

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Laboratoř růstových regulátorů



Optimalizace přípravy vzorku vlasu
pro proteomickou analýzu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Pavlína Kalábová
Studijní program:	N1501- Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2017

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Pavlína Kalábová
Název práce:	Optimalizace přípravy vzorku vlasu pro proteomickou analýzu
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	Diplomová práce se zabývá vývojem proteomické hmotnostně spektrometrické analýzy lidských vlasů, která by mohla být v budoucnu využita ve forenzní biologii. V teoretické části byla zpracována rešerše o lidském vlasu, byla popsána jeho struktura, růstový cyklus a vlasové proteiny – keratiny a proteiny asociované s keratinem. Na základě literární rešerše byl sestaven protokol, experimentálně ověřen a postupně optimalizován. Optimalizace zahrnovala přípravu vzorku, extrakci a digesci proteinů. Následovala analýza na hmotnostním spektrometru Orbitrap a statistické vyhodnocení.
Klíčová slova:	Vlasy, proteomika, keratiny, hmotnostní spektrometrie, extrakce proteinů, optimalizace
Počet stran:	65
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Pavlína Kalábová

Title of thesis: Optimization of hair sample preparation for proteomics analysis

Type of thesis: Diploma

Department: Institute of molecular and translation medicine

Supervisor: Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract: This Diploma thesis is focused to development of extraction method of hair proteins for mass spectrometry analysis, which can be used for forensic biology in future. The theoretical part includes processed research on human hair, which is described by its structure, growth cycle and the hair proteins – keratin, keratin-associated proteins and non-keratinous proteins. Based on a literature review it was compiled a protocol, which was experimentally verified and optimized by degrees. Optimizing include sample preparation - extraction and dissolution, and protein digestion. Samples were than analysed by mass spectrometer Orbitrap Elite and results were statistically processed.

Keywords: Hair, proteomics, keratins, mass spectrometry, extraction of proteins, optimalization

Number of pages: 65

Number of appendices: 1

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Tomáše Oždiana, Ph.D., za použití citované literatury uvedené na konci práce.

V Olomouci, dne

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Mgr. Tomáši Oždianovi, Ph.D., za odborné vedení, věnovaný čas, cenné rady a připomínky. Můj dík patří také celému kolektivu proteomické laboratoře Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci, za ochotu a pomoc při provedení experimentální části v laboratoři.

Obsah

1	Úvod a cíle práce	8
2	Teoretická část	9
2.1	Lidský vlas	9
2.1.1	Struktura vlasu	9
2.1.1.1	Vlasový stvol	10
2.1.1.2	Vlasový folikul	11
2.1.2	Složení vlasu	13
2.1.3	Pigmentace vlasu	14
2.1.4	Druhy vlasů	15
2.2	Vlasy ve forenzní biologii	16
2.2.1	Metody zkoumání trichologického materiálu	17
2.2.2	Proteomika vlasů	17
2.2.2.1	Keratiny	19
2.2.2.2	Proteiny asociované s keratinem (KAPs)	22
2.2.2.3	Proteiny nekeratinových oblastí	23
3	Experimentální část	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Chemikálie	24
3.1.2	Roztoky	24
3.1.3	Biologický materiál	25
3.1.4	Přístroje	26
3.1.5	Software	26
3.2	Metodika	26
3.2.1	Optimalizace zpracování odebraného vzorku vlasu	26
3.2.1.1	Postup 1 (Lee et al. 2006)	26
3.2.1.2	Postup 2: dvoukroková extrakce (Wong et al. 2016)	28
3.2.2	Optimalizace digesce	29
3.2.3	Hmotnostní analýza na Orbitrapu Elite	31

3.2.4	Zpracování výsledků z MS analýzy	32
4	Výsledky	33
4.1	Optimalizace protokolu pro zpracování vlasu a přípravy vzorku pro MS	33
4.1.1	Protokol podle Lee et al. 2006	33
4.1.1.1	Příprava vzorku dle parametrů protokolu.....	33
4.1.1.2	Upravené parametry extrakčního pufru – přidání 8M UA	34
4.1.1.3	Optimalizace sonikátoru	35
4.1.1.4	Úprava množství materiálu a precipitace acetonem.....	35
4.1.1.5	Digesce trypsinem na základě FASP	36
4.1.1.6	Úprava digesce	36
4.1.1.7	Zefektivnění extrakce 6M TUA	37
4.1.2	Protokol podle Wong et al. 2016.....	39
4.2	Vlasy ošetřené peroxidem vodíku	41
4.3	Analýza na hmotnostním spektrometru Orbitrap Elite.....	41
4.3.1	Počet identifikovaných peptidů a proteinů.....	42
4.3.2	Identifikované proteiny	45
4.3.3	Analýza podobnosti vzorků osob	45
5	Diskuze	47
6	Závěr	50
	SEZNAM LITERATURY	51
	SEZNAM ZKRATEK	57
	PŘÍLOHY	58

