena robí z trypsínu najpoužívanejšiu proteázu v proteomike (Walmsley *et al.*, 2013). Je charakteristický vysokou špecificitou voči vybraným peptidovým väzbám v polypeptidovom reťazci. Tieto väzby štiepi na C-konci aminokyselín lyzínu a arginínu. Jeho špecificita je však vyššia ku arginínu v porovnaní s lyzínom. Katalytická účinnosť ( $k_{cat}/K_m$ ) trypsínu je ku peptidu s aminokyselinovou sekvenciou GGGGRGGH až 4,9-krát vyššia ako ku peptidu GGGGKGGH (Ding a Yang, 2015). Hodnota katalytickej účinnosti sa však mení v závislosti od zloženia substrátu. Ku štiepeniu trypsinom nedochádza ak je na C-konci v mieste štiepenia prolín.

Jednou z hlavných výhod trypsínu je schopnosť vytvárať peptidy, ktorých dĺžka dosahuje 10-15 aminokyselín. Je to spôsobené tým, že aminokyseliny lyzín a arginín tvoria vo väčšine proteómov iba 5 % z celkového obsahu aminokyselín. Zvyčajne takéto peptidy obsahujú minimálne dve pozitívne bazické skupiny. Jednu na N-konci a druhú na C-konci aminokyselín arginínu a lyzínu. Ich protonáciou sú tvorené  $[M+2H]^{2+}$  ióny, ktoré zvyšujú tvorbu fragmentov plynnej fáze (Brownridge a Beynon, 2011). Peptidy s takýmito vlastnosťami sú vhodné ku bežným LC-MS/MS analýzám založeným na CID (Burkhart *et al.*, 2012). Fragmentáciou dochádza ku tvorbe y iónov s vysokou hmotnosťou, čo uľahčuje interpretáciu MS/MS spektra (Olsen *et al.*, 2004). Trypsín môže mať taktiež vedľajšiu transpeptidázovú aktivitu, pri ktorej spôsobuje kovalentné naviazanie aminokyselín lyzínu alebo arginínu na N-koniec peptidu alebo celého peptidu

ku inému peptidu (Schaefer *et al.*, 2005). Proteomickú analýzu môže narušiť aj jeho chymotrypsínová aktivita, ktorá spôsobuje štiepenie na C-konci aminokyselín tryptofánu, tyrozínu a fenylalanínu. Táto vedľajšia aktivita nastáva pôsobením pseudotrypsínu, ktorý vzniká autoproteolytickou aktivitou a je vysoko variabilná (Keil-Dlouhá *et al.*, 1971). Špecifickosť trypsinu môže navyše ovplyvniť kontaminácia. Medzi nečistoty patria veľké neaktívne fragmenty trypsinu alebo produkty jeho autolýzy. Tieto kontaminanty môžu byť pred použitím trypsinu odstránené pomocou afinitnej chromatografie (Chamrád *et al.*, 2011). Zníženú špecifickosť môže spôsobiť aj nesprávne skladovanie (Kunitz a Northrop, 1934) a nevhodné podmienky štiepenia (Proc *et al.*, 2010).

Efektívnosť štiepenia trypsinom je v každej analýze veľmi dôležitá. Existuje veľké množstvo postupov, ktorých cieľom je zabezpečiť čo najvyššiu úroveň štiepenia s čo najnižšou stratou alebo poškodením vzorky. Postupy pozostávajú z denaturácie proteínov rozrušením ich štruktúry pomocou denaturujúcich činidiel alebo detergentov a zjednodušeniu prístupu štiepných miest trypsinu. Na dosiahnutie optimálnych podmienok štiepenia je nutné aby denaturujúca látka nenarušila aktivitu trypsinu ale zároveň dostatočne pôsobila na proteíny vo vzorke. Taktiež nesmie mať modifikujúce účinky a musí byť kompatibilná s použitou MS analýzou (Glatter *et al.*, 2012). Najpoužívanejšími detergentami sú SDS a Triton X-100. Ich prítomnosť v reakčnej zmesi narúša väzbovosť, elúciu a ionizáciu peptidov počas LC-MS/MS analýzy a je ich nutné pred analýzou odstrániť. Z toho dôvodu sa používa niekoľko detergentov kompatibilných s MS analýzou, medzi ktoré patrí napríklad RapiGest SF alebo Invitrosol. Použitie týchto detergentov okrem zjednodušenia postupu prípravy vzorky zároveň zvyšuje celkovú efektívnosť štiepenia trypsinom (Chen *et al.*, 2007). Okrem SDS sa ako chaotropné činidlo používa najčastejšie močovina. Jej výhoda je, že môže byť pred MS analýzou jednoducho odstránená extrakciou na pevnej fáze (Glatter *et al.*, 2012). Organické rozpúšťadlá ako acetonitril, propan-2-ol alebo metanol sú taktiež látky, ktoré zvyšujú efektívnosť štiepenia trypsinom. Aj keď majú tieto látky pozitívne denaturačné účinky, proteíny sú v nich slabšie rozpustné a precipitujú. Napriek tomu 80% vodné roztoky týchto rozpúšťadiel vedú k väčšiemu počtu identifikovaných peptidov (Chen *et al.*, 2007). Avšak, podľa Wall *et al.*, 2011 nedochádza ku zvýšeniu aktivity trypsinu. Jeho aktivita je pri koncentráciách acetonitrilu viac ako 40% dokonca znížená. Dôvodom zlepšenej identifikácie je iba väčší počet nesprávne naštiepených peptidov, ktoré spolu pokrývajú väčšiu časť proteínovej sekvencie.

V proteomickej analýze sa používa niekoľko komerčne dostupných trypsínov s označením „proteomics grade“. Takýto typ trypsínu má často metylované aminokyseliny lyzínu a teda je chránený voči autolýze. Najväčšie množstvo komerčne dostupných trypsínov vhodných ku MS analýze je prasacieho a hovädzieho pôvodu. Trypsín hovädzieho pôvodu má vo všeobecnosti vyššiu tendenciu vytvárať dlhšie peptidy s preskočenými štiepnymi miestami. Na druhej strane, prasací trypsin vytvára viac semi-tryptických peptidov. Dôvodom sú odlišnosti v primárnej štruktúre trypsínov rôzneho pôvodu, ktoré môžu ovplyvniť substrátovú afinitu (Walmsley *et al.*, 2013).

Ku zvýšeniu presnosti a citlivosti kvantifikácie je možno použiť aj kombináciu trypsínu s inou proteázou. Podľa Glatter *et al.*, 2012 tandemové štiepenie pomocou Lys-C následované štiepením trypsinom zvyšuje počet správne štiepených peptidov lyzáta kvasiniek až o 9 % a znižuje počet nedostatočne štiepených peptidov o 21 %, v porovnaní so štiepením trypsinom samostatne.

### 2.3.3 Ostatné proteolytické enzýmy

Chymotrypsín je proteáza, ktorá špecificky štiepi peptidovú väzbu za aromatickými aminokyselinami tyrozin, tryptofán a fenylalanín (Vajda a Szabó, 1976). Jej substrátové väzbové miesto zvané aj S1 je tvorené aminokyselinovými zvyškami v miestach 189-195, 214-220 a 225-228. Aktívne miesto je tvorené katalytickou triádou His-57, Asp-102 a Ser-195 (Ma *et al.*, 2005). Od trypsínu sa chymotrypsín líši iba veľmi málo. Najdôležitejším rozdielom je negatívne nabitá aminokyselina Asp-189 v trypsiné, ktorá je v chymotrypsíne nahradená polárnou aminokyselinou Ser-189 (Steitz *et al.*, 1969). S1 väzbové miesto určuje špecificitu iba v zmysle hydrolýzy esterov. Špecifická hydrolýza amidov vyžaduje okrem S1 miesta aj interakciu L1 a L2 slučiek, ktorých zloženie sa medzi trypsinom a chymotrypsínom líši (Hedstrom *et al.*, 1992). V kvantitatívnych štúdiách sa chymotrypsín využíva častejšie v kombinácii s inými proteázami s účelom zvýšenia pokrytia proteínovej sekvencie a spoľahlivosti identifikácie proteínov v komplexných vzorkách (Aye *et al.*, 2010; Stachowicz *et al.*, 2017). Chymotrypsín bol použitý aj v štúdiu, kde bola ku značeniu <sup>18</sup>O atómami využitá ich väzba na C-koniec peptidov počas enzymatického štiepenia. Jeho nevýhodou je, že produkuje peptidy, ktoré sú prostredníctvom CID hmotnostnej spektrometrie ťažko sekvenovateľné (Miyagi a Rao, 2007) a preto sa v proteomických analýzach samostatne nepoužíva.

Lyzyl endopeptidáza (Lys-C) bola prvý krát objavená v baktérii *Achromobacter lyticus*. Jej špecificita spočíva v hydrolýze peptidovej väzby na C-konci aminokyseliny lyzín, podobne ako štiepi aj trypsín. Tento enzým však štiepi aj väzbu medzi lyzínom a prolínom, ale neštiepi peptidovú väzbu za aminokyselinou arginín (Masaki *et al.*, 1981). Lys-C sa v kvantitatívnej proteomike využíva najmä v metódach enzymatickej inkorporácie dvoch atómov  $^{18}\text{O}$  kyslíka na C-koniec peptidov (Miyagi a Rao, 2007). Katalytická aktivita Lys-C je v prostredí s pH 5 až 17-krát vyššia ako katalytická aktivita trypsínu v prostredí s hodnotou pH 6 (Hajkova *et al.*, 2006). Preto je použitie Lys-C pri  $^{18}\text{O}$  enzymatickom značení výhodnejšie. Štiepením však vytvára peptidy, ktoré sú v porovnaní s trypsínom dlhšie a preto je nutné pre analýzu použiť vysoko-rozlišovaciu hmotnostnú spektrometriu (Miyagi a Rao, 2007). Použitie Lys-C proteázy je výhodné aj v metóde 5-násobného stabilného izotopového značenia dimetyláciou. Konvenčná metóda dimetylácie využívala maximálne tri odlišné značky a nebola príliš výhodná ku analýze viacerých vzoriek naraz. Proteáza Lys-C však umožnila použitie až 5 odlišných značiek, ktoré sa medzi sebou líšia v hmotnosti 2 Da. Lys-C vytvára minimálne dve väzbové miesta pre značku. Preto je rozdiel v odlišne derivovaných peptidoch minimálne 4 Da (Wu *et al.*, 2014) a je dostačujúci na identifikáciu izotopomérov v MS spektre (Bantscheff *et al.*, 2007). Táto proteáza našla využitie aj v metóde SILAC. Pri  $^{13}\text{C}_6$ -lyzín značených proteínov myších tkanív je použitie Lys-C na kvantifikáciu výhodnejšie ako trypsínu (Ma *et al.*, 2013).

Glutamyl endopeptidáza (Glu-C), inak nazývaná aj V8, je proteáza izolovaná z bakérie *Staphylococcus aureus*, kmeň V8. Glu-C špecificky štiepi peptidové väzby na C-konci aminokyseliny kyseliny glutámovej a asparágovej. Jej špecificita závisí na pH prostredia štiepenia. V roztoku s hodnotou pH 4 štiepi špecificky iba väzby na C-konci kyseliny glutámovej. Ak je pH roztoku 8, štiepi navyše aj peptidové väzby na C-konci kyseliny asparágovej (Drapeau *et al.*, 1972). Ani jedna z týchto aminokyselín nemôže byť nijakým spôsobom glykozylovaná. Táto skutočnosť robí z Glu-C vhodnú proteázu použiteľnú v metódach kvantifikácie glykozylovaných proteínov. Táto proteáza tvorí kvôli nízkemu výskytu kyseliny glutámovej dlhšie peptidy ako trypsín (Priego-Capote *et al.*, 2011). Pri analýze je preto nutné použiť hmotnostný spektrometer s vysokým rozlíšením (Mann a Kelleher, 2008). Endopeptidáza Glu-C je podobne ako chymotrypsín využívaná aj v kvantifikácii proteínov s použitím enzymaticky naviazaného atómu  $^{18}\text{O}$  do štruktúry peptidu (Reynolds *et al.*, 2002). Podobne ako chymotrypsín, aj Glu-C tvorí

ťažko sekvenovateľné peptidy a preto je vhodnejšie v tejto metóde použiť proteázu Lys-C (Miyagi a Rao, 2007).

Peptidyl-lys metaloendopeptidáza (Lys-N) je proteáza prirodzene sa vyskytujúca v hube *Grifola frondosa*. Táto proteáza znesie teplotu až 70°C a je voči denaturujúcim látkam odolnejšia ako trypsín. Špecificky štiepi peptidovú väzbu na N-konci aminokyseliny lyzín. Optimálne pH, pri ktorom dosahuje najvyššiu aktivitu má hodnotu 9 (Tsiatsiani a Heck, 2015). Používa sa v kvantitatívnej metóde SILAC myších tkanív, v ktorej je použitie proteázy Lys-N rovnako ako Lys-C výhodnejšie ako použitie trypsínu (Scholten *et al.*, 2011). Použitím endopeptidázy Lys-N v metódach enzymatického značenia <sup>18</sup>O atómami kyslíka nie je možné dosiahnuť spoľahlivej kvantifikácie (Ong a Mann, 2005). Dôvodom je, že táto proteáza sprostredkuje väzbu iba jedného atómu <sup>18</sup>O a tak medzi dvoma peptidmi vytvára rozdiel iba 2 Da (Rao *et al.*, 2005).



## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

- 2-jodoacetamid (IAA),  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, USA)
- acetonitril (ACN), MS grade (Merck, Nemecko)
- C18 disky pre extrakciu na reverznej fáze (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- dithiotreitol (DTT) (Serva Electrophoresis, Nemecko)
- hovädzí sérový albumín (BSA), electrophoresis grade ( $\geq 99\%$ ) (Sigma-Aldrich, USA)
- hydroxid amónny, 25% w/w v H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- isopropanol (iPrOH), MS grade (Merck, Nemecko)
- kyanoborohydrid sodný,  $\geq 95\%$  (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyškoricová (CHCA) (Bruker Daltonics, Nemecko)
- kyselina mravčia,  $\geq 95\%$  (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- methanol (MeOH), MS grade (Merck, Nemecko)
- močovina (Sigma-Aldrich Chemie, Nemecko)
- roztok formaldehydu, 37% w/w v H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, Holandsko)
- roztok deuterovaného formaldehydu, 20% w/w v H<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA)
- triethylamín bikarbonátový pufor (TEAB) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- trypsín, modifikovaný rafinosou 200  $\mu$ M – pripravil prof. Mgr. Marek Šebela, Dr. (Šebela *et al.*, 2006)
- trypsín, sequencing grade, špecificita 5000 u/mg (Promega, Madison, WI, USA)
- voda, LC-MS grade (Merck, Nemecko)

#### 3.1.2 Prístroje

- centrifúga Centrifuge 5702 (Eppendorf, Nemecko)
- termomixér Comfort (Eppendorf, Nemecko)
- centrifúga MiniSpin (Eppendorf, Nemecko)
- vírivá miešačka Vortex-V1 Plus (Biosan, Litva)
- vákuový koncentrátor Concentrator Plus (Eppendorf, Nemecko)

- ultrazvuková vaňa Ultrasonich Cleaner (VWR International, Radnor, PA, USA)
- analytické váhy Radwag X (Radwag, Polsko)
- hmotnostný spektrometer Microflex MALDI-TOF LRF20 (Bruker Daltonics, Nemecko)
- hmotnostný spektrometer UHR-Q-TOF maXis vybavený zdrojom nano-ESI (Bruker Daltonics, Bremen, Nemecko)
- kvapalinový chromatograf Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Ďalej boli využité pipety s rozsahom 2,5, 10, 100 a 1000  $\mu\text{l}$  (Eppendorf, Nemecko), plastové špičky (Eppendorf, Nemecko), plastové mikroskúmavky z objemom 500  $\mu\text{l}$ , 1,5 a 2 ml (Eppendorf, Nemecko), pH pásiky s rozsahom pH 0-14 (Sigma-Aldrich, USA), lyžičky, špachtle, nožnice, nerezové ihly s tupým koncom a parafilm.

## **3.2 Metódy**

### **3.2.1 Štiepenie BSA v roztoku pomocou trypsínu**

#### **3.2.1.1 Príprava pracovných roztokov proteínu**

Ako prvé boli pripravené zásobné roztoky hovädzieho sérového albumínu. Proteín bol odvážený v množstve 10 mg a rozpustený v 1 ml „MS grade“ vody (BSA10). Rovnako bol pripravený aj zásobný roztok s koncentráciou 32 mg. $\text{ml}^{-1}$  rozpustením 32 mg proteínu v 1 ml „MS grade“ vody (BSA32). Takto pripravené roztoky boli uskladnené v chladničke. Pred prípravou pracovných roztokov boli z chladničky vytiahnuté a po odobraní požadovaného množstva vrátené späť.

V tabuľke (Tab. 1) sú uvedené pracovné roztoky, ktoré boli pripravené zmiešaním určitého množstva zásobného roztoku a 100  $\text{mmol.l}^{-1}$  TEAB pufru. Roztok pufru bol pripravený 10-násobným riedením 1  $\text{mol.l}^{-1}$  TEAB pufru „MS grade“ vodou.

Odobrané množstvo z pracovných roztokov BSA sa líšilo v závislosti od výsledného objemu, v ktorom prebiehalo štiepenie a od požadovaného výsledného množstva proteínu v štiepiacom roztoku. Príprava vzoriek BSA v rôznych variantoch pracovného postupu je uvedená v tabuľke (Tab. 2).