1 Úvod a cíle práce

Lidský vlas je přes svoji nepatrnou velikost přirozeně velmi pevná a chemicky i mechanicky odolná struktura, to zejména díky transglutaminázovým křížovým vazbám a disulfidickým můstkům v proteinech – keratinech (Fraser et al., 2012; 2014). Díky této vlastnosti vlasy běžně tolik nepodléhají poškození vlivem prostředí a jsou schopny odolávat různým podmínkám. Velká odolnost je však příčinou nedostatečné solubility proteinů při analýze vlasu (Han et al. 2007), která by mohla být využita v mnoha oblastech. Analýza proteinů ve vlasech hraje dnes roli hlavně v oblasti vlasové kosmetiky, dermatologie, ale také v medicíně, kde jsou např. sledovány rozdílně exprimované proteiny ve vlasovém folikulu (Moll et al. 2008; Lee et al. 2015).

Vlas je ale také velmi častou biologickou stopou na místě činu, proto se uvažuje o využití analýzy keratinů ve forenzní neboli kriminalistické biologii a genetice. Tato aplikovaná biologická věda slouží ke zkoumání, analýze a vyhodnocování biologických stop, jejíž hlavním úkolem je identifikace osob (Gunn, 2009).

Na základě proteinového polymorfismu by podle předpokladu mělo být možné sledovat heterogenitu v populaci (Parker et al. 2016). Jednalo by se o kvalitativní, ale i kvantitativní rozdíly v expresi proteinů u jednotlivých profilů osob. Protože je v proteomické analýze jedním z nejdůležitějších kroků příprava vzorku, zabývá se tato diplomová práce optimalizací přípravy vzorku vlasu pro proteomickou analýzu na hmotnostním spektrometru Orbitrap, která by se mohla ve forenzní praxi uplatnit.

Hlavním cílem práce bylo po nastudování odborné literatury sepsat literární rešerši týkající se proteomiky vlasů, sestavit vhodný protokol, vyvinout a experimentálně optimalizovat postup přípravy vzorku pro proteomickou analýzu, zahrnující extrakci proteinů, digesci a provést hmotnostně spektrometrickou (MS) analýzu se statistickým vyhodnocením dat.

2 Teoretická část

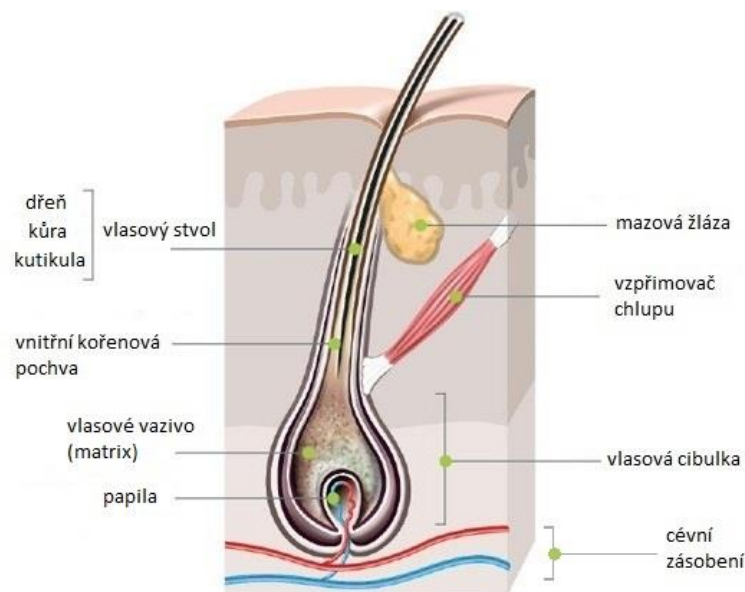
2.1 Lidský vlas

Vlasy a chlupy jsou anatomicky téměř stejné keratizované struktury (Yang et al. 2014), nacházející se de facto po celém těle (vyjma dlaní ruky, chodidel, rtů, posledních článků prstů, prsních bradavek a částí zevních genetálií; Čihák 2002). Vlasy jsou nejdelší chlupy na lidském těle a stejně tak jako kožní žlázy (potní, mazové, mléčné) a nehty se řadí tyto útvary mezi přídatné orgány kůže neboli kožní derivát (Čihák 2002).

Primárními funkcemi chlupů byly u zvířat termoregulace a izolace, ochrana před vnějším prostředím, sociální a senzorické funkce. I když srst u člověka téměř vymizela, zastává ochlupení stále většinu těchto funkcí (Robbins 2012).

2.1.1 Struktura vlasu

Vlas má základní dvě části – část volnou, která vyčnívá nad pokožku, to je tzv. vlasový stvol (*scapus pilli*) a část pod pokožkou, tzv. kořen vlasu (častěji kořínek; *radix pilli*; Shin et al. 2010; Robbins 2012). Terminální částí kořínku je vlasová cibulka (*bulbus pilli*) se zárodečnou matrix (vlasovým vazivem). Do vlasové cibulky z části ze spodiny zasahuje vazivová pochva neboli papila s cévním zásobením a inervací. Součástí celé struktury vlasu také vzpřimovač chlupů (*musculus arrector pilli*) - svazek hladkých svalových buněk, který je připojený k vazivové pochvě a svou kontrakcí napřimuje vlas a ulehčuje vyprázdnění mazové žlázy (Wolfram 2003; Robbins 2012; obr. 1).