Tab. 1 Experiment bol v rámci optimalizácie pracovných postupov vykonaný v niekoľkých variantoch. V každom variante pracovného postupu boli použité pracovné roztoky s rôznou koncentráciou BSA. Objem pridaného pracovného roztoku BSA do skúmavky súvisí s výsledným objemom roztoku, v ktorom prebiehalo štiepenie, teda 5  $\mu\text{l}$  na štiepenie v 200  $\mu\text{l}$ , 2,5  $\mu\text{l}$  na štiepenie v 100  $\mu\text{l}$  a 1,25  $\mu\text{l}$  na štiepenie v 50  $\mu\text{l}$ .

Variant pracovného postupu	Použitý pracovný roztok BSA	Počet 1,5-ml skúmaviek	Objem pridaného pracovného roztoku BSA do každej skúmavky	Množstvo proteínu BSA v jednej skúmavke
1.	0,4 mg.ml <sup>-1</sup>	6	5 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{g}$
2.	0,4 mg.ml <sup>-1</sup>	3	5 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{g}$
	0,8 mg.ml <sup>-1</sup>	3	2,5 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{g}$
	1,6 mg.ml <sup>-1</sup>	3	1,25 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{g}$
3.	0,8 mg.ml <sup>-1</sup>	5	1,25 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{g}$
	2 mg.ml <sup>-1</sup>	5	1,25 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{g}$
	4 mg.ml <sup>-1</sup>	5	1,25 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{g}$
	BSA32*	1	2,5 $\mu\text{l}$	80 $\mu\text{g}$
4.	4 mg.ml <sup>-1</sup>	45	1,25 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{g}$
	BSA32*	1	2,5 $\mu\text{l}$	80 $\mu\text{g}$
5.	0,8 mg.ml <sup>-1</sup>	6	1,25 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{g}$
	2 mg.ml <sup>-1</sup>	6	1,25 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{g}$
	4 mg.ml <sup>-1</sup>	36	1,25 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{g}$
	8 mg.ml <sup>-1</sup>	6	1,25 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{g}$
	20 mg.ml <sup>-1</sup>	6	1,25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{g}$

\* V tomto prípade bol pridaný zásobný roztok BSA s koncentráciou 32 mg.ml<sup>-1</sup> (BSA32) bez nutnosti riedenia.

Tab. 2 Príprava pracovných roztokov BSA

Použitý zásobný roztok	Pridaný objem zásobného roztoku	Pridaný objem TEAB pufra – koncentrácia 100 mmol.l <sup>-1</sup>	Koncentrácia výsledného pracovného roztoku BSA
BSA10	4 $\mu\text{l}$	96 $\mu\text{l}$	0,4 mg.ml <sup>-1</sup>
	8 $\mu\text{l}$	92 $\mu\text{l}$	0,8 mg.ml <sup>-1</sup>
	16 $\mu\text{l}$	84 $\mu\text{l}$	1,6 mg.ml <sup>-1</sup>
	20 $\mu\text{l}$	80 $\mu\text{l}$	2 mg.ml <sup>-1</sup>
	40 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$	4 mg.ml <sup>-1</sup>
	80 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	8 mg.ml <sup>-1</sup>
BSA32	62,5 $\mu\text{l}$	37,5 $\mu\text{l}$	20 mg.ml <sup>-1</sup>

### 3.2.1.2 Príprava proteínu na štiepenie

Do skúmaviek s proteínom bola najskôr pridaná  $8 \text{ mol.l}^{-1}$  močovina a zmes bola premiešaná pipetou. Následne bolo ku zmesi pridané  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  redukčné činidlo DTT pripravené v  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  TEAB pufri. Vzorka bola umiestnená do termomixéra, v ktorom bola inkubovaná po dobu 45 minút pri teplote  $56^\circ\text{C}$  a 300 rpm. Bolo pripravené  $330 \text{ mmol.l}^{-1}$  alkylačné činidlo rozpustením kryštalického IAA v  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  TEAB pufri. Po pridaní alkylačného činidla do zmesi bola skúmavka umiestnená na miesto bez prístupu svetla a ponechaná 30 minút pri laboratórnej teplote  $23^\circ\text{C}$ . Následne bolo do zmesi pridané opäť redukčné činidlo DTT s koncentráciou  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  a zmes bola inkubovaná v termomixéri po dobu 30 minút pri teplote  $56^\circ\text{C}$  a 300 rpm. Na elimináciu denaturujúcich účinkov  $8 \text{ mol.l}^{-1}$  močoviny bola zmes zriedená prídavkom  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  TEAB pufra, ktorý bol pripravený 100-násobným riedením  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  TEAB pufra „MS grade“ vodou. V závislosti od požadovaného výsledného objemu roztoku proteínu boli objemy pridaných látok tak ako je uvedené v tabuľke nižšie (Tab. 3).

### 3.2.1.3 Prídavok enzýmu trypsínu

Do skúmaviek s pripraveným proteínom bol pridaný enzým trypsín. Enzým bol pred použitím rozmrazený a po odobraní požadovaného množstva na prípravu pracovných roztokov bol vrátený späť do mrazničky. Pracovné roztoky trypsínu boli pripravené zmiešaním určitého množstva zásobného trypsínu a  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  TEAB pufra. Ku každému roztoku proteínu boli pridané  $2 \mu\text{l}$  pripraveného pracovného roztoku trypsínu. Koncentrácie pracovných roztokov trypsínu sa líšili v závislosti na požadovanom pomere koncentrácií trypsínu ku proteínu po ich prídavku.

Tab. 3 Objemy pridaných látok, súvisiace s požadovaným výsledným objemom roztoku proteínu.

Krok	Látka	Výsledný objem roztoku BSA		
		200 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
1.	Pracovný roztok BSA	5 $\mu\text{l}$	2,5 $\mu\text{l}$	1,25 $\mu\text{l}$
2.	Močovina $8 \text{ mol.l}^{-1}$	15 $\mu\text{l}$	7,5 $\mu\text{l}$	3,75 $\mu\text{l}$
3.	DTT $50 \text{ mmol.l}^{-1}$	4 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
4.	IAA $330 \text{ mmol.l}^{-1}$	4 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
5.	DTT $50 \text{ mmol.l}^{-1}$	8 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
6.	TEAB pufor $10 \text{ mmol.l}^{-1}$	164 $\mu\text{l}$	82 $\mu\text{l}$	41 $\mu\text{l}$

### Varianty 1.-3.

V týchto analýzach bol použitý zásobný rafinosovaný trypsín s koncentráciou 200 mmol.l<sup>-1</sup> (Šebela *et al.*, 2006). Pracovné roztoky trypsínu boli pripravené tak aby ich prídavok 2 µl obsahoval 20-krát menšie množstvo trypsínu ako bolo množstvo pripraveného proteínu prítomného v roztoku.

### Variant 4.

V tejto analýze bol použitý zásobný rafinosovaný trypsín s koncentráciou 200 mmol.l<sup>-1</sup> (Šebela *et al.*, 2006). Najskôr boli pripravené pracovné roztoky trypsínu s rôznou koncentráciou. 45 skúmaviek s obsahom 5 µg BSA bolo rozdelených na 5 skupín po 9 skúmaviek. Do každej skúmavky v skupine boli pridané 2 µl pracovného roztoku trypsínu s rovnakou koncentráciou. Koncentrácie pracovných roztokov sa však medzi skupinami líšili (Tab. 4). Do roztoku obsahujúceho 80 µg BSA boli pridané 2 µl trypsínu s koncentráciou 2 mg.ml<sup>-1</sup>. Po prídavku trypsínu bol výsledný pomer koncentrácií trypsínu ku proteínu v tomto roztoku 1/20.

### Variant 5.

V tejto analýze bol použitý špecifický trypsín od firmy Promega so špecificitou 5000 jednotiek na miligram. Zásobný roztok bol pripravený rozpustením 20 µg lyofilizovaného trypsínu v 100 µl resuspenzného pufru, ktorý bol tvorený 50 mmol.l<sup>-1</sup> octovej kyseliny dodávanej spoločne s trypsínom. Pracovné roztoky boli pripravené riedením zásobného roztoku 10 mmol.l<sup>-1</sup> TEAB pufrom. Zo zásobného roztoku boli pripravené pracovné roztoky trypsínu s takou koncentráciou aby ich prídavok 2 µl do pripravených roztokov proteínu obsahoval 60-krát menšie množstvo trypsínu ako bolo množstvo proteínu prítomného v roztokoch.

Tab. 4 Koncentrácie pracovných roztokov trypsínu a výsledný pomer koncentrácií trypsínu ku proteínu po prídavku 2 µl do roztoku.

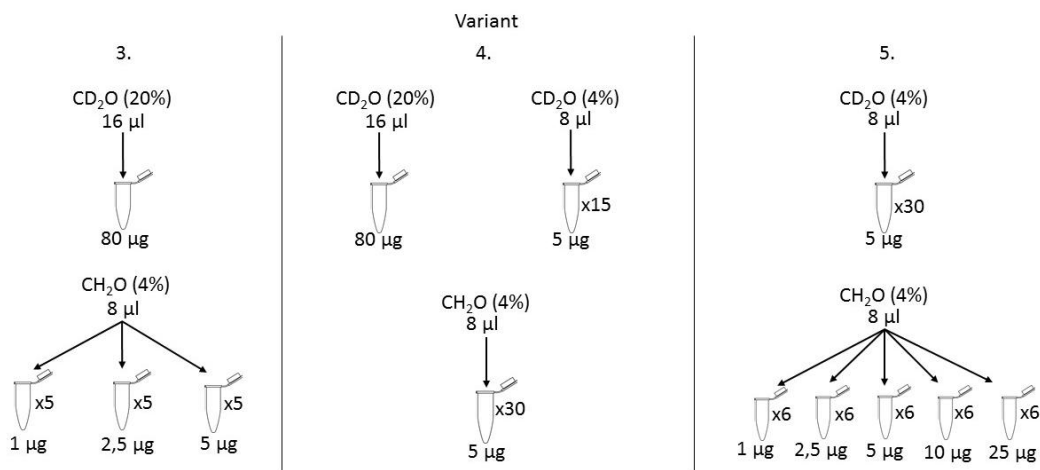
Skupina	Koncentrácia pracovného roztoku trypsínu	Výsledný pomer koncentrácií trypsín/proteín po prídavku 2 µl
1.	0,125 mg.ml <sup>-1</sup>	1/20
2.	0,0625 mg.ml <sup>-1</sup>	1/40
3.	0,0416 mg.ml <sup>-1</sup>	1/60
4.	0,0313 mg.ml <sup>-1</sup>	1/80
5.	0,025 mg.ml <sup>-1</sup>	1/100

Po prídavku trypsínu boli skúmavky umiestnené do termomixéra. Inkubácia prebiehala pri 37°C cez noc. Na ďalší deň bola za účelom zastavenia štiepenia do skúmaviek pridaná 98% kyselina mravčia. Do 200  $\mu\text{l}$  roztoku štiepenia bolo pridaných 10,4  $\mu\text{l}$ , do 100  $\mu\text{l}$  roztoku 5,2  $\mu\text{l}$  a do 50  $\mu\text{l}$  roztoku 2,6  $\mu\text{l}$  kyseliny mravčej. Po prídavku bola jej koncentrácia v roztoku približne 5 %.

### 3.2.2 Značenie proteolytických peptidov reduktívnou dimetyláciou

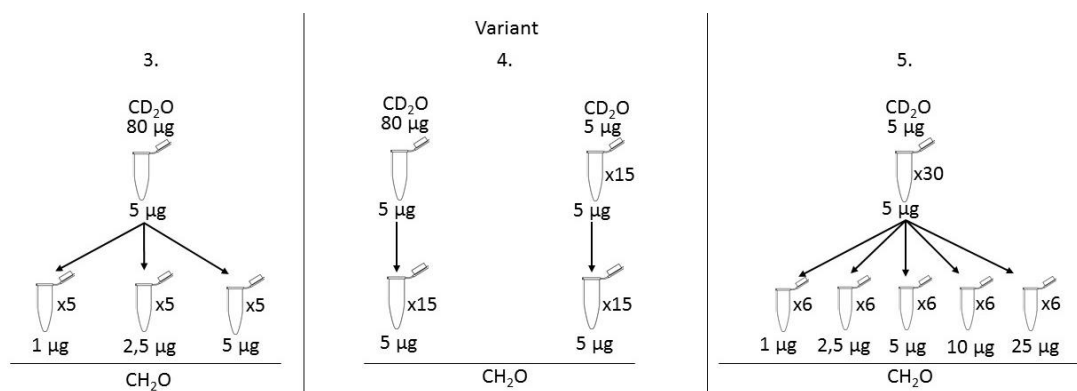
Pred značením boli peptidy najskôr zahustené odparením roztoku na vákuovom koncentrátore pri 45°C po dobu 30 minút. Po odparení boli peptidy rozpustené v 100  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol.l}^{-1}$  TEAB pufri. Po zmeraní pH pomocou pH pásika boli do roztoku podľa potreby pridané 4  $\mu\text{l}$  1  $\text{mol.l}^{-1}$  TEAB pufra aby pH roztoku dosahovala hodnoty v rozmedzí 5-8,5 jednotky. Skúmavky boli vložené do ultrazvuku na 2 minúty a obsah bol premiešaný pipetou.

Následne boli pripravené 4% roztoky formaldehydu a deuterovaného formaldehydu. Zásobný roztok 37% (w/w) formaldehydu bol riedený 9,25-krát a 20% (w/w) deuterovaného formaldehydu 5-krát, oba „MS grade“ vodou. Do skúmaviek boli následne pridané v množstvách zobrazených na obrázku nižšie (Obr. 3).



Obr. 3 Prídavok formaldehydu ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) a deuterovaného formaldehydu ( $\text{CD}_2\text{O}$ ) do skúmaviek obsahujúcich rôzne množstvo peptidov. Vo variante 3. pracovného postupu bolo do skúmavky obsahujúcej 80  $\mu\text{g}$  štiepeného proteínu pridaných 16  $\mu\text{l}$  20%  $\text{CD}_2\text{O}$ . Vo variante 4. pracovného postupu bolo do skúmavky obsahujúcej 80  $\mu\text{g}$  štiepeného proteínu pridaných 16  $\mu\text{l}$  20%  $\text{CD}_2\text{O}$  a do 15 vzoriek obsahujúcich po 5  $\mu\text{g}$  štiepeného proteínu 8  $\mu\text{l}$  4%  $\text{CD}_2\text{O}$ . Vo variante 5. pracovného postupu bolo do 30 vzoriek obsahujúcich po 5  $\mu\text{g}$  štiepeného proteínu pridaných 8  $\mu\text{l}$  4%  $\text{CD}_2\text{O}$ . Do všetkých ostatných skúmaviek obsahujúcich rôzne množstvo peptidov bolo pridaných vždy 8  $\mu\text{l}$  4%  $\text{CH}_2\text{O}$ .

Skúmavky s roztokmi boli krátko premiešané na vírivej miešačke a stočené na centrifuge po dobu 10 sekúnd. Následne bolo do každej skúmavky pridaných 8  $\mu\text{l}$  0,6 mol.l<sup>-1</sup> NaBH<sub>3</sub>CN a vzorky boli opäť premiešané a stočené na centrifuge. Vzorky boli vložené do termomixéra a inkubované po dobu 45 minút pri 20°C a 700 rpm. Na dosiahnutie kvantitatívneho značenia bol cyklus prídavku roztoku formaldehydu, resp. deuterovaného formaldehydu a NaBH<sub>3</sub>CN zopakovaný. Po druhej inkubácii boli vzorky prenesené na ľad a umiestnené do digestora. Na zastavenie značenia bolo do vzoriek pridaných 16  $\mu\text{l}$  2% roztoku hydroxidu amónneho, ktorý bol pripravený 12,5-násobným riedením 25% zásobného roztoku „MS grade“ vodou. Následne boli vzorky krátko premiešané na vírivej miešačke a stočené na centrifuge po dobu 10 sekúnd. Do skúmaviek s obsahom štiepeného proteínu 80  $\mu\text{g}$  bolo pridaných 80  $\mu\text{l}$  5% kyseliny mravčej. Do ostatných skúmaviek bolo pridaných 16  $\mu\text{l}$  5% kyseliny mravčej. Na záver bol objem obsahujúci 5  $\mu\text{g}$  peptidov značených deuterovaným formaldehydom prenesený do skúmaviek obsahujúcich formaldehydom značené peptidy ako je zobrazené na nasledujúcom obrázku (Obr. 4). Po zmiešaní rôzne značených peptidov boli skúmavky umiestnené do vákuového koncentrátora a zakoncentrované odparením roztoku pri 45°C po dobu 1 až 2 hodín.



Obr. 4 Rozdelenie obsahu skúmaviek obsahujúcich peptidy značené deuterovaným formaldehydom (CD<sub>2</sub>O) do skúmaviek obsahujúcich peptidy značené formaldehydom (CH<sub>2</sub>O). Vo variante 3. bola vzorka obsahujúca 80  $\mu\text{g}$  CD<sub>2</sub>O značených peptidov po 5  $\mu\text{g}$  rozdelená do 15 skúmaviek obsahujúcich CH<sub>2</sub>O značené peptidy. Vo variante 4. bola vzorka obsahujúca 80  $\mu\text{g}$  CD<sub>2</sub>O značených peptidov po 5  $\mu\text{g}$  rozdelená do 15 skúmaviek obsahujúcich CH<sub>2</sub>O značené peptidy a zároveň bol celý obsah 15 skúmaviek obsahujúcich po 5  $\mu\text{g}$  CD<sub>2</sub>O značených peptidov prenesený jednotlivito do 15 skúmaviek obsahujúcich CH<sub>2</sub>O značené peptidy. Vo variante 5. bol celý obsah 30 skúmaviek obsahujúcich po 5  $\mu\text{g}$  CD<sub>2</sub>O značených peptidov prenesený jednotlivito do 30 skúmaviek obsahujúcich CH<sub>2</sub>O značené peptidy.