Obr. 1 : Schematická struktura lidského vlasu: vlasový bulbus s vlasovými pochvami, cévní a nervové zásobení, vlasový stvol se třemi vrstvami – medula, cortex a kutikula (převzato a upraveno z: <https://www.pantogar.com>).

2.1.1.1 Vlasový stvol

Vlasový stvol je část vlasu vyčnívající nad pokožku a je tvořen třemi vrstvami (Wilson et al. 2005, Robbins 2012; obr. 1).

Vnější šupinatá vrstva, tzv. kutikula (cuticula pili) na povrchu vlasu chrání před vnějším poškozením, a to tvorbou mazu z mazové žlázy, který vlas konzervuje. Je chemicky odolná a poměrně tvrdá, zamezuje opotřebovávání vlasu a průniku vodných roztoků a chemických látek do vlasu. Kutikulu tvoří 5-10 vrstev odumřelých buněk bez pigmentu, které jsou uspořádané souběžně a stříškovitě (Gavazzoni-Dias 2015). V průměru měří asi 45-60 μm , na příčném řezu přibližně 0,5 μm . Buňky kutikuly se překrývají do 1/7 délky, v oblasti cibulky mají cylindrický tvar a jsou kolmé na povrch vlasu (Čihák 2002). Tyto buňky keratizují ze všech buněk nejdříve. Zcela keratinizované buňky se však nacházejí až v horní třetině vlasového folikulu. Keratinizované vlasové buňky mají stejný tvar, jsou ploché a bezjaderné (Moll et al. 2008).

Pod kutikulou lidského vlasu se nachází kůra neboli kortex (substantia corticalis; Gavazzoni-Dias 2015). Skládá se z protáhlých, silně keratinizovaných vřetenovitých buněk a zabírá největší podíl vlasové hmoty, asi 75-80%. Mezi korovými

buňkami se vyskytují dutinky vyplněné vzduchem, tzv. „fusi“. Buňky obsahují difúzně rozložený pigment nebo pigment v podobě shluků, tzv. zrn (Štefan et al. 2012).

Dřeň (medulla pili) je centrální částí vlasu a obvykle se skládá z nekeratinizovaných buněk a to buď pigmentovaných, nebo bez pigmentu. Šířka dřene se u jednotlivých osob liší, nepřekračuje však více než jednu třetinu maximální šířky vlasu. Ve vlasu může být přítomna souvisle, přerušovaně (u tenkých vlasů), jen v určitých úsecích nebo zcela chybí (Yang et al. 2014). Keratin dřene je houbovitého charakteru a obsahuje mnoho dutinek. Jsou-li intercelulární a intracelulární prostory vyplněny vzduchem jeví se dřevný kanál v optickém mikroskopu jako černý. Strukturu dřene lze pozorovat po vytlačení vzduchu vhodným médiem, např. parafinovým olejem. Výskyt meduly ve vlasu a její tvar jsou při identifikaci důležitými znaky.

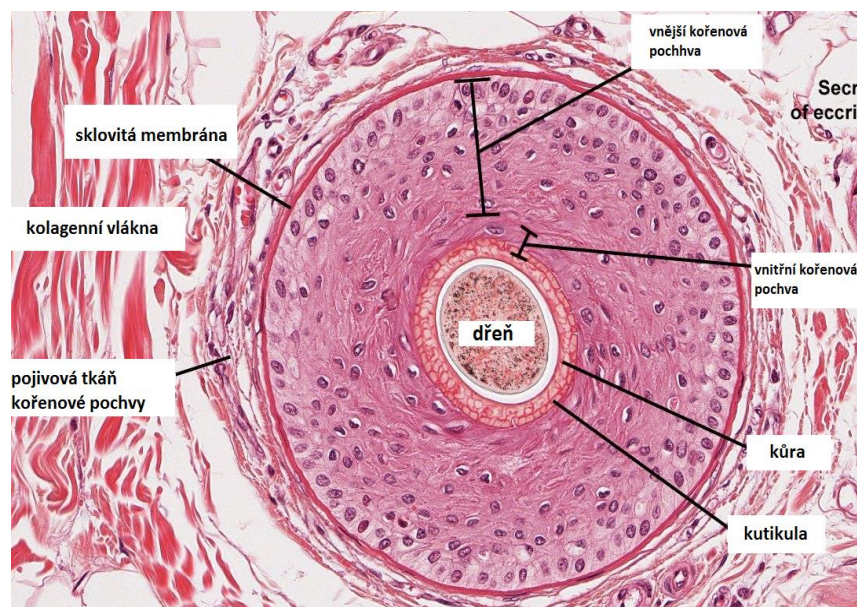
2.1.1.2 Vlasový folikul

Lidský vlas vyrůstá z vlasového folikulu (folliculus pilli) neboli váčku (Robbins 2012). Dospělý člověk má na těle asi 5 milionů těchto vlasových folikulů, z toho na hlavě asi 200 000, přičemž ne všechny folikuly jsou v aktivní formě. Počet a druh vlasových váčků je dán geneticky a pak už se jen vyvíjí (Gaudde 2000).

Vlasový folikul tvoří kořen s cibulkou, který je obalen vlasovými pochvami - zevní, vnitřní epitelová a vazivová pochva (obr. 2). Součástí folikulu jsou také již zmíněné mazové, potní žlázy, cévní zásobenění – kapiláry a nervový systém, dermální papila a vzpřimovač chlupů.

Dermální papila (papilla pili) jako vazivová pochva ústí zdola do vlasové cibulky (Robbins 2012). Je obklopena epitelovými buňkami, od nichž je oddělena sklovitou membránou (obr. 2). Dermální papila je mezenchymální struktura tvořená fibroblasty zapuštěnými ve stromě vaziva, obsahuje také četná nervová zakončení a cévní klinky (Gaudde 2000).

V průběhu růstového cyklu prochází vlasový folikul značnými změnami – viz kapitola růst vlasu. Folikuly všech savců jsou sice totožné, dva zcela stejné folikuly se na lidském těle pravděpodobně nenajdou. Liší se např. v délce a tloušce, ve zvlnění, barvě, tvaru průřezu, citlivosti na hormony, v inervaci, vaskularizaci i relativní době strávené v jednotlivých fázích cyklu (Stenn, Paus 2001).

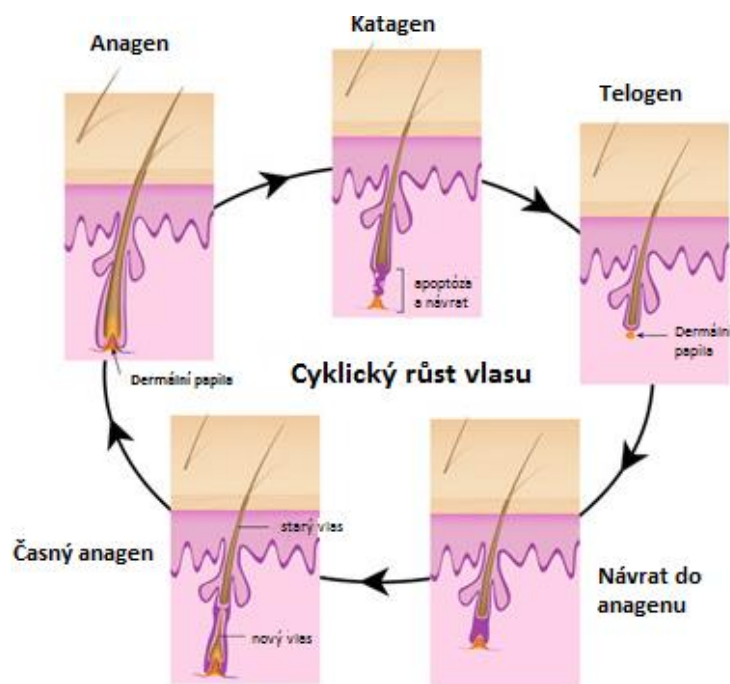


Obr. 2: Příčný řez vlasovým folikulem, mikroskopický snímek s vyznačenými strukturami – dřeň (medulla) tvořící střed vlasu, nad dřeňí je kůra (cortex) a kutikula (cuticle). Dalšími strukturami jsou vnitřní, vnější kořenová pochva a sklovitá membrána (převzato a upraveno z <https://secure.health.utas.edu.au/>).

Růst vlasu

Proces od růstu po vypadnutí vlasu probíhá ve třech cyklicky se opakujících fázích (anagen, katagen a telogen; Robbins 2012). Někdy je uváděna čtvrtá fáze časný anagen, která je de facto terminální fází felogenu (obr. 3). Anagen je fáze, kdy vlas roste a metabolická aktivita cibulky je intenzivní. V této fázi se z celkového množství vlasů jednice vyskytuje asi 85% vlasu. V katagenu dochází ke zpomalení metabolické aktivity folikulu. Jedná se o přechodnou fázi, trvající přibližně dva týdny. Vlasy, které byly vytrhnuty v anagenu nebo v katagenu mají obalené kořínky epiteliálními pochvami nebo jejich fragmenty (Yang et al. 2014). V telogenní fázi vlas již neroste a je připraven k vypadnutí. Takový vlas pak charakterizuje kořínek bez zbytků epiteliálních pochev.

Znalost těchto jednotlivých fází je důležitá např. při vyšetřování a to z hlediska rozlišování způsobu excize vlasu (vytržení, vypadnutí, vyčesání) a také z důvodu výběru vhodného kořínku k dalším analýzám. Pro izolaci jaderné DNA (nuDNA) se využívají kořínky ve fázi anagenu a katagenu (Kligman, 1959).



Obr. 3: Fáze růstového cyklu vlasu – časný anagen, anagen, katagen, telogen, návrat do fáze anagen (Převzato z: www.hairtsc.com/en/Hair-Growth-Cycle.html a upraveno podle Robbins 2012).