### 3.2.3 Odsolenie peptidov pomocou C18 diskov metódou StageTip

V prípade, že nedochádzalo ku značeniu peptidov po štiepení, vzorky nebolo nutné odpariť a proces odsolenia nasledoval hneď po zastavení štiepenia. Vzorky, ktoré boli po značení odparené boli najskôr rozpustené v 100  $\mu\text{l}$  5% FA. Odsolenie vzoriek prebiehalo metódou StageTip (Rappsilber *et al.*, 2007).

Z 200- $\mu\text{l}$  žltých špičiek bola najskôr nožnicami odstránená vrchná časť s dĺžkou približne 1 cm. Následne boli pomocou nerezovej ihly s tupým koncom odobrané dva C18 extrakčné disky a vložené do týchto špičiek. Špičky boli umiestnené do vrchnej časti 2-ml skúmaviek s deravým viečkom. Za účelom aktivácie bolo do špičiek s vloženými C18 diskami pridaných 100  $\mu\text{l}$  isopropanolu. Na prestúpenie kvapaliny skrz C18 disky bola využitá centrifugácia pri 2000 g po dobu 5 minút. Ekvilibrácia prebiehala dvakrát prídavkom 50  $\mu\text{l}$  5% kyseliny mravčej a opätovnou centrifugáciou pri 2000 g po dobu 3 minút. Na takto pripravenú C18 kolónu bola nanosená najskôr polovica objemu vzorky. Po centrifugácii bola nanosená aj druhá polovica objemu vzorky. Centrifugácia prebiehala po dobu 5 minút pri 1000 g. Naviazané peptidy boli dva krát premyté 50  $\mu\text{l}$  5% kyseliny mravčej centrifugáciou pri 1500 g po dobu 3 minút. Následne boli špičky s naviazanými peptidmi prenesené do čistých 1,5-ml skúmaviek s otvorom vo viečku. Elúcia peptidov prebiehala dvakrát prídavkom 50  $\mu\text{l}$  50% methanolu s 2,5% kyselinou mravčou a centrifugáciou pri 1000 g po dobu 5 minút. Celý objem vzorky bol prenesený do vialky a odparený na vákuovom koncentrátore pri 45°C po dobu 30 minút.

### 3.2.4 LC-ESI-MS analýza

Pred analýzou boli odparené vzorky najskôr rozpustené v 10  $\mu\text{l}$  0,1% kyseliny trifluoroctovej. Vialky boli za účelom dostatočného rozpustenia peptidov umiestnené na 2 minúty do ultrazvukovej vane a po vytiahnutí boli vzorky viackrát premiešané pipetou. 8  $\mu\text{l}$  vzorky bolo prenesených do 0,5-ml plastových skúmaviek na MALDI analýzu. Zostávajúce 2  $\mu\text{l}$  vo vialke boli 100-krát zriedené prídavkom 198  $\mu\text{l}$  5% kyseliny mravčej. Pripravené vzorky boli analyzované s použitím LC-ESI-MS/MS. Na chromatografickú kolónu boli nanosené 2  $\mu\text{l}$  vzorky. Eluované peptidy boli ionizované kapilárou pod napätím 1,6 kV. Na sušenie vzniknutých kvapiek bolo použité prúdenie plynného dusíka s prietokom 6  $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  s teplotou 150°C. Analýza vzniknutých iónov prebiehala v pozitívnom móde v rozsahu  $m/z$  250-1600. Za účelom identifikácie peptidov boli získané spektrá porovnané s teoreticky generovanými pomocou software ProteinScape



(Bruker Daltonics, Bremen, Nemecko), ktorý využíva vyhľadávací nástroj Mascot (Matrix Science, Londýn, Anglicko).

### **3.2.5 MALDI-TOF MS analýza**

Najskôr bola pripravená matrica kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyškoricevej (CHCA) Kryštalická CHCA bola rozpustená v 60% ACN a 2,5% TFA tak aby jej výsledná koncentrácia bola 4 mg.ml<sup>-1</sup>. Do 0,5-ml skúmaviek obsahujúcich 8  $\mu$ l vzorky bolo pridaných 8  $\mu$ l pripravenej CHCA matrice. Vzorky zmiešané s matricou boli po 0,8  $\mu$ l nanášané na MSP Anchor Chip 600/96 MALDI doštičku. Následne boli ponechané voľnej kryštalizácii pri laboratórnej teplote a podrobené MALDI-TOF analýze. Analýza prebiehala použitím Microflex LRF20 MALDI-TOF hmotnostného spektrometra obsahujúceho iónový zdroj microScout s dusíkovým laserom 337 nm. Hmotnostné spektrá každej analyzovanej vzorky boli v závislosti na experimente získané súčtom 50 alebo 25 MS spektier zo štyroch bodov z jedného miesta na doštičke (spolu 100 alebo 200 spektier). Namerané spektrá boli vyhodnotené programom mMass (Strohalm *et al.*, 2008).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

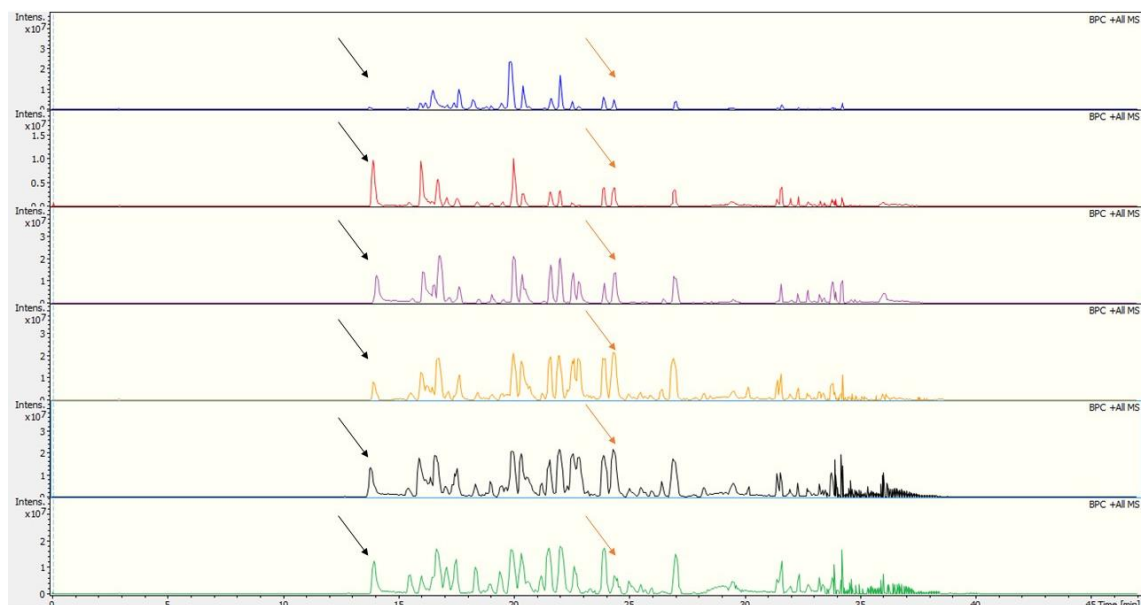
### 4.1 Optimalizácia postupu prípravy mikrogramových množstiev proteínu na MS analýzu s cieľom reprodukovateľnosti

#### 4.1.1 Štiepenie BSA v roztoku s rôznym objemom

Štiepenie mikrogramových množstiev proteínu môže prebiehať v rôznych objemoch. Avšak, postup štiepenia musí byť dostatočne prispôsobený tak aby bolo štiepenie v každom prípade úspešné a reprodukovateľné, najmä ak sa jedná o kvantitatívnu analýzu. V tejto analýze bol použitý protokol, ktorého výsledný objem zmesi štiepenia dosiahol 200  $\mu$ l (Variant 1, Tab. 2). Cieľom bolo stanoviť úspešnosť a reprodukovateľnosť štiepenia v tomto objeme. Štiepenie môžeme považovať za reprodukovateľné vtedy keď po niekoľkonásobnom opakovaní rovnakého postupu dosahuje počet identifikovaných peptidov podobných hodnôt. Štiepenie 5  $\mu$ g proteínu bolo vykonané v 6 opakovaníach. Počet identifikovaných peptidov po analýze je uvedený v nasledujúcej tabuľke (Tab. 5). Výsledkom je vysoká variabilita v počte identifikovaných peptidov medzi vzorkami, ktorá je pravdepodobne spôsobená veľkým objemom reakčnej zmesi. Dôkazom sú aj iónové chromatogramy získané z ESI-MS analýzy (Obr. 5). Porovnaním chromatogramov jednotlivých vzoriek je možno pozorovať variabilitu detekovaných iónov a ich intenzít medzi vzorkami, ktorá predstavuje variabilitu v štiepení. Keďže nedochádza ku žiadnemu fyzikálnemu vplyvu, pomocou ktorého by bol roztok premiešaný, molekuly proteínu s enzýmom voči sebe iba pomaly difundujú. Pravdepodobne je koncentrácia proteínu v tomto objeme nízka natoľko, že za daných podmienok nie je dostatočne prístupný enzýmu. Takéto štiepenie je z hľadiska kvantifikácie neprijateľné a musí byť optimalizované. Zlepšenie štiepenia by mohlo byť

Tab. 5 Počet identifikovaných peptidov v 6 vzorkách s objemom štiepenia 200  $\mu$ l

Vzorka	Počet identifikovaných peptidov
1	17
2	29
3	37
4	44
5	34
6	58
Priemerný počet identifikovaných peptidov	36,5



Obr. 5 Iónové chromatogramy získané z ESI-MS/MS analýzy vzoriek. Štiepenie 5  $\mu\text{g}$  proteínu prebiehalo za rovnakých podmienok v 200  $\mu\text{l}$  roztoku a 6 opakovaníach podľa variantu 1. pracovného postupu. Čierna šípka označuje peptid LKECCDKPLLEK ( $m/z$  766,9036), oranžová šípka označuje ión SLHTLFGDELCK ( $m/z$  710,3591). Tieto reprezentatívne ióny znázorňujú vysokú variabilitu v štiepení medzi vzorkami.

dosiahnuté modifikáciou pracovného postupu ako je napríklad použitie ultrazvuku (Santos *et al.*, 2007) alebo aplikácia mikrovln, ktoré by mohli zároveň skrátiť dobu štiepenia až na menej ako hodinu (Pramanik *et al.*, 2002). Pomôcť by mohlo aj miešanie počas inkubácie.

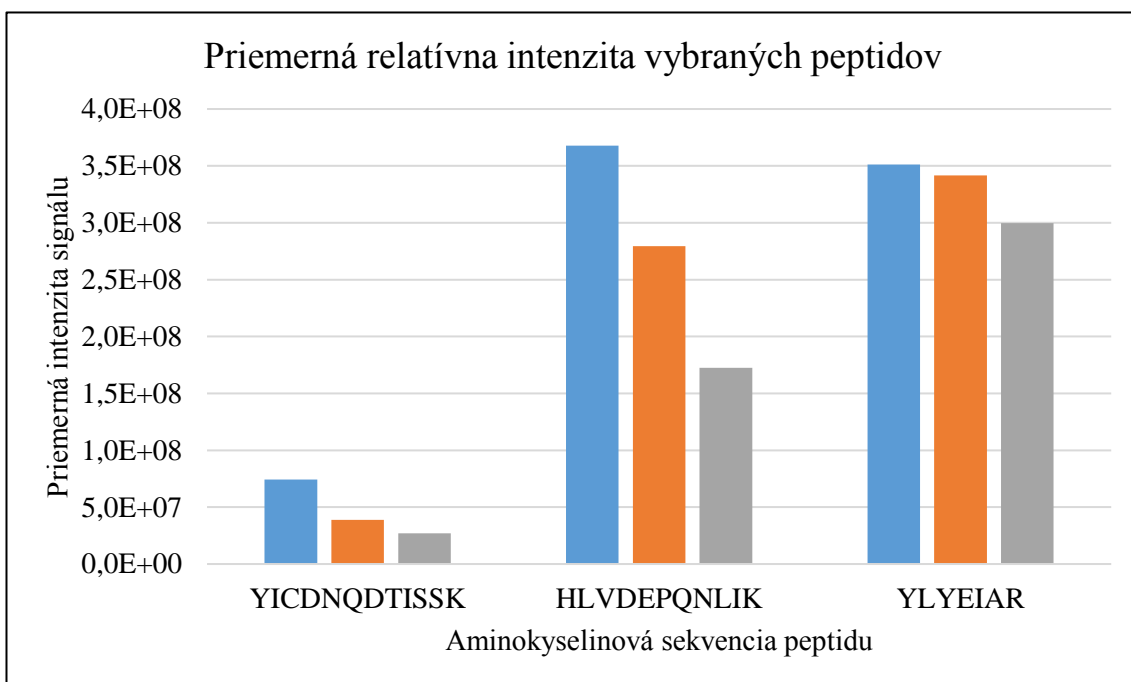
Ná základe výsledkov poskytnutých štiepením proteínu v 200  $\mu\text{l}$  je zrejmé, že na dosiahnutie reprodukovateľnosti postupu musí byť protokol upravený. Následujúca analýza bola vykonaná ako variant 2 pracovného postupu. Boli vytvorené tri reakčné zmesi s rôznym výsledným objemom (200  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ ) a obsahom proteínu 2  $\mu\text{g}$  s trojnásobným opakovaním. Po analýze ESI-MS boli hmotnostné spektrá porovnané s teoreticky generovanými. Zmenšený objem roztoku štiepenia mal za následok zvýšený počet identifikovaných peptidov (Tab. 6).

Tab. 6 Počet identifikovaných tryptických a semi-tryptických peptidov BSA v troch rôznych objemoch štiepenia

Objem štiepenia	Vzorka	Počet tryptických peptidov	Počet semi-tryptických peptidov	Počet peptidov spolu
50 µl	1	61	46	107
	2	62	52	114
	3	65	43	108
	Priemerný počet	62,67	47,00	109,67
100 µl	4	62	37	99
	5	58	38	96
	6	59	43	102
	Priemerný počet	59,67	39,33	99,00
200 µl	7	66	33	99
	8	63	32	95
	9	62	28	90
	Priemerný počet	63,67	31,00	94,67

Nárast počtu špecificky štiepených (tryptických) peptidov je nepatrný. Na druhej strane, zvýšenie počtu peptidov, ktoré boli štiepené nešpecificky je nežiadúce. Chymotryptická aktivita komerčných trypsínových preparátov je bežná. Trypsín a chymotrypsín sú proteázy izolované z pankreasu živočíchov. V tomto orgáne sú prítomné oba zymogény týchto proteáz. Počas izolácie trypsinogénu je väčšina chymotrypsinogénu precipitovaná a odstránená. Avšak, zbytkový chymotrypsinogén je pôsobením trypsinu premenený na chymotrypsín v procese proteolýzy trypsinogénu (Groleau *et al.*, 2003). Nešpecifická aktivita trypsinu vzniká aj jeho vlastnou autolýzou, kedy vzniká pseudotrypsín (Keil-Dlouhá *et al.*, 1971). Aktivitou pseudotrypsínu vznikajú semi-tryptické peptidy, ktoré obsahujú na N-konci aromatické aminokyseliny a líšia sa od peptidov vzniknutých štiepením trypsinom. Počas MS analýzy môže byť detekovaných niekoľko peptidov, ktoré nie sú vhodné na kvantifikáciu. Príkladom takéhoto peptidu je AVSVLLR (379,2486 m/z), ktorého aminokyselínová sekvencia bola identifikovaná zároveň aj ako súčasť peptidu **HPEYAVSVLLR** (642,354 m/z). V tomto prípade je sekvencia AVSVLLR súčasťou dvoch odlišných peptidov. Teoreticky, ak by boli dve molekuly proteínu štiepené tak, že jedna poskytne peptid AVSVLLR a druhá HPEYAVSVLLR, kvantitatívna analýza, pri ktorej by bol použitý iba jeden z nich by viedla ku skreslenému výsledku. Konkrétne by sme z dvoch molekúl proteínu detekovali iba jednu molekulu vybraného peptidu. V tomto prípade by kvantifikácia samozrejme nebola správna.

Za pozitívny výsledok zníženého objemu štiepenia môže byť považované zvýšenie priemernej veľkosti plochy extrahovaných iónových chromatogramov (EIC) vybraných peptidov – YICDNQDTISSK (722,3189 m/z), HLVDEPQNLIK (653,3586 m/z) a LVNELTEFAK (582,318 m/z). Táto plocha bola vypočítaná softvérom DataAnalysis, integráciou všetkých nameraných signálov jednotlivých iónov detekovaných v ESI-MS/MS analýze. Po spriemerovaní vypočítaných hodnôt môžeme pri znížení objemu štiepenia pozorovať nárast intenzity každého z vybraných peptidov (Obr. 6). Vypočítaná veľkosť plochy peptidového iónu vyjadruje abundanciu tohto peptidu vo vzorke. Keďže vzorky obsahovali rovnaké množstvo proteínu, akákoľvek zmena v abundancii peptidov je dôkazom odlišnej efektivity štiepenia. Zvýšenie úrovne štiepenia je pravdepodobne spôsobené zvýšením koncentrácie proteínu vo vzorke, kedy je proteín prístupnejší enzýmu. Na základe tohto zistenia bol protokol upravený. V každom z nasledujúcich experimentov prebiehalo štiepenie vždy v objeme 50  $\mu$ l.

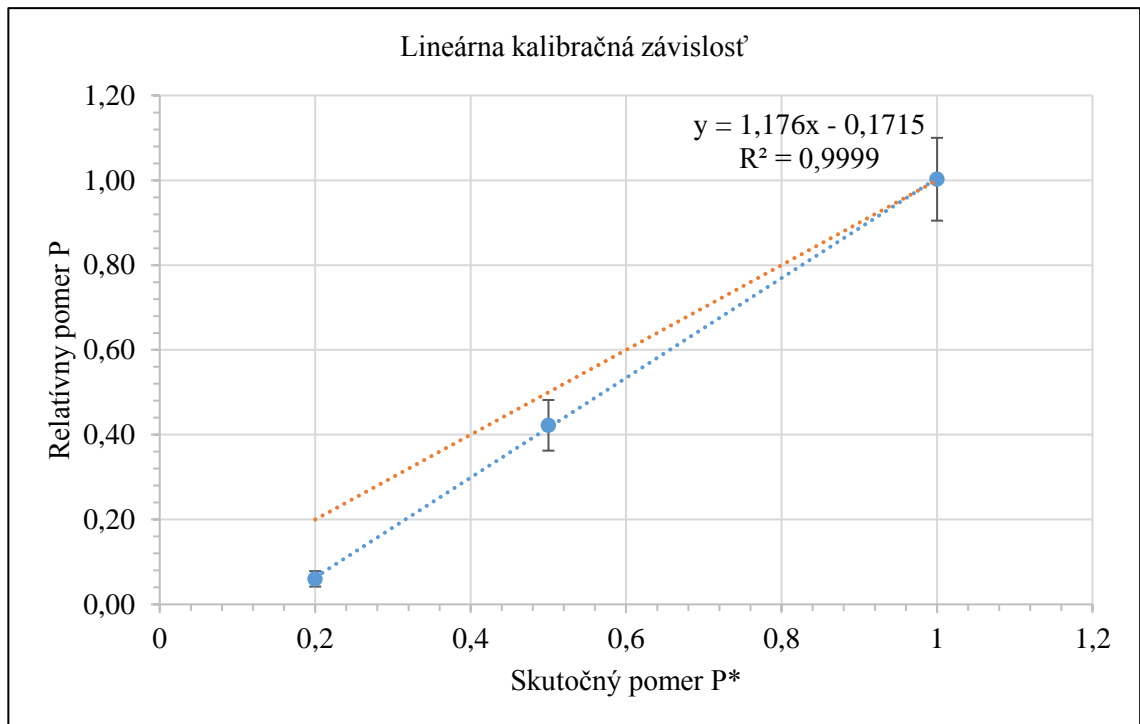


Obr. 6 Priemerná relatívna intenzita peptidových iónov YICDNQDTISSK, HLVDEPQNLIK a YLYEIAR. Modrou farbou je znázornená priemerná intenzita iónu v 50  $\mu$ l, oranžovou farbou v 100  $\mu$ l a šedou farbou v 200  $\mu$ l.

#### 4.1.2 Skúška reprodukovateľnosti štiepenia proteínu s následnou kvantifikáciou

Cieľom nasledujúceho experimentu bolo overiť úspešnosť modifikovaného protokolu štiepenia. Tento experiment prebiehal ako variant 3 pracovného postupu, kedy bolo v jednej skúmavke štiepených a deuterovaným formaldehydom značených 80  $\mu\text{g}$  proteínu. Touto „ťažkou“ formou značené peptidy predstavovali štandard, voči ktorému prebiehala kvantifikácia proteínu značeného formaldehydom, teda „ľahkou“ formou. V tomto experimente sa vzorky značené ľahkou značkou líšili v obsahu proteínu a boli pripravené v 5 opakovaniach ako je uvedené v tabuľke 2 v kapitole 3.2.1.1. Analýza a identifikácia štiepených a značených peptidov prebiehala iba s použitím ESI-MS/MS. Použitie ESI-MS/MS bolo v tomto prípade vhodnejšou voľbou ako použité MALDI-MS, pretože tandemová MS/MS analýza vedie ku vyššej pravdepodobnosti správnej identifikácie špecificky ale aj nešpecificky štiepených peptidov založenej na MS/MS spektrách (Hsu *et al.*, 2016). S použitím MALDI-TOF-MS by tento výsledok nebol dosiahnutý.

Kvantifikácia proteínu bola založená na matematickom výpočte z plochy EIC vybraných peptidov. Na určenie relatívneho pomeru medzi rôzne značenými proteínmi bol použitý jednoduchý vzorec:  $P = I_L / I_T$ , kde  $I_L$  je plocha získaná po integrácii všetkých nameraných signálov peptidu značeného ľahkou formou a  $I_T$  je rovnako získaná plocha peptidu značeného ťažkou formou značky.  $P$  predstavuje relatívny pomer medzi týmito hodnotami. Teoreticky by sa mala hodnota  $P$  približovať skutočnému pomeru ( $P^*$ ), ktorý bol v každom prípade známy. Keďže ťažkou formou značený proteín bol vždy v množstve 5  $\mu\text{g}$ , bol zvolený ako interný štandard. Na výpočet relatívneho pomeru medzi rôzne značenými vzorkami BSA boli zvolené peptidy YICDNQDTISSK ( $m/z$  722.3189), HLVDEPQNLIK ( $m/z$  653.3586), LVNELTEFAK ( $m/z$  582.318) a SLHTLFGDELCK ( $m/z$  742.3730). Vypočítané hodnoty  $P$  sa od skutočných hodnôt  $P^*$  podstatne líšili (Obr. 7). Najmä v prípade vzoriek, v ktorých bola hodnota  $P^* = 0,2$ . Ku skutočnej hodnote  $P^*$  sa najviac priblížili vzorky, v ktorých bol pomer odlišne značených proteínov 5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{g}$ . Pomerne vysoká variabilita  $P$ , znázornená chybovými úsečkami, bola zaznamenaná aj medzi hodnotami rôznych peptidov v rovnakej vzorke. Hodnota  $R^2$  je síce veľmi blízka 1, ale v tomto prípade svedčí o reprodukovateľnosti použitého protokolu, ktorý má niekoľko chýb. V prvom rade môžu byť dôvodom vysokej variability a odchýlky od skutočnej hodnoty  $P$  vysoká koncentrácia trypsínu, teda aj prítomnosť



Obr. 7 Lineárna kalibračná závislosť v rozsahu 0,2 - 1 P\* získaná vynesением priemernej hodnoty P peptidov YICDNQDTISSK, HLVDEPQNLIK, LVNELTEFAK a SLHTLFGDELCK proti skutočnej hodnote P\*. Modrou farbou sú znázornené vypočítané hodnoty. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku vypočítaných hodnôt. Oranžovou farbou je znázornená kalibračná závislosť v prípade ideálnych podmienok.

pseudotrypsínu. Ako bolo už spomenuté, pseudotryptická aktivita má vysoký vplyv na štiepenie proteínu. Ak je táto aktivita príliš vysoká, môže do značnej miery ovplyvniť kvantifikáciu. Ďalším faktorom ovplyvňujúcim kvantifikáciu môže byť príprava vzorky štandardu. Keďže 80 µg štandard bol štiepený aj značený v jednej skúmavke, môžeme uvažovať nad tým, že podmienky v ktorých tieto procesy prebiehali neboli celkom zhodné s podmienkami štiepenia a značenia proteínu značeného ľahkou značkou. Koncentrácia proteínu bola v 15 vzorkách určených na značenie ľahkou značkou podstatne nižšia ako vo vzorke, ktorá predstavovala štandard. Ak prebieha štiepenie vnútorného štandardu v iných podmienkach ako štiepenie pozorovaného analytu, dochádza ku skresleniu hodnoty P a nesprávnej kvantifikácii. Je teda zrejmé, že protokol musel byť v nasledujúcom experimente upravený.

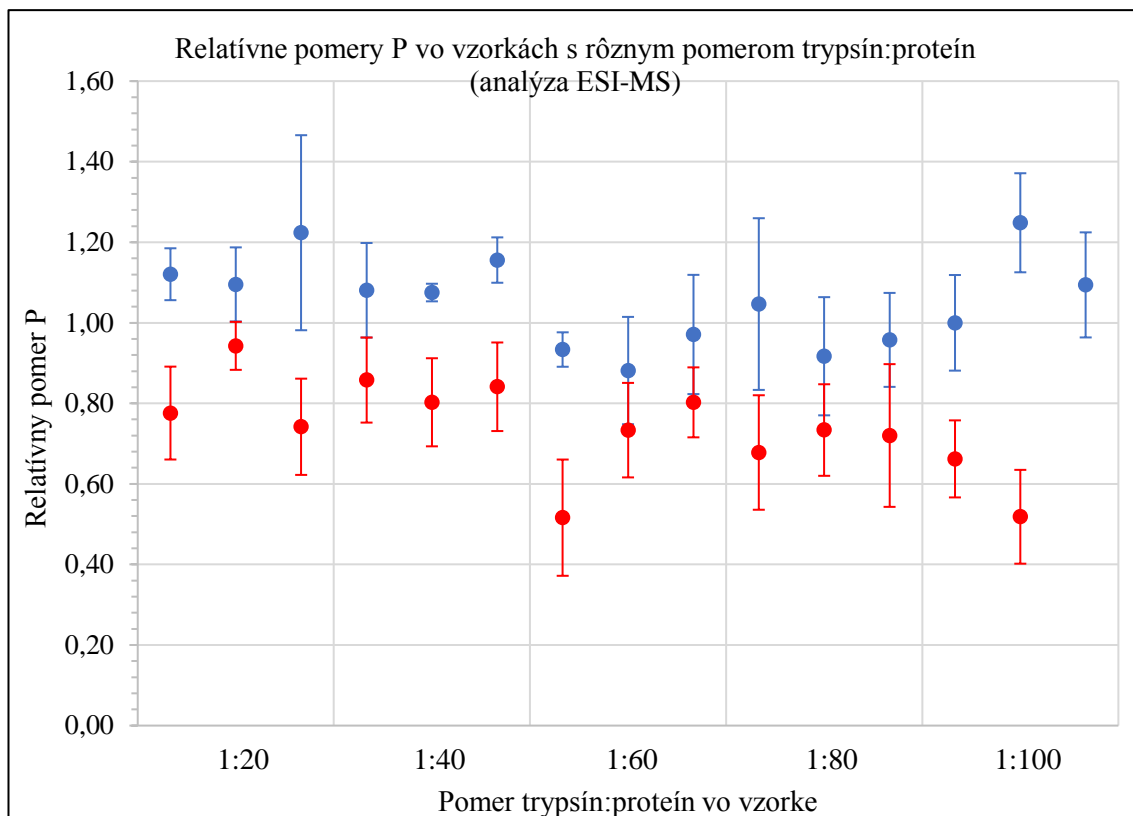
### 4.1.3 Úprava podmienok štiepenia štandardu a riedenie enzýmu

V proteomických analýzach je používaný pomer koncentrácie trypsínu ku proteínu väčšinou v rozmedzí 1:20 až 1:40 (Egeland *et al.*, 2016). Úlohou tak nízkeho pomeru je zabezpečiť aby nedochádzalo ku autolýze trypsínu. Dnes existuje niekoľko postupov, ktoré tento problém riešia. Jeden z nadôležitejších využíva imobilizované enzýmové reaktory (IMER). Táto technika umožňuje zvýšiť pomer enzým:proteín, skrátiť proces a zároveň potlačiť autolýzu (Regnier a Kim, 2014).

V tomto experimente bolo cieľom znížiť nešpecifickú aktivitu trypsínu znížením pomeru trypsín:proteín a stanoviť najvhodnejší pomer na kvantitatívnu analýzu. Ďalším cieľom bolo potvrdiť alebo vyvrátiť pravdepodobnosť vplyvu odlišných podmienok štiepenia vzorky štandardu. Postup je v kapitole 3.2 uvedený ako variant 4. Boli pripravené dve skupiny vzoriek. V prvej skupine bol štandard štiepený v pomere trypsín:proteín 1:20 v jednej skúmavke v množstve 80 µg. Po štiepení a značení ťažkou formou formaldehydu bol obsah skúmavky rozdelený do vzoriek obsahujúcich 5 µg ľahkou formou značených peptidov. Tie boli štiepené v koncentračnom rozsahu 1:20 – 1:100 v troch opakovaniach. V druhej skupine bolo 5 µg štandardu štiepeného v 15 skúmavkách zvlášť. Po značení bol obsah každej zo skúmaviek prenesený do ľahkou formou značených 15 vzoriek jednotlivo. Pomer trypsín:proteín bol v rozsahu 1:20 – 1:100 vždy v troch opakovaniach pre štandard a troch opakovaniach pre ľahkou formou značený proteín.

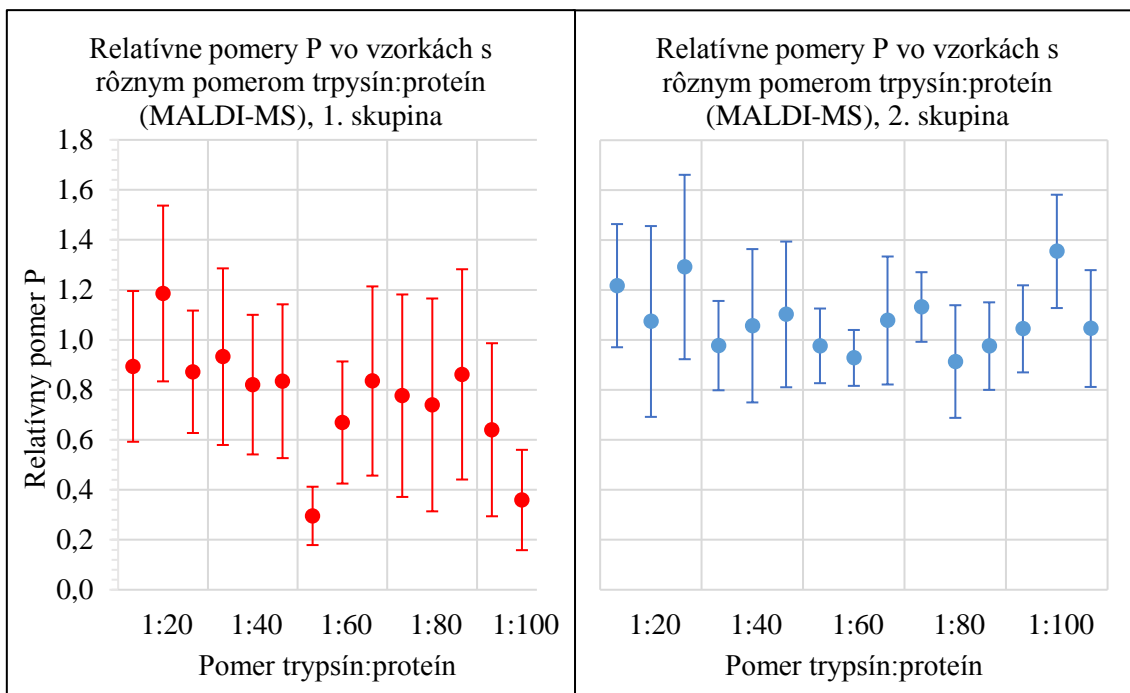
Na určenie relatívneho pomeru medzi rôzne značenými vzorkami BSA boli zvolené rovnaké peptidy ako v predošlom experimente (viď. kapitola 4.1.2). Analýza vzoriek bola vykonaná s použitím MALDI-TOF-MS aj ESI-MS hmotnostného spektrometra. Vzhľadom k tomu, že v MALDI-MS hmotnostnom spektre nebola úspešná identifikácia peptidu YICDNQDTISSK, bol nahradený za peptid RPCFSALTPDETYVPK ( $m/z$  1936.94). V prípade ESI-MS boli hodnoty relatívneho pomeru  $P$  vypočítané dosadením hodnôt do vzorca  $P = I_L / I_T$ . S použitím MALDI-TOF-MS bol relatívny pomer proteínov vo vzorke vypočítaný podobne. Na rozdiel od ESI-MS, hodnoty  $I_L$  a  $I_T$  v MALDI-MS analýze znamenajú intenzitu signálu, ktorý predstavuje monoizotopickú hmotnosť ľahkou a ťažkou formou značeného peptidu v MALDI-MS hmotnostnom spektre. Intenzita tohto signálu je proporčná množstvu analytu vo vzorke (Duncan *et al.*, 2008). Výsledné pomery  $P$  z analýzy ESI-MS sú zobrazené na nasledujúcom obrázku (Obr. 8). Porovnaním oboch foriem experimentu môžeme





Obr. 8 Priemerné hodnoty relatívnych pomerov P vypočítaných z intenzity odlišne značených peptidov v ESI-MS spektre u vzoriek s rôznym pomerom trypsín:proteín. Skutočný pomer  $P^* = 1$ . Červenou farbou je znázornená prvá skupina vzoriek, ktorá reprezentuje štiepenie štandardu v množstve 80  $\mu\text{g}$  v jednej skúmavke. Modrou farbou je znázornená druhá skupina vzoriek, ktorá reprezentuje štiepenie 15 vzoriek štandardu po 5  $\mu\text{g}$  zvlášť. Chybové úsečky znázorňujú smerodatnú odchýlku hodnoty P medzi rôznymi peptidmi.

pozorovať vplyv odlišných podmienok štiepenia vzorky štandardu. Červenou farbou znázornené priemerné hodnoty P patria vzorkám, do ktorých bol 80  $\mu\text{g}$  štandard štiepený a značený deuterovaným formaldehydom v jednej skúmavke a výsledné značené peptidy boli rozdelené po 5  $\mu\text{g}$  ku vzorkám peptidov značených ľahkou značkou. Hodnota P sa v každej vzorke značne líši od skutočnej hodnoty  $P^*$ , ktorá bola vždy 1. Pozorovaná je aj nedostatočná reprodukovateľnosť medzi vzorkami s rovnakým pomerom trypsín:proteín. Najvyššia variabilita sa vyskytuje u vzoriek s pomerom trypsín:proteín 1:20 a 1:60. Posledná vzorka s pomerom 1:100 nemohla byť z dôvodu neúspešného značenia uvedená do výsledku. Druhá skupina vzoriek je znázornená modrou farbou. Táto skupina, reprezentujúca štandard štiepený a značený po 5  $\mu\text{g}$  v 15 nezávislých skúmavkách, poskytla čiastočné zlepšenie výsledku. Najmä v prípade vzoriek štiepených trypsinom so 60- a 80-násobne nižšou koncentráciou ako je koncentrácia proteínu. Sú to práve tieto koncentrácie trypsinu, pri ktorých dochádza aj pri mikrogramových množstvách ku podobnému štiepeniu. Stanovenie pomeru vo vzorkách je správnejšie a bližšie sa ku



Obr. 9 Priemerné hodnoty relatívnych pomerov P vypočítaných z intenzity odlišne značených peptidov v MALDI-TOF-MS spektre u vzoriek s rôznym pomerom trypsin:proteín. Skutočný pomer  $P^* = 1$ . Červenou farbou je znázornená prvá skupina vzoriek, ktorá reprezentuje štiepenie štandardu v množstve 80  $\mu\text{g}$  v jednej skúmavke. Modrou farbou je znázornená druhá skupina vzoriek, ktorá reprezentuje štiepenie 15 vzoriek štandardu po 5  $\mu\text{g}$  zvlášť. Chybové úsečky znázorňujú smerodatnú odchýlku hodnoty P medzi rôznymi peptidmi.

skutočnému pomeru  $P^*$ . Podobný výsledok bol získaný aj analýzou s použitím MALDI-TOF-MS (Obr. 9). Smerodatná odchýlka hodnoty P bola značne vyššia v prvej skupine. Takto rozsiahla odchýlka podporuje nutnosť úpravy protokolu pred akýmkoľvek nasledujúcim kvantitatívnym experimentom. V druhej skupine, ktorá reprezentuje úpravu pôvodného protokolu bola zaznamenaná nižšia smerodatná odchýlka, najmä v prípade vzoriek s pomerom trypsin:proteín 1:60 a 1:80. Zníženie koncentrácie trypsinu má zároveň vplyv aj na počet identifikovaných tryptických a semi-tryptických peptidov. Každým zvýšením riedenia trypsinu bol počet identifikovaných semi-tryptických peptidov nižší. Zároveň nedochádzalo ku zmene počtu tryptických peptidov (Tab. 7). Na základe vysokej reprodukovateľnosti štiepenia a dostatočného zníženia nešpecificky štiepeného proteínu bol za najvhodnejší pomer trypsin:proteín zvolený pomer 1:60. Tento pomer bol následne použitý aj v záverečnom kvantitatívnom experimente.