2.1.2 Složení vlasu

Z převážné části (65-95 %) jsou vlasy tvořeny proteiny, zejména skleroproteiny keratiny (Barthlémy et al., 2011; Robbins 2012; Yang et al., 2014). Vedle struktur složených z keratinu existují ve vlasech i tzv. nekeratinové oblasti (epikutikula a komplex buněčných membrán). Asi 50 % všech proteinů tvoří amorfní (neuspořádané) proteiny a 50 % helikální (šroubovité) proteiny. Ve vlasu najdeme 20 různých druhů aminokyselin, jejichž skládáním vznikají právě proteiny (Gupta 2014).

Dále jsou z chemického hlediska ve vlasu obsaženy stopové prvky jako železo, měď, zinek a jód (Cruz et al. 2016). Zastoupení jednotlivých stopových prvků je do značné míry variabilní, výrazně se liší mezi vlasy v jedné oblasti, mění se i po délce, od kořene ke konečku, vlasového stvolu. Jejich obsah také závisí na růstové fázi, ve které se vlas nachází (Gaudette, 2000).

Vlas obsahuje také lipidy – např. cholesterol. Vlasové lipidy lze rozdělit na povrchové a vnitřní, které dále dělíme na lipidy volné a lipidy strukturní. Většina extrahovatelných lipidů jsou lipidy volné, které jsou do vlasů inkorporovanými

produkty mazových žláz. Strukturní lipidy jsou převážně součástí komplexu buněčných membrán (Jolles, Zahn 1995; Robbins 2012).

Voda tvoří asi 12 % hmotnosti vlasu a její množství ovlivňuje jejich fyzikální vlastnosti. Resorpci vody umožňují peptidické vazby a polární postraní řetězce bílkovin (Cruz et al. 2016).

2.1.3 Pigmentace vlasu

Barva vlasů je primárně dána množstvím pigmentu v kůře, tzn. rozptýlenými pigmentovými granulemi melaninu. Pigment vzniká činností melanocytů v bazální části vlasové cibulky. Zbarvení vlasu může být, ale také ovlivněno mimo pigmenty dutinkami v kutikule a průsvitností vlasu (Grosvenor et al. 2016).

Při mikroskopickém pozorování můžeme vidět pouze černá, hnědá a žlutá pigmentová granula. Tmavé vlasy jsou tvořeny pigmentem eumelaninem, což jsou zpravidla kulatá, homogenní zrna. Pigmenty blond vlasů jsou nazývány feomelaniny, jsou to světlejší formy melaninu. Zrna mají elipsovité tvar a jsou menší než zrna tmavého pigmentu. Tyto pigmenty se nacházejí i ve tmavších odstínech, avšak v kombinaci s eumelaninem. Červená barva vlasu je dána pigmentem erytromelaninem, který obsahuje železo a vyskytuje se u zrzavých vlasů. Velikost a tvar pigmentových granulí, stejně tak jako jejich hustota a rozmístění po délce vlasu se však mezi jednotlivci liší (Katz 2005).

Barvu vlasu lze klasifikovat spektrofotometricky nebo zrakem, srovnáním s barevným vzorníkem (Michalíková 2002). Často v antropologii a soudním lékařství používanou vzorkovnicí je Fischer-Sallerova (Deedrick et al. 2000; 2004). V této diplomové práci byla charakteristika barvy provedena na základě jednoduššího tzv. mezinárodního kódu pro barvu vlasů (International Colour Code, ICC). Tento systém je tvořen dvěma stupnicemi od 1 do 10. První vyjadřuje hloubku barvy, tedy jak moc je vlas světlý nebo tmavý, což je dáno množstvím proteinu melaninu a druhá stupnice vyjadřuje podtón barvy, který je dán pheomelaninem (obr. 4).

Hair Depth and ICC Number	Undertone
10 - Lightest Blonde	
9 - Very Light Blonde	
8 - Light Blonde	
7 - Medium Blonde	
6 - Dark Blonde	
5 - Light Brown	
4 - Medium Brown	
3 - Dark Brown	
2 - Darkest Brown	
1 - Black	










Obr. 4: Stupnice barvy vlasu podle mezinárodního kódu ICC. První sloupec vyjadřuje hloubku barvy, od nejtmaší (černé) – 1, po nejsvětější (blond) – 10. Druhý sloupec znázorňuje podtón barvy (10-světle žlutá, 9-žlutá, 8-žlutozlatá, 7-zlatá, 6 - oranžovozlatá, 5-oranžová, 4-červenooranžová, 3-červená, 2-červenohnědá, 1 –hnědá; převzato a upraveno z: <https://www.pantogar.com>).

2.1.4 Druhy vlasů

Variabilitu vlasů můžeme shledávat jak mezi jednotlivci, tak mezi jednotlivými etniky. Rozeznáváme tři typy vlasů podle etnika a to asijské, evropské a africké vlasy (Franbourg 2003; Cruz et al. 2016), přičemž každý profil má vlastní charakteristické znaky – tvar vlasu, hustotu, míru odolnosti, maximální délku, obsah aminokyselin atd. (obr. 5).

Asijské vlasy jsou obvykle rovné, tmavě hnědé až černé barvy, rostou kolmo na pokožku hlavy rychlostí 1,4 cm/měsíc, tedy nejrychleji ze všech typů, ale jsou nejřidší. Evropské vlasy mohou být rovné, vlnité nebo kudrnaté, jejich barva může být od blond po tmavě hnědou, tento typ vlasů roste rychlostí asi 1,2 cm/měsíc a jejich hustota je největší ze všech tří typů. Africké vlasy jsou nejčastěji černé barvy, jsou charakterizovány pevnými kadeřemi stočenými do spirál po celé délce vlasu, tento typ vlasů však roste nejpomaleji 0,9 cm/měsíc (Cruz 2016).

Vlasy se také mění během vývoje organismu, stejný folikul vytváří postupně pod hormonálním vlivem různé typy vlasů. Na lidském těle se v průběhu života nacházejí čtyři druhy chlupů - primordiální, lanugo, vellus a terminální chlupy (Robbins 2012).

Charakteristika	Asijské (mongoloidní)	Evropské (bělošské)	Africké (negroidní)
Tvar vlasu	rovné  lehce zvlněné 	lehce zvlněné  vlnité 	kudrnaté  spirálovité 
Maximální délka	100 - 150 cm	60 - 100 cm	15 - 30 cm
Průměrná hustota	175 g / cm ²	330 g / cm ²	295 g / cm ²
Odolnost tahu (zátěže)	60 - 65 g	40 - 45 g	30 - 35 g
Příčný řez vlasem	kulatý 	oválný 	plochý 
Cystin (μm/g)	1175 - 1357	1268 - 1608	1310 - 1420
Rezistence při napínání	rezistentní	+/- rezistentní	křehké (lehce lámavé)

Obr. 5: Typologie vlasů dle etnika a jejich charakteristické rysy (Franbourg et al. 2003).

2.2 Vlasy ve forenzní biologii

Nejběžnějšími biologickými vzorky nacházené na místě činu, kromě dotekových stop a tělních tekutin, jsou chlupy a vlasy – tzv. trichologický materiál (Štefan et al. 2012). Forenzní genetika se zabývá zkoumáním těchto biologických stop za účelem zjištění původce. Pomocí forenzních metod je možné ze zajištěných biologických vzorků stanovit profil osoby, porovnáním s referenčním vzorkem pak lze potvrdit nebo vyvrátit identitu dané osoby. Existuje celá řada analytických metod, které se používají v kriminalistice při identifikaci (Rice et al. 2015).

Metody forenzní biologie umožňují identifikaci osob nejčastěji pomocí analýzy DNA různých biologických materiálů, a to na základě genetického polymorfismu. Molekula DNA se nachází ve všech živých buňkách (kromě dospělé červené krvinky), proto je možné analýzu provést z každého typu lidské tkáně - z kostí, nehtů, kůže atd. DNA metody však nesou řadu nevýhod, jelikož molekula DNA vykazuje malou stabilitu v prostředí, je snadno degradována atd. (Parker et al. 2016).

2.2.1 Metody zkoumání trichologického materiálu

Ve forenzní praxi se v rámci trichologického zkoumání nejčastěji používají metody makroskopické, mikroskopické, genetické, sérologické vyšetření a chemická analýza (Štefan et al. 2012).

Makroskopicky se trichologický materiál zkoumá pod stereolupou a zjišťuje se, zda není znečištěn biologickým materiálem, organickými nebo anorganickými látkami. Povrchové nečistoty jsou následně chemicky analyzovány a vzorky převedeny do mikroskopických preparátů.

Pomocí mikroskopické analýzy lze určit typ a původ materiálu (vlasy, lidské nebo zvířecí chlupy, rostlinná vlákna atd.) vyhodnocením mikromorfologických znaků (Thibaut 2007).

Kořínky vlasu s epiteliálními pochvami, které jsou zdrojem jaderné DNA (nuDNA), jsou nejčastěji předávány pro genetické zkoumání. nuDNA slouží k individuální identifikaci jedince. Mitochondriální DNA (mtDNA), získávaná z vlasového stvolu, se používá ke zjištění skupinové shody (Wilson et al. 1995).

Před samotným mikroskopováním se trichologický materiál musí zbavit nečistot vhodným detergentem. Následně se materiál odmastí (např. směsí acetonu a etheru), vysuší a makroskopicky posoudí. Elektronovým rastrovacím mikroskopem se vyšetřuje kutikula, vnitřní struktura pak optickým mikroskopem, což umožňuje detekovat poškození vlasu, patologické změny a anomálie (Taupin 2004).

Analýza vlasů pomocí mikroskopického vyšetření je sice rychlá a poměrně jednoduchá, ale nedostatečná pro forenzní praxi – porovnání morfologických odlišností vyžaduje velké zvětšení, při kterém můžeme pozorovat pouze malý úsek stvolu a hloubka ostrosti je menší než průměr vlasu (Bisbing 2000). Proto se tyto techniky doplňují dalšími metodami, jako jsou např. sekvenování mitochondriální DNA, PCR atd.