Tab. 7 Počet identifikovaných peptidov analýzou ESI-MS/MS vo vzorkách 2. skupiny s rôznym pomerom trypsín:proteín.

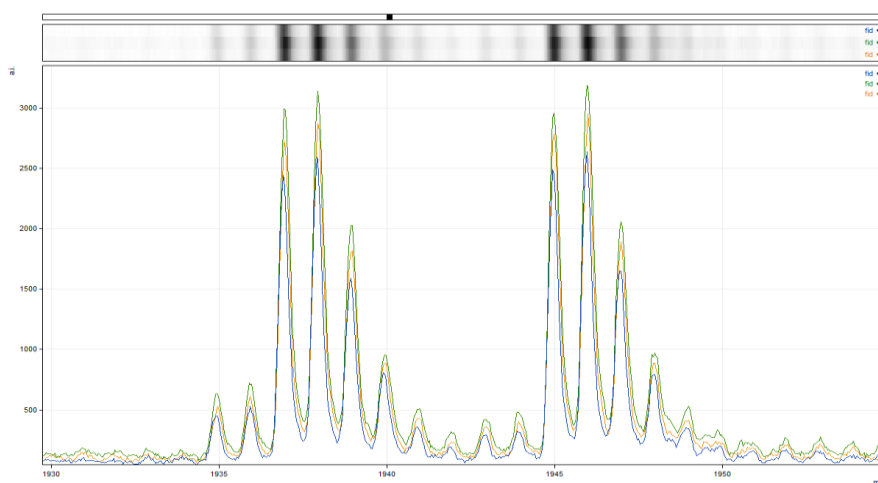
Pomer trypsín:proteín	Vzorka	Počet identifikovaných peptidov	Počet tryptických peptidov	Počet semi-tryptických peptidov
1:20	1	71	48	23
	2	74	47	27
	3	78	47	31
	Priemer	74,33	47,33	27,00
1:40	4	79	53	26
	5	77	49	28
	6	76	47	29
	Priemer	77,33	49,67	27,67
1:60	7	67	47	20
	8	61	42	19
	9	66	44	22
	Priemer	64,37	44,33	20,33
1:80	10	61	43	18
	11	61	45	16
	12	62	43	19
	Priemer	61,33	43,67	17,67
1:100	13	65	48	17
	14	54	44	10
	15	59	45	14
	Priemer	59,33	45,67	13,67

## 4.2 MALDI ionizácia a opakovateľnosť merania

Predošlá analýza dokázala, že MALDI-TOF hmotnostný spektrometer je možno použiť na kvantitatívne štúdium peptidov po štiepení mikrogramového množstva proteínu. Avšak, v porovnaní s ESI-MS bola zaznamenaná vyššia odchýlka vypočítaného pomeru od skutočného pomeru obsahu dvoch identických, ale rôzne značených peptidov. Nevýhodou MALDI ionizačnej techniky je najmä z hľadiska zaznamenaného signálu nízka reprodukovateľnosť merania. Po pôsobení lasera na jedno miesto spotu môžu byť po každom výstrele zaznamenané ióny s odlišnou početnosťou. Zároveň sa zaznamenané signály iónov líšia aj po pôsobení lasera na iné miesto rovnakého spotu. Reprodukovateľnosť môže navyše klesať medzi spotmi s rovnakou vzorkou. Na prekonanie tohto problému je preto vhodné zbierať spektrá z niekoľkých bodov na MALDI doštičke (Duncan *et al.*, 2008).

### 4.2.1 Súčet spektier z jedného spotu

Boli získané tri nezávislé spektrá z jedného spotu na MALDI doštičke. Každé spektrum bolo získané kumuláciou 25 spektier zo štyroch odlišných miest na spotu (Obr. 10). V prípade, že dochádza ku súčtu spektier z viacerých miest jedného spotu na MALDI doštičke je dosiahnutá vysoká reprodukovateľnosť získaných signálov peptidov. Zaznamenaná intenzita neprejavuje žiadnu výraznú variabilitu. Zároveň je možné pozorovať konštantný pomer medzi intenzitami nameraných signálov ľahkou a ťažkou formou značeného peptidu RPCFSALTPDETYVPK ( $m/z$  1936.94, 1944.97). Napriek

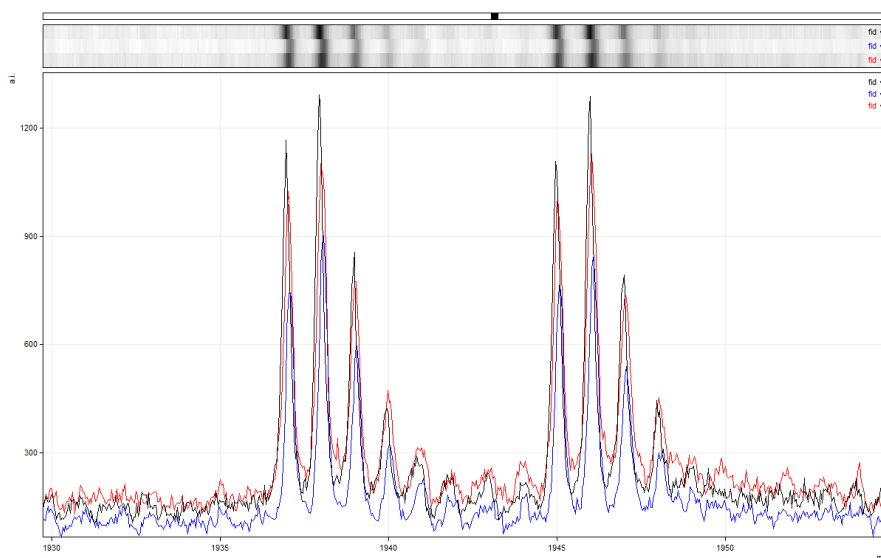


Obr. 10 Znáznornenie spektier formaldehydom a deuterovaným formaldehydom značeného peptidu RPCFSALTPDETYVPK ( $m/z$  1936.94, 1944.97). Jednotlivé spektrá boli získané súčtom 25 spektier zo štyroch rôznych miest na jednom spotu. Skutočný pomer medzi odlišne značenými peptidmi bol  $P^*=1$ .

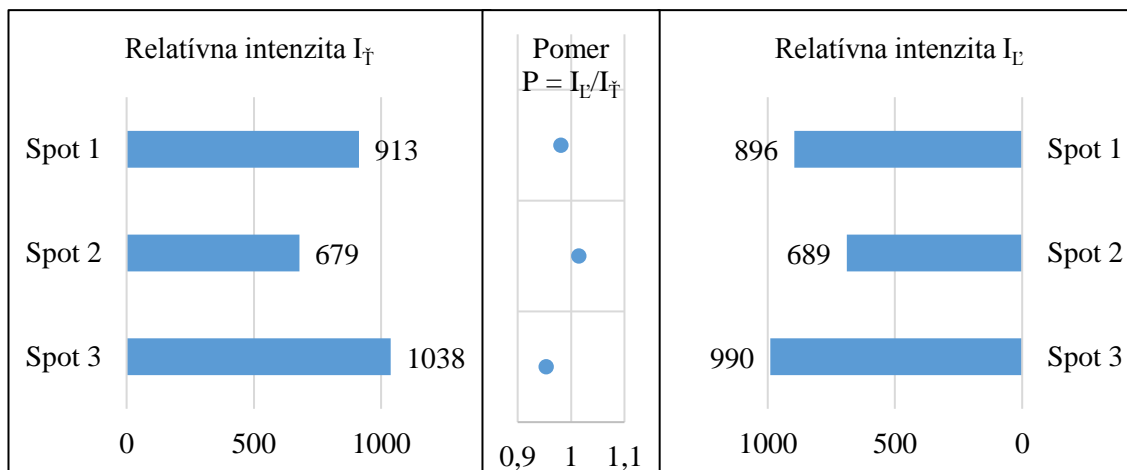
tomu, že dochádza ku agregácii analytu pôsobením kryštalizácie iba do určitých miest je zmenou pôsobenia lasera dosiahnutá dostatočná reprodukovateľnosť.

#### 4.2.2 Súčet spektier z troch spotov

Zvýšenú variabilitu v nameranej intenzite dokazuje porovnanie spektier z troch rôznych spotov (Obr. 11). Každé spektrum bolo opäť získané súčtom 25 spektier zo štyroch rôznych miest na spote. Zaznamenaná variabilita v intenzite signálu z rôznych spotov je značná. Avšak, má len bezvýznamný vplyv na kvantifikáciu (Obr. 12). Pomer medzi intenzitami signálov rôzne značeného peptidu RPCFSALTPDETYVPK ( $m/z$  1936.94, 1944.97) sa nijak výrazne nemení. Tento výsledok potvrdzuje, že ak je výsledné spektrum tvorené súčtom 25 spektier zo štyroch miest jedného spotu, je tým dosiahnutá dostatočná reprodukovateľnosť. V tom prípade stačí kvantifikácia použitím iba jedného spotu na MALDI doštičke.



Obr. 11 Znážornenie spektier formaldehydom a deuterovaným formaldehydom značeného peptidu RPCFSALTPDETYVPK ( $m/z$  1936.94, 1944.97). Jednotlivé spektrá boli získané súčtom 25 spektier zo štyroch rôznych miest na jednom spote. Skutočný pomer medzi odlišne značenými peptidmi bol  $P^* = 1$ .



Obr. 12 Intenzity nameraných signálov peptidu RPCFSALTPDETYVVK z troch spotov na MALDI doštičke. Relatívny pomer  $P$  bol vypočítaný ako intenzita ľahkou formou značeného peptidu ( $I_L$ ) / intenzita ťažkou formou značeného peptidu ( $I_T$ ). Skutočný pomer  $P^*$  bol rovný 1.

### 4.3 Kvantitatívna analýza použitím MALDI-TOF-MS a ESI-MS/MS

Protokol bol za účelom zabezpečenia reprodukovateľnosti jeho výsledku predošlými experimentami optimalizovaný. Optimalizácia však nedokázala vyriešiť hlavný problém. Vysoký počet nešpecificky štiepených peptidov sa síce riedením trypsínu znížil, no zaznamenané odchýlky vypočítaných pomerov  $P$  sa stále líšili od skutočných hodnôt. Je teda zrejmé, že na kvantitatívnu analýzu bol potrebný „proteomic grade“ enzým s vyššou špecificitou. V kvantitatívnej analýze bol použitý trypsín, ktorý je považovaný za vysoko špecifický a získané výsledky majú vyšší predpoklad správnosti.

Cieľom relatívnej kvantitatívnej analýzy bolo vytvoriť kalibračnú závislosť, ktorá na základe relatívneho pomeru rôzne značených proteínov napomáha určiť ich pravdepodobný skutočný obsah. Ak je cieľom zistiť neznámy obsah proteínu vo vzorke, podľa nasledujúceho postupu stačí tento proteín štiepiť trypsínom a získané peptidy označiť ľahkou formou značky. Následne môže byť ku tejto vzorke pridaný štandard so známym obsahom peptidov rovnakého proteínu značených ťažkou formou značky a môže prebehnúť analýza použitím hmotnostnej spektrometrie. Dosadením hodnoty vypočítaného relatívneho pomeru intenzít medzi odlišne značenými vybranými peptidmi do vzorca kalibračnej závislosti je možné vypočítať pravdepodobný obsah analyzovaného proteínu vo vzorke.

Postup experimentu je v kapitole 3.2 uvedený ako variant 5. Ako štandard bol zvolený proteín značený deuterovaným formaldehydom, ktorý bol v každom prípade v množstve 5  $\mu\text{g}$ . Ľahkou formou značený proteín bol pripravený v rozsahu 1 – 25  $\mu\text{g}$

v troch opakovaníach. Experiment bol vykonaný v dvoch sériách vzoriek, aby bola zabezpečená vyššia dôveryhodnosť výsledku. Po zmiešaní štiepených a odlišne značených peptidov bola vykonaná analýza použitím MALDI-TOF hmotnostného spektrometra. Zo získaných intenzít odlišne značených peptidov boli vypočítané relatívne pomery P, ktorých hodnoty boli vynesené proti skutočným hodnotám P\*. Výsledky kvantifikácie boli porovnané s výsledkami získanými ESI-MS analýzou.

### 4.3.1 Účinky komerčného trypsínu na štiepenie proteínu

V prvom rade je nutné podotknúť, že počet identifikovaných peptidov použitím ESI-MS bol značne vyšší a teda bol aj vyšší výber peptidov s vhodnými vlastnosťami na kvantifikáciu. Ako už bolo spomenuté, u MALDI-TOF-MS analýzy je nevýhodou potenciálne potlačenie ionizácie jedného analytu iným analytom. Zároveň, ak je v danom mieste spotu koncentrácia matrice príliš vysoká, môže prekryť analyt v spektre a ten nemusí byť vôbec identifikovaný. Z toho dôvodu môžu byť niektoré peptidy identifikované v spektre ESI-MS/MS analýzy, zatiaľ čo v spektre získanom z MALDI-TOF-MS analýzy sa nemusia vyskytovať vôbec. MALDI-TOF-MS poskytlo spektrum, v ktorom bolo identifikovaných vždy približne 16 peptidov, zatiaľ čo v prípade ESI-MS/MS analýzy bolo identifikovaných priemerne 68 peptidov (Tab. 8).

Tab. 8 Počet identifikovaných trypstických a semi-trypstických peptidov druhej série vzoriek pomocou ESI-MS/MS.

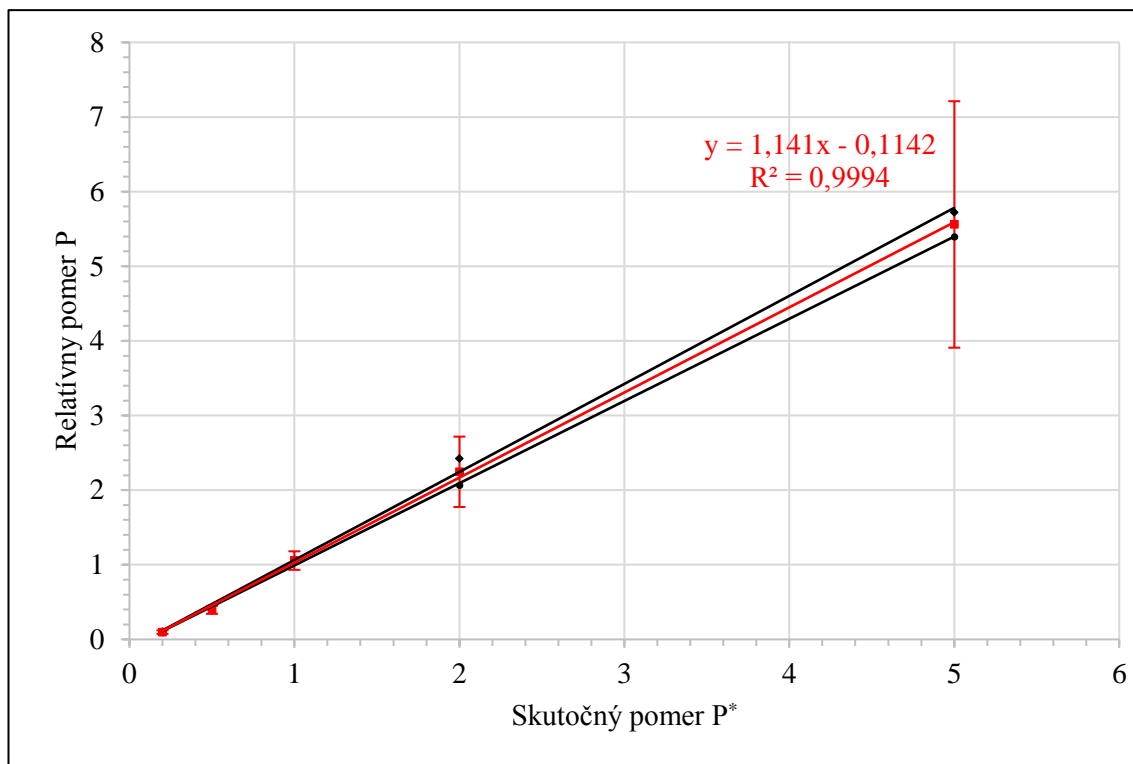
Vzorka	Počet identifikovaných peptidov	Počet trypstických peptidov	Počet semi-trypstických peptidov
1	59	53	6
2	66	53	13
3	59	53	6
4	60	49	11
5	65	54	11
6	58	50	8
7	106	49	57
8	59	48	11
9	56	48	8
10	106	47	59
11	60	48	12
12	63	50	13
13	72	52	20
14	65	49	16
15	68	51	17
Priemer	68,13	50,27	17,87

Identifikácia tak vysokého počtu tryptických a zníženie počtu semi-tryptických peptidov potvrdili predpoklad pozitívnych účinkov komerčného trypsínu od firmy Promega na štiepenie.