2.2.2 Proteomika vlasů

Proteiny tvoří základ prakticky všech buněčných struktur a vykonávají důležité funkce (Kovářová, 2005). Pojmem „proteom“ se rozumí všechny proteiny, které jsou produkovány z genomu daného organismu. Proteomika představuje analýzu proteinů ve

velkém měřítku, především jejich struktury, funkce a exprese. Podrobnější rešerše o proteomice viz bakalářská práce Validace diferenčně exprimovaných proteinů u buněčné linie CCRFM ošetřené oxaliplatinou (Kalábová, 2014).

Za nejspolehlivější nástroj vyšetřování a identifikace trichologického materiálu byla považována analýza DNA (Linch et al. 2001). Využívá se přitom skutečnosti, že každý jedinec má jedinečnou kombinaci genů (jejich alel) – tzv. genetický polymorfismus. DNA metody se však potýkají s řadou komplikací, které mohou za zkreslené nebo nedostatečné výsledky. Pro izolaci DNA je nutné mít k dispozici vlas s epitelovou pochvou kořene, ve které se nachází nuDNA, často jsou však nacházeny vlasy v telogenní fázi – tzn. bez zbytků epiteliálních pochev, nebo i bez kořene. Dalším omezením je, že DNA snadněji degraduje v prostředí a zároveň jsou tyto metody závislé na přítomnosti DNA templátu v dostatečném množství amplifikovaných pomocí PCR.

Proteiny jsou chemicky více stabilní a abundantnější než DNA (Parker et al. 2016). Vykazují také genetický polymorfismus, a to ve formě polymorfismů jednotlivých aminokyselin (single amino acid polymorphism; SAPs), které vycházejí z nesynonymních jednonukleotidových polymorfismů (nsSNPs; Strnad et al., 2011)

Hmotnostní spektrometrie (MS), jedna ze základních metod proteomiky, umožňuje identifikovat mnoho bílkovin ve složitých strukturách (Kalábová, 2014). Konkrétně u trichologického materiálu umožňuje MS individualizovat vzorek vlasu keratinových proteinů, bez nutnosti vlasové cibulky. Geneticky variabilní peptidy, obsahující SAP, mohou být identifikovány pomocí shotgun proteomiky. Identifikace těchto peptidů umožňuje přečtení nsSNPs alel v individuálním genomu bez ohledu na přítomnost DNA templátu ve vzorku (Parker et al. 2016).

Proteomické přístupy identifikace nejsou běžně používané ve forenzní praxi, protože zpracování materiálu je provázáno některými komplikacemi – zejména nedostatečnou rozpustností vlasových bílkovin způsobenou transglutominázovou křížovou vazbou a disulfidickými můstky, díky kterým je vlas v prostředí velmi odolnou strukturou, posttranslačními modifikacemi, atd. (Rice, 2011). I přes dobré fyzikální vlastnosti není vlas bohatým zdrojem pro nuDNA, zejména kvůli apoptóze keratinocytů během biogeneze, následnému „zvětrávání“ během života a biologických a environmentálních procesům post mortem. Bez ohledu na stav zbytkové

jaderné nebo mitochondriální DNA si vlasy zachovávají vysoký obsah bílkovin. Ve vlasovém proteomu bylo detekováno více než 300 proteinů (Parker et al. 2016).

Podle studie Laatsche et al. lze pomocí proteomické analýzy vlasů, na základě rozdílných profilů, rozlišit různé etnické skupiny a vlasy a chlupy z různých anatomických částí těla. Rozdíly mezi etnickými skupinami byly v jeho studii méně výrazné, jednalo se zejména o proteiny asociované s keratinem (keratin-associated proteins, KAPs). Největší rozdíly byly nalezeny mezi různými druhy chlupů. Dále pak profil izolovaných buněk vlasové kutikuly byl odlišný od celkového vlasu na úrovni více než 20 proteinů – prominentích keratinů (Laatsch et al. 2014).

2.2.2.1 Keratiny

Pojem „keratin“ se dříve používal pro všechny proteiny extrahované z kůže a kožních modifikací, jako jsou vlasy a nehty u člověka, ale i drápy a rohy u zvířat. Následně bylo zjištěno, že tento extrahovaný protein je směsí keratinu, KAPs a dalších proteinů (Plowman 2007). Keratiny byly pak definovány jako proteiny tvořící vlákna se specifickými fyzikálně-chemickými vlastnostmi extrahované ze zrohovatělé vrstvy pokožky, zatímco proteiny získané z živé vrstvy epidermis byly definovány jako prekeratiny neboli cytokeratiny (Bragulla, Homberger 2009). Pojem „cytokeratin“ je užíván od 70. let, kdy byly tyto proteiny poprvé popsány Franke et al., v roce 2006 byla vytvořena systematická klasifikace (Schweizer et al. 2006).