#### 4.3.2 Kalibračná závislosť získaná MALDI-TOF-MS analýzou

Na kvantifikáciu boli vybrané peptidy, ktoré doposiaľ v každej analýze vykazovali dostatočnú abundanciu. Intenzita týchto peptidov bola dostatočne vysoká, preto bolo jednoduché ich rozlíšiť od signálu pozadia. Vybrané peptidy spĺňajú jedno základné kritérium. Vo svojej aminokyselinovej sekvencii neobsahujú špecifické štiepne miesto trypsínu. Nie sú teda takzvané semi-tryptické peptidy. Ak peptid vo svojej štruktúre obsahuje lyzín alebo arginín (okrem N-koncovkej aminokyseliny a aminokyseliny, za ktorou nasleduje prolín), znamená to, že nie je správne štiepený a preto nie je vhodný na kvantifikáciu. Peptidy RPCFSALTPDETYVPK (m/z 1936.94), LVNELTEFAK (m/z 1219.69) a YLYEIAR (m/z 955.49) túto podmienku spĺňajú a preto boli vybrané ako vhodné na kvantifikáciu BSA vo vzorkách. Zaujímavé je, že zo všetkých identifikovaných peptidov majú iba tieto tri peptidy požadované vlastnosti na kvantifikáciu. Na obrázku (Obr. 13) môžeme pozorovať lineárnu závislosť priemerného relatívneho pomeru  $P$  signálov odlišne značených peptidov na skutočnom pomere  $P^*$  prítomnom vo vzorkách. V prvom rade je dôležité poukázať na reprodukovateľnosť pracovného postupu. Na obrázku sú znázornené dve lineárne priamky (označené čiernou farbou). Každá priamka predstavuje sériu 15 vzoriek v rozahu 1 – 25  $\mu\text{g}$  formaldehydom značených peptidov zmiešaných s 5  $\mu\text{g}$  deuterovaným formaldehydom značených peptidov. Tieto série boli pripravené a analyzované v rozdielnom čase nezávisle na sebe. Na základe vysokej podobnosti medzi nameranými hodnotami v oboch sériách týchto vzoriek môžeme potvrdiť úspešnú optimalizáciu postupu a dosiahnutie reprodukovateľnosti kvantitatívneho výsledku. Z toho dôvodu boli následne hodnoty  $P$  získané z oboch sérií sčítané. Vynesením priemerných hodnôt  $P$  proti skutočným hodnotám  $P^*$  bola vytvorená kalibračná priamka (červená), ktorá reprezentuje celú kvantitatívnu analýzu. Kalibračná závislosť je vyjadrená vzorcom  $y = 1,141x - 0,1142$  s hodnotou spoľahlivosti  $R^2$  veľmi blízkou 1. Chybové úsečky znázorňujú smerodatnú odchýlku hodnôt  $P$ . V prípade vzoriek s pomerom  $P^* = 2$  môžeme pozorovať mierny nárast rozptylu získaných hodnôt. Ak je  $P^* = 5$ , pozorujeme značne vyššiu variabilitu vypočítaných hodnôt  $P$ . Dôvodom môže byť ovplyvnenie iónovej intenzity analyzovanej



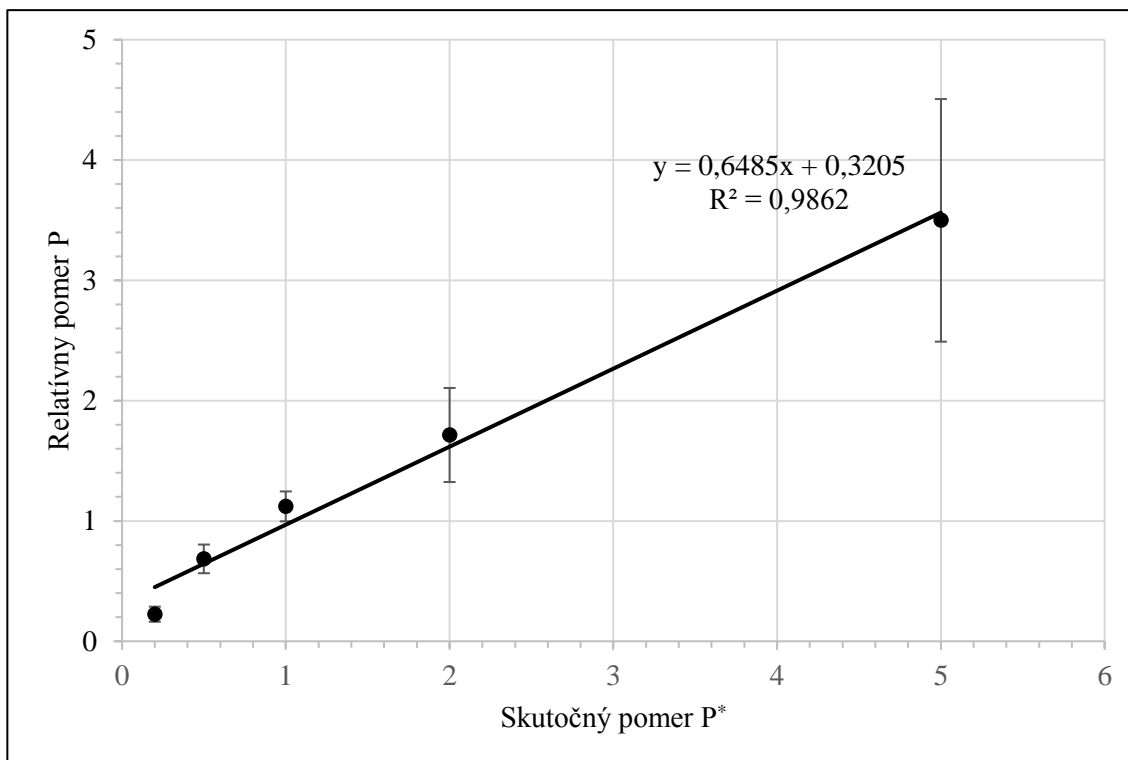


Obr. 13 Kalibračná závislosť v rozsahu 0,2 – 5 P\* získaná analýzou MALDI-TOF-MS. Jednotlivé body predstavujú priemerné hodnoty P vybraných peptidov RPCFSALTPDETYVPK (m/z 1936.94), LVNELTEFAK (m/z 1219.69) a YLYEIAR (m/z 955.49). Čiernou sú znázornené priemerné hodnoty P sledovaných peptidov v dvoch sériách vzoriek pripravených nezávisle na sebe. Červenou sú znázornené priemerné hodnoty P sledovaných peptidov oboch sérií. Chybové úsečky znázorňujú smerodatnú odchýlku hodnôt P.

molekuly inými molekulami prítomnými vo vzorke. Tento jav môže byť spôsobený kompetitívnou desorpciou a ionizáciou dvoch odlišných analytov vo vzorke (Lou *et al.*, 2015).

### 4.3.3 Kalibračná závislosť získaná ESI-MS/MS analýzou

ESI-MS/MS je v kvantitatívnej proteomike pravdepodobne najvhodnejšou voľbou hmotnostného analyzátoru. Prepojenie tejto techniky s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) je dnes vďaka vysokej citlivosti a selektivite akýmsi zlatým štandardom v mnohých kvantitatívnych analýzach (Kuklennyik *et al.*, 2011). V tomto experimente bola vykonaná ESI-MS/MS analýza rovnakých vzoriek ako v MALDI-MS. Cieľom bolo porovnanie týchto ionizačných techník z hľadiska získaných kalibračných závislostí a teda aj schopností v kvantitatívnej analýze. Na základe veľmi podobných hodnôt kalibračných závislostí oboch sérií vzoriek získaných analýzou MALDI-MS boli na kvantifikáciu ESI-MS/MS použité dáta, ktoré boli získané iba analýzou druhej série vzoriek. Na kvantifikáciu a zhotovenie kalibračnej závislosti boli najskôr vybrané



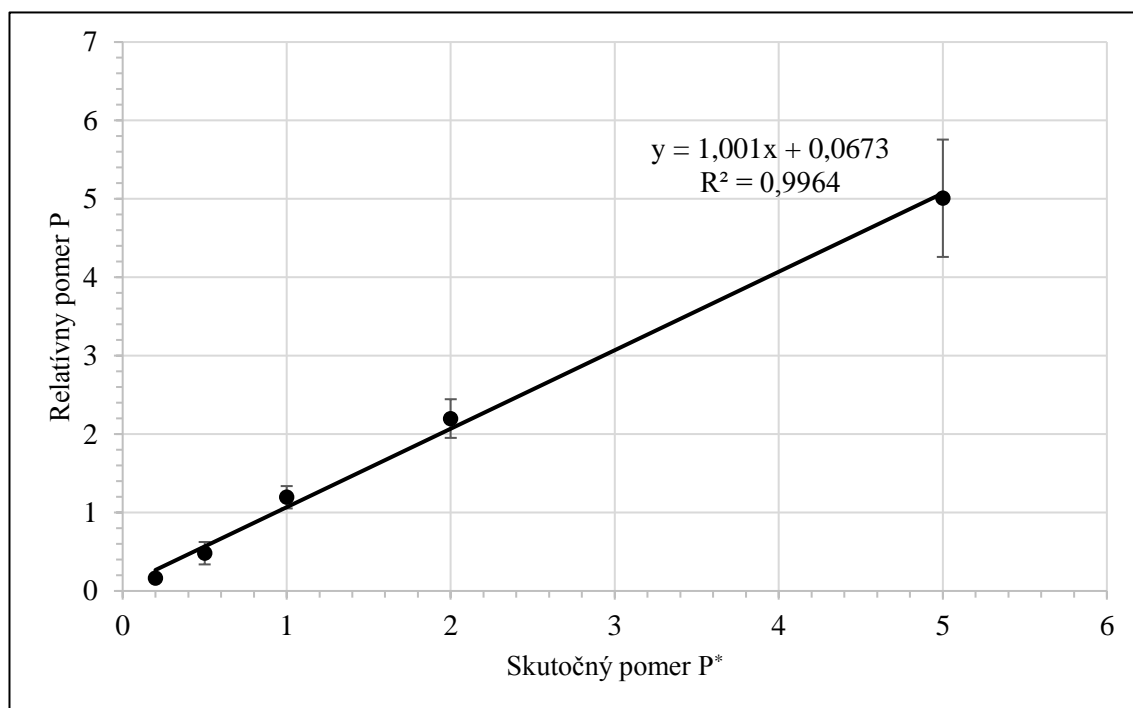
Obr. 14 Kalibračná závislosť v rozsahu 0,2 – 5 P\* získaná analýzou ESI-MS/MS. Jednotlivé body predstavujú priemerné hodnoty P vybraných peptidov RPCFSALTPDETYVPK (m/z 646.3217), LVNELTEFAK (m/z 582.318) a YLYEIAR (m/z 478.2576). Chybové úsečky znázorňujú smerodatnú odchýlku hodnôt P.

rovnaké peptidy ako v MALDI-MS analýze a to RPCFSALTPDETYVPK (m/z 646.3217), LVNELTEFAK (m/z 582.318) a YLYEIAR (m/z 478.2576). Vynesením vypočítaných relatívnych pomerov P proti skutočnému pomeru P\* môžeme pozorovať odlišnosť zaznamenaných výsledkov v porovnaní s výsledkami z MALDI-TOF-MS analýzy (Obr 14.). Analýzou ESI-MS/MS bola získaná kalibračná závislosť, ktorej rovnica  $y = 0,6485x + 0,3205$  sa výrazne líši od tej, ktorá bola získaná analýzou MALDI-TOF-MS. Zároveň vypočítané hodnoty P neprejavujú lineárnu závislosť. V prípade, že sú na kvantifikáciu vybrané tieto tri peptidy sa zdá, že MALDI-TOF-MS technika je na kvantifikáciu BSA výhodnejšia. Avšak, ak použijeme na kvantifikáciu viac peptidov, z ktorých vyberieme tie, ktoré sa najviac približujú skutočnej hodnote P a zároveň dosahujú menších hodnôt smerodatnej odchýlky, môžeme dosiahnuť lepšieho výsledku kvantifikácie. V prvom rade je nutné podotknúť, že počet identifikovaných peptidov použitím ESI-MS bol značne vyšší a teda bol aj vyšší výber peptidov s vhodnými vlastnosťami na kvantifikáciu. Medzi takéto peptidy patria napríklad YICDNQDTISSK (m/z 754.4034), LCVLHEK (m/z 477.7901), GACCPK (m/z 407.7355), HLVDEPQNLIK (m/z 454.5870) a SLHTLFGDELCK (m/z 492.5822), ktoré boli na

kvantifikáciu použité. Vynesením vypočítaných hodnôt P vybraných peptidov bola získaná kalibračná závislosť s výrazným zlepšením (Obr. 15). Zvýšenie presnosti je vyjadrené smerodatnou odchýlkou, ktorej hodnoty sú v porovnaní s predošlým výsledkom v každom prípade značne znížené. Zlepšenie vyjadruje aj rovnica kalibračnej závislosti  $y = 1,001x + 0,0673$ . Teoreticky tento výsledok znamená, že vypočítaný pomer P vybraných peptidov dvoch vzoriek, kde jedna predstavuje vzorku proteínu v neznámom množstve a druhá štandard s množstvom proteínu 5 µg je veľmi blízky predpokladanému skutočnému pomeru P\* medzi týmito vzorkami. Kvantifikácia je v takom prípade veľmi presná a môže byť považovaná za dôveryhodnú.

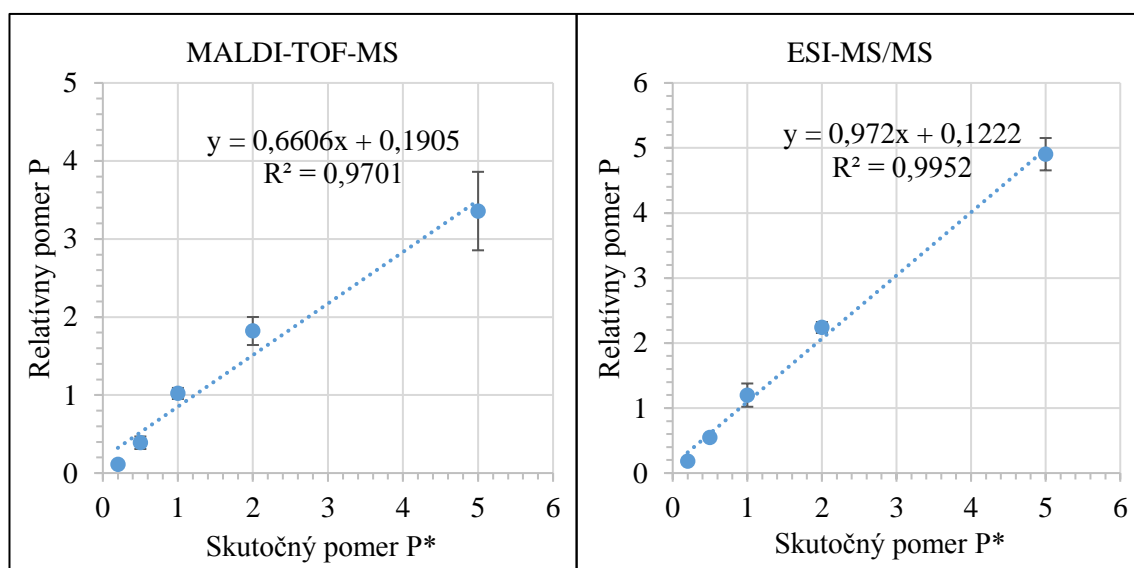
#### 4.3.4 Porovnanie kvantitatívnych vlastností MALDI-TOF-MS a ESI-MS/MS

Vo všeobecnosti je ESI-MS/MS častejšou voľbou techniky na kvantifikáciu ako MALDI-TOF-MS (Kuklenyik *et al.*, 2011). HPLC-ESI-MS/MS je vysoko reprodukovateľná a robustná technika. Jej nevýhodou je, že je v porovnaní s MALDI-TOF-MS drahá a časovo náročnejšia. Cieľom práce bolo porovnať kvantitatívne vlastnosti týchto techník a určiť, či je MALDI ionizačná technika v spojení



Obr. 15 Kalibračná závislosť v rozsahu 0,2 – 5 P\* získaná analýzou ESI-MS/MS. Jednotlivé body predstavujú priemerné hodnoty P vybraných peptidov YICDNQDTISSK (m/z 754.4034), LCVLHEK (m/z 477.7901), GACCPK (m/z 407.7355), HLVDEPQNLIK (m/z 454.5870) a SLHTLFGDELCK (m/z 492.5822). Chybové úsečky znázorňujú smerodatnú odchýlku hodnôt P.

s izotopomérnymi značkami rovnako spoľahlivá ako ESI-MS/MS. Porovnaním kalibračných závislostí spoločných peptidov bola medzi oboma ionizačnými technikami pozorovaná značná odlišnosť. Rovnica kalibračnej závislosti  $y = 1,141x - 0,1142$  získanej analýzou MALDI-TOF-MS sa priblížila ideálnym podmienkam  $P = P^*$  ( $x = y$ ) viac ako rovnica  $y = 0,6485x + 0,3205$  získaná analýzou ESI-MS/MS. Zdá sa, že by technika MALDI-TOF-MS bola v kvantitatívnej analýze s použitím troch spomenutých peptidov spoľahlivejšia. Avšak, rovnako ako v analýze ESI-MS je aj v analýze MALDI-TOF-MS u vyšších hodnôt  $P^*$  pozorovaný vysoký rozptyl vypočítaných hodnôt  $P$ . Smerodatná odchýlka hodnôt  $P$  rastie v prípade, že sú na kvantifikáciu použité vybrané peptidy spoločne. V rámci jednotlivých peptidov ale tento rozptyl nie je taký výrazný. Z toho dôvodu sa môže zdať, že by bolo vhodnejšie na kvantifikáciu použiť kalibračné závislosti získané z hodnôt  $P$  jednotlivých peptidov a nie z priemerných hodnôt  $P$  všetkých peptidov spolu. Na obrázku (Obr. 16) môžeme pozorovať peptid RPCFSALTPDETYVPK. Jeho vypočítaná priemerná hodnota  $P$  získaná analýzou MALDI-TOF-MS sa značne líši od skutočnej hodnoty  $P^*$  najmä v prípade, ak  $P^* = 5$ . Nepozorujeme však príliš vysoký rozptyl vypočítaných hodnôt  $P$  a teda môžeme predpokladať, že za daných podmienok budú tieto hodnoty vždy približne rovnaké. Zaujímavé je, že analýzou ESI-MS/MS sú rôzne značené ekvivalenty tohto peptidu detekované s inou početnosťou. Na rozdiel od MALDI-MS analýzy, kde bol v prípade  $P^* = 5$  priemerný pomer  $P = 3,35$ , v analýze ESI-MS sa približoval skutočnej hodnote  $P^*$ .



Obr. 16 Porovnanie kalibračných závislostí v rozsahu 0,2 – 5  $P^*$  peptidu RPCFSALTPDETYVPK získaných technikou MALDI-TOF-MS (vľavo) a ESI-MS/MS (vpravo).

Tab. 9 Rovnice kalibračných závislostí troch oboma analýzami detekovaných peptidov a ich spoločných kalibračných závislostí.

Analýza	Peptid	Rovnica kalibračnej závislosti	Hodnota spoločlivosti $R^2$
MALDI-TOF-MS	YLYEIAR	$y = 1,4338x - 0,3069$	0,9988
	LVNELTEFAK	$y = 1,3284x - 0,2262$	0,9996
	RPCFSALTPDETYVPK	$y = 0,6606x + 0,1905$	0,9701
	Spoločná kalibračná závislosť	$y = 1,141x - 0,1142$	0,9994
ESI-MS/MS	YLYEIAR	$y = 0,478x + 0,4188$	0,9741
	LVNELTEFAK	$y = 0,4955x + 0,4205$	0,9611
	RPCFSALTPDETYVPK	$y = 0,972x + 0,1222$	0,9952
	Spoločná kalibračná závislosť	$y = 0,6485x + 0,3205$	0,9862

Nie len v prípade tohto peptidu, ale v prípade všetkých pozorovaných peptidov boli medzi analýzami získané výrazne odlišné kalibračné závislosti (Tab. 9). Na základe tohto výsledku môžeme jednoznačne potvrdiť, že sa obe techniky vzájomne líšia. Ak vytvoríme spoločnú kalibračnú závislosť všetkých pozorovaných peptidov z danej analýzy, získavame rovnicu, ktorá sa od ideálnych podmienok pri ktorých  $P = P^*$  líši výrazne menej ako kalibračná závislosť jednotlivých peptidov samostatne. V prípade techniky MALDI-TOF-MS dochádza použitím všetkých troch peptidov na kvantifikáciu ku zlepšeniu výslednej kalibračnej závislosti. U tejto techniky je teda zrejmé, že na kvantifikáciu je nutné brať do úvahy príspevok hodnôt  $P$  viacerých peptidov a nie jednotlivých peptidov zvlášť. U ESI-MS/MS sa z troch uvedených peptidov ideálnym podmienkam približuje iba peptid RPCFSALTPDETYVPK. Ak sú na kvantifikáciu použité všetky tri peptidy je výsledná kalibračná závislosť vysoko nepresná a iba poukazuje na skutočnosť, že obe použité techniky nie sú v tejto kvantitatívnej analýze zrovnateľné. Na druhej strane je nutné pripomenúť, že technika ESI-MS/MS umožnila navyše kvantifikáciu s využitím peptidov, ktoré neboli pomocou MALDI-TOF-MS vôbec detekované (Tab. 10). Tieto peptidy zvýšili presnosť kvantifikácie. Bola získaná kalibračná priamka, ktorej rovnica  $y = 1,001x + 0,0673$  sa približuje ideálnemu prípadu kedy sa priemerná hodnota  $P$  pozorovaných peptidov rovná skutočnej hodnote  $P^*$ . Vzhľadom k tomu, že bola získaná presnejšia rovnica a počet identifikovaných peptidov spĺňajúcich požadované vlastnosti bol vyšší, môžeme potvrdiť, že je na kvantifikáciu použitého proteínu vhodnejšia. Vo vykonanom kvantitatívnom experimente umožnila kvantifikáciu aj technika MALDI-TOF-MS. Kalibračná závislosť analýzy získaná MALDI ionizáciou je však tvorená iba troma vhodnými peptidmi. Ak by spomenuté peptidy neboli identifikované, kvantifikácia by bola nemožná a nahradil by ju mohla iba technika ESI-MS/MS.

Tab. 10 Rovnice kalibračných závislostí peptidov detekovaných iba analýzou ESI-MS/MS a ich spoločná kalibračná závislosť.

Analýza	Peptid	Rovnica kalibračnej závislosti	Hodnota spoľahlivosti $R^2$
ESI-MS/MS	YICDNQDTISSK	$y = 0,9745x + 0,0227$	0,9987
	LCVLHEK	$y = 0,8558x + 0,0246$	0,9921
	GACLLPK	$y = 1,3309x - 0,1867$	0,9996
	HLVDEPQNLIK	$y = 0,9906x + 0,1274$	0,9906
	LVVSTQTALA	$y = 1,4319x + 0,0693$	0,9957
	SLHTLFGDELCK	$y = 0,8855x + 0,292$	0,9818
	LGEYGFQNALIVR	$y = 1,2627x + 0,4008$	0,9689
	Spoločná kalibračná závislosť	$y = 1,001x + 0,0673$	0,9964

## 5 ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo optimalizovať pracovný postup štiepenia a značenia za účelom reprodukovateľnosti a skvalitnenia kvantitatívnej analýzy použitím MALDI-TOF-MS a ESI-MS/MS. Pôvodný pracovný postup mal niekoľko nedostatkov. ESI-MS/MS analýzou bolo zistené, že štiepenie v objeme 200 µl nie je reprodukovateľné a preto musí byť pred kvantitatívnou analýzou upravené. Pôvodný objem štiepenia bol znížený z 200 µl štiepneho roztoku na 50 µl. Znížením objemu reakčnej zmesi dochádza ku zahusteniu proteínu, takže sa stáva prístupnejší enzýmu. Prebiehajúca difúzia medzi proteínom a enzýmom je účinnejšia a zvyšuje efektivitu celého procesu. Výsledkom je zvýšenie reprodukovateľnosti štiepenia a dosiahnutie dostatočného počtu identifikovaných peptidov.

Štiepenie proteínu bolo v menšom objeme efektívnejšie, avšak prítomnosť príliš vysokého počtu identifikovaných semi-tryptických peptidov znemožňovala kvantifikáciu. Autolýze trypsínu a nešpecifickému štiepeniu sa bežne predchádza zvýšením riedenia trypsínu. Postupným znižovaním pomeru trypsínu ku proteínu bolo dosiahnuté úspešné zníženie identifikovaných semi-tryptických peptidov bez ovplyvnenia špecifického štiepenia. Na základe získaných výsledkov bol za najvhodnejší pomer trypsin:proteín zvolený pomer 1:60. Aj napriek zníženiu semi-tryptickej aktivity bola zaznamenaná nedostatočná reprodukovateľnosť kvantitatívnych výsledkov. Získané výsledky boli ovplyvnené odlišnými podmienkami štiepenia proteínu predstavujúceho interný štandard. Vzhľadom k tomu, že štiepenie prebiehalo iba v jednej skúmavke, koncentrácia proteínového štandardu bola výrazne vyššia. Táto odlišnosť pravdepodobne spôsobila nezhodné štiepenie. Po prenesení peptidov tejto vzorky ku vzorkám určeným na kvantifikáciu došlo ku negatívnemu vplyvu na výsledky kvantitatívnej analýzy. Následný experiment, v ktorom prebiehalo štiepenie interného štandardu v niekoľkých skúmavkách oddelene preukázalo zlepšenie. Bola dosiahnutá nižšia smerodatná odchýlka vypočítaných hodnôt relatívneho pomeru medzi odlišne značenými peptidmi a tým aj spoľahlivejšia kvantifikácia.

Výsledky dosiahnuté použitím rafinovaného trypsínu boli uspokojivé iba z hľadiska identifikácie peptidov. Riedenie enzýmu viedlo ku zníženiu jeho nešpecifickej aktivity, nebolo však dostatočné. Z toho dôvodu bol na kvantitatívnu analýzu použitý komerčný trypsin od firmy Promega. Zakomponovanie tohto enzýmu do pracovného postupu viedlo ku špecifickejšiemu štiepeniu a skvalitneniu kvantitatívnej analýzy.

Kvantitatívna analýza bola vykonaná v rozsahu 1 – 25 µg proteínu, ktorý bol porovnávaný s použitím interného štandardu v množstve 5 µg. Analýza MALDI-TOF-MS umožnila kvantifikáciu s použitím iba troch vhodných peptidov. Je zaujímavé, že touto analýzou nebolo identifikovaných viac peptidov spĺňajúcich požiadavky tejto analýzy. Napriek tomu bol dosiahnutý prekvapivý výsledok, ktorý potvrdzuje, že použitie MALDI-TOF-MS môže byť vhodnou voľbou na určenie abundancie proteínov. Dôkazom je aj získaná kalibračná závislosť, ktorej smernica je blízka ideálnym podmienkam. Táto technika môže byť však na kvantifikáciu neznámej vzorky použitá iba v rozsahu 1 – 5 µg proteínu. Väčšie množstvo proteínu vedie ku vyššej odchýlke od priemerných hodnôt relatívneho pomeru a mohlo by viesť k nesprávnemu určeniu pravdepodobného obsahu proteínu vo vzorke.

Na zhodnotenie kvantitatívnych vlastností bola technika MALDI-TOF-MS porovnaná s technikou LC-ESI-MS/MS. V rámci rovnakých peptidov bol pozorovaný značný rozdiel v kvantitatívnom výsledku, ktorý potvrdzuje ako vzájomne odlišné sú tieto techniky. Navyše bol dosiahnutý kvalitnejší výsledok a presnejšia kalibračná závislosť použitím peptidov identifikovaných iba technikou ESI-MS/MS a to aj v množstve analyzovaného proteínu väčšom ako 5 µg. Zo získaných poznatkov je zrejmé, že vlastnosti kvantitatívnych dát závisia na použitej technike. Zistili sme, že v prípade kvantifikácie proteínu BSA je možné použiť obe techniky. Avšak, výsledok kvantitatívnej analýzy závisí na voľbe vhodných peptidov. V tejto práci sme vybrali konkrétne peptidy, ktorých prítomnosť v analyzovanej vzorke umožnila kvantifikáciu s prekvapivým záverom. Použitie vybraných peptidov môže v následných kvantitatívnych analýzách BSA viesť k určeniu pravdepodobného obsahu tohto proteínu v neznámej vzorke.



## 6 LITERATÚRA

- Aggarwal K., Choe L.H., Lee K.H. (2006): Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* **5**, 112-120.
- Asara J.M., Christofk H.R., Freemark L.M., Cantley L.C. (2008): A label-free quantification method by MS/MS TIC compared to SILAC and spectral counting in a proteomics screen. *Proteomics* **8**, 994-999.
- Aye T.T., Scholten A., Taouatas N., Varro A., Van Veen T.A., Vos M.A., Heck A.J. (2010): Proteome-wide protein concentrations in the human heart. *Molecular BioSystems* **6**, 1917-1927.
- Baird T.T., Craik C.S. (2013): Chapter 575 – Trypsin. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Vol. 3, 3rd ed., (Rawlings N.D., Salvensen G. eds.), Academic Press, Elsevier, London, UK, 2594-2600.
- Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007): Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Biochemistry* **389**, 1017-1031.
- Benk A.S., Roesli C. (2012): Label-free quantification using MALDI mass spectrometry: considerations and perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**, 1039-1056.
- Blein-Nicolas M., Zivy M. (2016): Thousand and one ways to quantify and compare protein abundances in label-free bottom-up proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta* **1864**, 883-895.
- Bodnar W.M., Blackburn R.K., Krise J.M., Moseley M.A. (2003): Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14**, 971-979.
- Boersema P.J., Aye T.T., van Veen T.A.B., Heck A.J.R., Mohammed S. (2008): Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics* **8**, 4624-4632.
- Boersema P.J., Foong L.Y., Ding V.M., Lemeer S., van Breukelen B., Philp R., Boekhorst J., Snel B., den Hertog J., Choo A.B., Heck A.J. (2009a): In-depth qualitative and quantitative profiling of tyrosine phosphorylation using a combination of phosphopeptide immunoaffinity purification and stable isotope dimethyl labeling. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 84-99.
- Boersema P.J., Raijmakers R., Lemeer S., Mohammed S., Heck A.J.R. (2009b): Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nature Protocols* **4**, 484-494.
- Brownridge P., Beynon R.J. (2011): The importance of the digest: Proteolysis and absolute quantification in proteomics. *Methods* **54**, 351-360.
- Bucknall M., Fung K.Y., Duncan M.W. (2002): Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **13**, 1015-1027.
- Burkhart J.M., Schumbrutzki C., Wortelkamp S., Sickmann A., Zahedi R.P. (2012): Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of Proteomics* **75**, 1454-1462.
- Covey T.R., Huang E.C., Henion J.D. (1991): Structural characterization of protein tryptic peptides via liquid chromatography/mass spectrometry and collision-induced dissociation of their doubly charged molecular ions. *Analytical Chemistry* **63**, 1193-1200.
- Dadvar P., O'Flaherty M., Scholten A., Rumpel K., Heck A.J.R. (2009): A chemical proteomics based enrichment technique targeting the interactome of the PDE5 inhibitor PF-4540124. *Molecular BioSystems* **2**, 472-482.
- Dayon L., Hainard A., Licker V., Turck N., Kuhn K., Hochstrasser D.F., Burkhard P.R., Sanchez J.C. (2008): Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-Plex isobaric tags. *Analytical Chemistry* **80**, 2921-2931.
- de Hoffmann E., Stroobant V. (2007): *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 502 strán.
- Ding X., Yang K.L. (2015): Quantitative serine protease assays based on formation of copper(II)-oligopeptide complexes. *The Analyst* **140**, 340-345.

- Drapeau G.R., Boily Y., Houmard J. (1972): Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry* **247**, 6720-6726.
- Duncan M.W., Roder H., Hunsucker S.W. (2008): Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* **7**, 355-370.
- Egeland S.V., Reubsaet L., Halvorsen T.G. (2016): The pros and cons of increased trypsin-to-protein ratio in targeted protein analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **123**, 155-61.
- Fabre B., Lambour T., Bouyssié D., Menneteau T., Monsarrat B., Burlet-Schiltz O., Bousquet-Dubouch M.P. (2014): Comparison of label-free quantification methods for the determination of protein complexes subunits stoichiometry. *EuPA Open Proteomics* **4**, 82-86.
- Gaskell S.J. (1997): Electrospray: principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry* **32**, 677-688.
- Glatter T., Ludwig C., Ahrné E., Aebersold R., Heck A.J., Schmidt A. (2012): Large-scale quantitative assessment of different in-solution protein digestion protocols reveals superior cleavage efficiency of tandem Lys-C/trypsin proteolysis over trypsin digestion. *Journal of Proteome Research* **11**, 5145-5156.
- Goodlett D.R., Keller A., Watts J.D., Newitt R., Yi E.C., Purvine S., Eng J.K., von Haller P., Aebersold R., Kolker E. (2001): Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**, 1214-1221.
- Griffin T.J., Han D.K.M., Gygi S.P., Rist B., Lee H., Aebersold R. (2001): Toward a high-throughput approach to quantitative proteomic analysis: expression-dependent protein identification by mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **12**, 1238-1246.
- Groleau P.E., Gauthier S.F., Pouliot Y. (2003): Effect of residual chymotryptic activity in a trypsin preparation on peptide aggregation in a  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysate. *International Dairy Journal* **13**, 887-895.
- Guillaume E., Panchaud A., Affolter M., Desvergnés V., Kussmann M. (2006): Differentially isotope-coded N-terminal protein sulphonation: Combining protein identification and quantification. *Proteomics* **6**, 2338-2349.
- Gygi S. P., Corthals G. L., Zhang Y., Rochon Y., and Aebersold R. (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9390-9395.
- Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R. (1999): Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **17**, 994-999.
- Hajkova D., Rao K.C., Miyagi M. (2006): pH dependency of the carboxyl oxygen exchange reaction catalyzed by lysyl endopeptidase and trypsin. *Journal of Proteome Research* **5**, 1667-1673.
- Han X., Aslanian A., Yates J.R. (2009): Mass Spectrometry for Proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **12**, 483-490.
- Hedstrom L., Szilagy L., Rutter W.J. (1992): Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* **255**, 1249-1253.
- Hillenkamp F., Karas M. (1990): Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology* **193**, 280-295.
- Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen N.W.M., Tai H.L. (2003): Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* **24**, 3-12.

- Hsu J.L., Chen S.H. (2016): Stable isotope dimethyl labelling for quantitative proteomics and beyond. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **374**:20150364.  
<http://rsta.royalsocietypublishing.org/content/374/2079/20150364>
- Hsu J.L., Huang S.Y., Chow N.H., Chen S.H. (2003): Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Analytical Chemistry* **15**, 6843-6852.
- Hsu J.L., Huang S.Y., Shiea J.T., Huang W.Y., Chen S.H. (2005): Beyond quantitative proteomics: Signal enhancement of the al ion as a mass tag for peptide sequencing using dimethyl labeling. *Journal of Proteome Research* **4**, 101-108.
- Chahrour O., Cobice D., Malone J. (2015): Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **113**, 2-20.
- Chamrád I., Strouhal O., Rehulka P., Lenobel R., Šebela M. (2011): Microscale affinity purification of trypsin reduces background peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of protein digests. *Journal of Proteomics* **74**, 948-957.
- Che F., Fricker L.D. (2002): Quantitation of neuropeptides in Cpefat/Cpefat mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **74**, 3190-3198.
- Chen E.I., Cociorva D., Norris J.L., Yates J.R. 3rd. (2007): Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research* **6**, 2529-2538.
- Cheng D., Hoogenraad C.C., Rush J., Ramm E., Schlager M.A., Duong D.M., Xu P., Wijayawardana S.R., Hanfelt J., Nakagawa T., Sheng M., Peng J. (2006): Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**, 1158-1170.
- Ji J., Chakraborty A., Geng M., Zhang X., Amini A., Bina M., Regnie F. (2000): Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides. *Journal of Chromatography* **745**, 197-210.
- Juraschek R., Dülcks T., Karas M. (1999): Nanoelectrospray--more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **10**, 300-308.
- Kallweit U., Börnsen K.O., Kresbach G.M., Widmer H.M. (1996): Matrix compatible buffers for analysis of proteins with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **10**, 845-849.
- Karas M., Krüger R. (2003): Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews* **103**, 427-440.
- Keil-Dlouhá V., Zylber N., Imhoff J., Tong N., Keil B. (1971): Proteolytic activity of pseudotrypsin. *FEBS Letters* **16**, 291-295.
- Koppelaar D.W., Barinaga C.B., Denton M.B., Sperline R.P., Hieftje G.M., Schilling G.D., Andrade F.J., Barnes IV J.H. (2005): MS detectors. *Analytical Chemistry* **77**, 418-427.
- King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C., Olah T. (2000): Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **11**, 942-950.
- Kirkpatrick D.S., Gerber S.A., Gygi S.P. (2005): The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods* **35**, 265-273.
- Kuklenyik Z., Boyer A.E., Lins R., Quinn C.P., Gallegos-Candela M., Woolfitt A., Pirkle J.L., Barr J.R. (2011): Comparison of MALDI-TOF-MS and HPLC-ESI-MS/MS for endopeptidase activity-based quantification of anthrax lethal factor in serum. *Analytical Chemistry* **83**, 1760-1765.
- Kunitz M., Northrop J.H. (1934): Inactivation of crystalline trypsin. *Journal of General Physiology* **17**, 591-615.
- Lane C.S. (2005): Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 848-869.

- Li J., Steen H., Gygi S.P. (2003): Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents the yeast salinity stress response. *Molecular & Cellular Proteomics* **2**, 1198-1204.
- Liu H., Sadygov R.G., Yates J.R. (2004): A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical Chemistry* **76**, 4193-4201.
- Liu H., Zhang N., Wan D., Cui M., Liu Z., Liu S. (2014): Mass spectrometry-based analysis of glycoproteins and its clinical applications in cancer biomarker discovery. *Clinical Proteomics* **11**:14.  
<https://clinicalproteomicsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1559-0275-11-14>
- Lottspeich F., Kellermann J. (2011): ICPL labeling strategies for proteome research. In: *Gel-Free Proteomics* (Gevaert K., Vandekerckhove J., eds.), Humana Press, New York, U.S.A., 55-64.
- Lou X., de Waal B.F., Milroy L.G., van Dongen J.L. (2015): A sample preparation method for recovering suppressed analyte ions in MALDI TOF MS. *Journal of Mass Spectrometry* **50**, 766-770.
- Ma J., Li W., Lv Y., Chang C., Wu S., Song L., Ding C., Wei H., He F., Jiang Y., Zhu Y. (2013): A new insight into the impact of different proteases on SILAC quantitative proteome of the mouse liver. *Proteomics* **13**, 2238-2242.
- Ma W., Tang C., Lai L. (2005): Specificity of trypsin and chymotrypsin: Loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant. *Biophysical Journal* **89**, 1183-1193.
- Maher S., Jjunju F.P.M, Taylor S. (2015): Colloquium: 100 years of mass spectrometry: perspectives and future trends. *Reviews of Modern Physics* **87**, 113-135.
- Mann M., Kelleher N. L. (2008): Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18132-18138.
- Masaki T., Fujihashi T., Nakamura K., Soejima M. (1981): Studies on a new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M497-1. II. specificity and inhibition studies of *Achromobacter* protease I. *Biochimica et Biophysica Acta* **660**, 51-55.
- Mason D.E., Liebler D.C. (2003): Quantitative analysis of modified proteins by LC-MS/MS of peptides labeled with phenyl isocyanate. *Journal of Proteome Research* **2**, 265-272.
- Medzihradsky K.F. (2005): In-solution digestion of proteins for mass spectrometry. *Methods in Enzymology* **405**, 50-65.
- Miyagi M., Rao K.C. (2007): Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass Spectrometry Reviews* **26**, 121-136.
- Munoz J., Low T.Y., Kok Y.J., Chin A., Frese Ch.K., Ding V., Choo A., Heck A.J.R. (2011): The quantitative proteomes of human-induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Molecular Systems Biology* **7**:550.  
<http://msb.embopress.org/content/7/1/550>
- Nakamura T., Oda Y. (2007): Mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **24**, 147-164.
- Norrgran J., Williams T.L., Woolfitt A.R., Solano M.I., Pirkle J.L., Barr J.R. (2009): Optimization of digestion parameters for protein quantification. *Analytical Biochemistry* **393**, 48-55.
- Oda Y., Huang K., Cross F.R., Cowburn D., Chait B.T. (1999): Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 6591-6596.
- Olsen J.V., Ong S.E., Mann M. (2004): Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 608-614.
- Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**, 376-386.
- Ong S.E., Mann M. (2005): Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology* **1**, 252-262.
- Pan S., Aebersold R. (2007): Quantitative proteomics by stable isotope labeling and mass spectrometry. In: *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics* 367. (Matthiesen R., ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, U.S.A., 209-218.

- Polpitiya A.D., Qian W.J., Jaitly N., Petyuk V.A., Adkins J.N., Camp D.G., Anderson G.A., Smith R.D. (2008): DANTE: a statistical tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics* **24**, 1556-1558.
- Portolés T., Pitarch E., López F.J., Hernández F., Niessen W.M. (2011): Use of soft and hard ionization techniques for elucidation of unknown compounds by gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25**, 1589-1599.
- Pramanik B.N., Mirza U.A., Ing Y.H., Liu Y., Bartner P.L., Weber P.C., Bose A.K. (2002): Microwave-enhanced enzyme reaction for protein mapping by mass spectrometry: a new approach to protein digestion in minutes. *Protein Science* **11**, 2676-2687.
- Priego-Capote F., Ramírez-Boo M., Hochstrasser D., Sanchez J.C. (2011): Qualitative and quantitative analysis of glycosylated proteins in human plasma by glucose isotopic labeling with <sup>13</sup>C6-reducing sugars. In: *Methods in Molecular Biology* 728. (Simpson R.J., Greening D.W., eds.), Humana Press, New York, U.S.A., 219-232.
- Proc J.L., Kuzyk M.A., Hardie D.B., Yang J., Smith D.S., Jackson A.M., Parker C.E., Borchers C.H. (2010): A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. *Journal of Proteome Research* **9**, 5422-5437.
- Rabilloud T., Lelong C. (2011): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of Proteomics* **74**, 1829-1841.
- Rao K.C., Palamalai V., Dunlevy J.R., Miyagi M. (2005): Peptidyl-Lys metalloendopeptidase-catalyzed 18O labeling for comparative proteomics: application to cytokine/lipopolysaccharide-treated human retinal pigment epithelium cell line. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**, 1550-1557.
- Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007): Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* **2**, 1896-1906.
- Rappsilber J., Ryder U., Lamond A.I., Mann M. (2002): Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research* **12**, 1231-1245.
- Rauniyar N., Yates J.R. (2014): Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. *Journal of Proteomics* **13**, 5293-5309.
- Regnier F.E., Kim J. (2014): Accelerating trypsin digestion: the immobilized enzyme reactor. *Bioanalysis* **6**, 2685-2698.
- Reynolds K.J., Yao X., Fenselau C. (2002): Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent. *Journal of proteome research* **1**, 27-33.
- Ross P.L., Huang Y.N., Marchese J.N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhász P., Martin S., Bartlett-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D.J. (2004): Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 1154-1169.
- Santos H.M., Rial-Otero R., Fernandes L., Vale G., Rivas M.G., Moura I., Capelo J.L. (2007): Improving sample treatment for in-solution protein identification by peptide mass fingerprint using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **6**, 3393-3399.
- Shah T.R., Misra A. (2011): Chapter 8 - Proteomics. In: *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*, 1st ed., (Misra A. ed.), Elsevier Inc., London, UK, 387-427.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**, 850-858.
- Schaefer H., Chamrad D.C., Marcus K., Reidegeld K.A., Blüggel M., Meyer H.E. (2005): Tryptic transpeptidation products observed in proteome analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proteomics* **5**, 846-852.
- Schlosser A., Lehmann W.D. (2000): Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides: a key structural element controlling low-energy collision-induced dissociation of peptides. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 1382-1390.
- Schmidt A., Kellermann J., Lottspeich F. (2005): A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **5**, 4-15.

- Scholten A., Mohammed S., Low T.Y., Zanivan S., van Veen T.A., Delanghe B., Heck A.J. (2011): In-depth quantitative cardiac proteomics combining electron transfer dissociation and the metalloendopeptidase Lys-N with the SILAC mouse. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**:O111.008474.  
<http://www.mcponline.org/content/10/10/O111.008474.long>.
- Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. (2011): Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337-342.
- Silva J.C., Gorenstein M.V., Li G.Z., Vissers J.P., Geromanos S.J. (2006): Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**, 144-156.
- Stachowicz A., Siudut J., Suski M., Olszanecki R., Korbut R., Undas A., Wiśniewski J.R. (2017): Optimization of quantitative proteomic analysis of clots generated from plasma of patients with venous thromboembolism. *Clinical Proteomics* **14**:38  
<https://clinicalproteomicsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12014-017-9173-x>.
- Steen H., Jebanathirajah J.A., Springer M., Kirschner M.W. (2005): Stable isotope-free relative and absolute quantitation of protein phosphorylation stoichiometry by MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **15**, 3948-3953.
- Steitz T.A., Henderson R., Blow D.M. (1969): Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. 3. Crystallographic studies of substrates and inhibitors bound to the active site of alpha-chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology* **46**, 337-348.
- Strohalm M., Hassman M., Kosata B., Kodíček M. (2008): mMass Data Miner: an Open Source Alternative for Mass Spectrometric Data Analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 905-908.
- Sun Z., Qin H., Wang F., Cheng K., Dong M., Ye M., Zou H. (2012): Capture and dimethyl labeling of glycopeptides on hydrazide beads for quantitative glycoproteomics analysis. *Analytical Chemistry* **84**, 8452-8456.
- Sur T. (2013): iTRAQ, a new prospect of toxicogenomics. *International Journal of Human Genetics* **13**, 33-40.
- Szájli E., Fehér T., Medzihradzsky K.F. (2008): Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**, 2410-2418.
- Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Shevchenko A. (2006): Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959-2963.
- Thompson A., Schäfer J., Kuhn K., Kienle S., Schwarz J., Schmidt G., Neumann T., Hamon Ch. (2003): Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry* **75**, 1895-1904.
- Trauger S.A., Webb W., Siuzdak G. (2002): Peptide and protein analysis with mass spectrometry. *Journal of Spectroscopy* **16**, 15-28.
- Tsay Y.G., Wang Y.H., Chiu Ch.M., Shen B.J., Lee S.Ch. (2000): A strategy for identification and quantitation of phosphopeptides by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **287**, 55-64.
- Tsiatsiani L., Heck A.J. (2015): Proteomics beyond trypsin. *The FEBS Journal* **282**, 2612-2626.
- Unwin R.D. (2010): Quantification of proteins by iTRAQ. In: *LC-MS/MS in Proteomics*. (P.R. Cutilass, J.F. Timms, eds.), Humana Press, New York, New York, U.S.A., 205-215.
- Unwin R.D., Evans C.A., Whetton A.D. (2006): Relative quantification in proteomics: new approaches for biochemistry. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 473-484.
- Urban P.L. (2016): Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society a Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **374**:20150382.  
<http://rsta.royalsocietypublishing.org/content/374/2079/20150382.long>
- Vajda T., Szabó T. (1976): Specificity of trypsin and alpha-chymotrypsin towards neutral substrates. *Acta Biochimica Et Biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae* **11**, 287-294.
- Wall M.J., Crowell A.M., Simms G.A., Carey G.H., Liu F., Doucette A.A. (2011): Implications of partial tryptic digestion in organic-aqueous solvent systems for bottom-up proteome analysis. *Analytica Chimica Acta* **703**, 194-203.

- Walmsley S.J., Rudnick P.A., Liang Y., Dong Q., Stein S.E., Nesvizhskii A.I. (2013): Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics. *Journal of Proteome Research* **12**, 5666-5680.
- Wang W., Zhou H., Lin H., Roy S., Shaler T.A., Hill L.R., Norton S., Kumar P., Anderle M., Becker Ch.H. (2003): Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Analytical Chemistry* **75**, 4818-4826.
- Werner T., Sweetman G., Savitski M.F., Mathieson T., Bantscheff M., Savitski M.M. (2014): Ion coalescence of neutron encoded TMT 10-plex reporter ions. *Analytical Chemistry* **86**, 3594-3601.
- Wiese S., Reidegeld K.A., Meyer H.E., Warscheid B. (2007): Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **7**, 34-350.
- Wilkinson W.R., Gusev A.I., Proctor A., Houalla M., Hercules D.M. (1997): Selection of internal standards for quantitative analysis by matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) Time-of-light Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **357**, 241-248.
- Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* **6**, 359-362.
- Wu Y., Wang F., Liu Z., Qin H., Song Ch., Huang J., Bian Y., Wei X., Dong J., Zou H. (2014): Five-plex isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Chemical Communications* **50**, 1708-1710.
- Yates J.R. (1998): Mass Spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry* **33**, 1-19.
- Yates J.R., Ruse Ch.I., Nakorchevsky A. (2009): Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* **11**, 49-79.
- Zhang Y., Fonslow B.R., Shan B., Baek M.C., Yates J.R. (2013): Analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews* **113**, 2343-2394.

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

AQUA	absolútna kvantifikácia
ACN	acetonitril
But-NHS	2,5-dioxopyrolidín-1-yl-ester kyseliny butánovej
BES	kyselina N,N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonová
BSA	hovädzí sérový albumín
CID	disociácia indukovaná kolíziou
CI	chemická ionizácia
CHCA	kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyškoricová
C18	oktadecylsilán
DAHC	hydrogencitrónan amónny
DTT	dithiothreitol
EIC	extrahovaný iónový chromatogram
EI	ionizácia nárazom elektrónov
EC	klasifikačné enzýmové číslo
ESI	ionizácia elektrosprejom
FTICR	iónová cyklotronová rezonancia Fourierovou transformáciou
FAB	bombardovanie urýchlenými atómami
FA	kyselina mravčia
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
ICAT	izotopovo kódované afinitné značenie
iTRAQ	izobarické značenie pre relatívnu a absolútnu kvantifikáciu
iPROH	isopropanol
IAA	2-jodoacetamid
IL	intenzita signálu ľahkou formou značeného peptidu
I <sub>T</sub>	intenzita signálu ťažkou formou značeného peptidu
I <sub>T</sub>	iónová pasca
IMER	imobilizované enzýmové reaktory
ICPL	izotopovo kódované proteinové značenie
ICR	iónová cyklotronová rezonancia
LC	kvapalinová chromatografia
MS	hmotnostná spektrometria
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
MeOH	methanol
MALDI	laserová desorpčná ionizácia s podporou matrice
mPAI	exponenciálne modifikovaný index peptidovej abundancie
NHS	N-hydroxysukcinimid
Nic-NHS	N-nikotinoyloxy-sukcinimid
PD	desorpcia plazmou
P	relatívny pomer
P*	skutočný pomer
PAI	index peptidovej abundancie
Q	kvadrupól
QqQ	trojitý kvadrupól
SA	kyselina sinapová
StageTip	Stop-and-go extrakčná špička
SILAC	stabilné izotopové značenie aminokyselinami v bunkovej kultúre
SDS	dodecylsírán sodný
TMT	tandemová hmotnostná značka



TEAB	triethylaminbikarbonátový pufor
TFA	kyselina trifluoroctová
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra vysokoučinná kvapalinová chromatografia