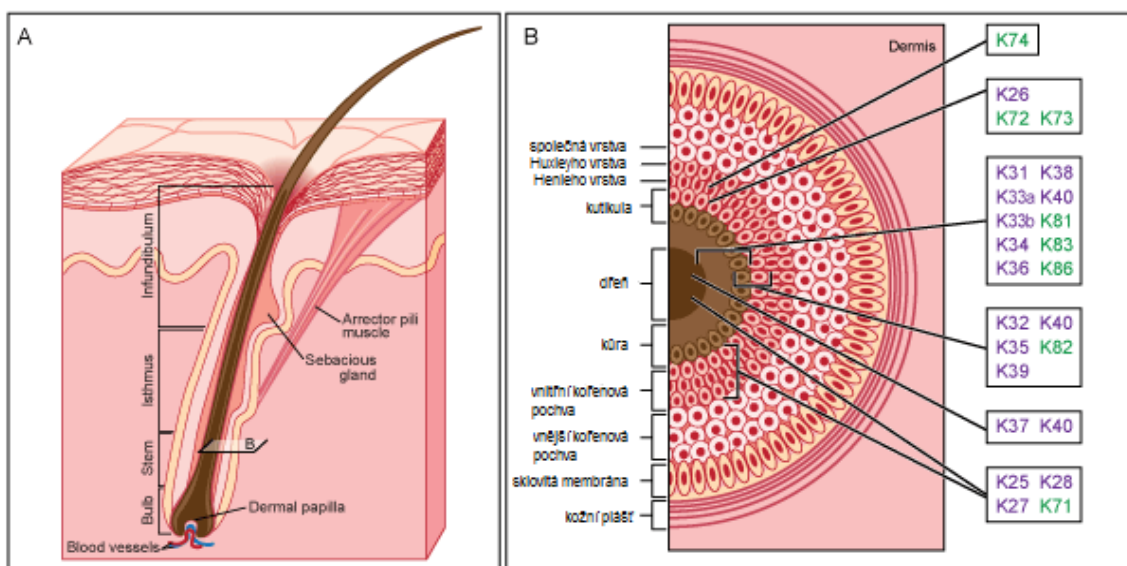
Keratiny jsou řazeny mezi skleroproteiny a obecně jsou to nerozpustné vláknité strukturální proteiny, které patří do superrodiny intracelulárních intermediálních filament (IF; Lange et al. 2016). Rozdělují se na dva typy, a to typ I. kyselé, které jsou menší (K9–K23, Ha1–Ha8, Irs1-4) a typ II. neutrální až bazické proteiny, které mají větší velikost (K1–K8, Hb1–Hb6, K6irs1–4). V závislosti na této klasifikaci, genové struktuře a schopnosti vytvářet heterodimery s ostatními typy můžeme rozlišit pokožkové neboli epidermální cytokeratiny, vlasové keratiny a folikulově specifické vlasové keratiny (Shimomura et al. 2005; Lange et al. 2016).

Člověk má 54 genů, kódujících keratiny. Proteinová rodina keratinů se tedy skládá ze dvou sad s 54 členy, z nichž 28 je typu I. a 26 typu II. Z celkového počtu 28 kyselých proteinů je 17 epitelových a 11 vlasových keratinů. Podobně u skupiny II. je keratinů 20 epitelových a 6 vlasových (Schweizer et al. 2007).

Ve většině epitelů se vyskytují tzv. měkké cytokeratiny, v kožních derivátech (vlasy a nehty) se vyskytují tzv. tvrdé keratiny. Ve vlasu tvoří tyto proteiny vnější ochrannou kutikulu a poskytují tvar, pevnost a integritu vlasového vlákna. Díky své odolnosti vůči proteolýze jsou tak vlasy nejtrvanlivější struktury lidského těla, které mohou být za určitých okolností uchovány stovky i tisíce let (Honda et al. 2012).

Keratinizace vlasu

Vznik „tvrdých“ keratinů v kožních modifikacích, jako jsou nehty a vlasy, se vyznačuje intenzivní tvorbou aminokyselin cysteinu a metioninu s vysokým obsahem síry (Zahn et al. 2002). Zvýšený obsah cysteinu v předních i zadních částech globulárních domén je proto charakteristický pro „tvrdé“ keratiny savců, tedy α -keratiny (Lange et al. 2016). Proces keratinizace vlasu začíná ve vlasovém folikulu se specifickými vzory exprese v různých epiteliálních vrstvách (obr. 6).



Obr. 6: Schematické znázornění exprese keratinů ve vlasovém folikulu. A – plně vyvinutý folikul, B – průřez vlasového folikulu. Na obrázku je uvedeno, které proteiny se exprimují v jednotlivých částech vlasového folikulu. Keratiny typu I. jsou zobrazeny fialově, keratiny typu II. jsou zobrazeny zeleně. K25, K27, K28 a K71 jsou vytvářeny ve všech třech vrstvách vnitřní kořenové pochvy, dále i ve dřevě vlasu společně s K37 a K40. K26, K72, K73 jsou exprimovány pouze v kutikule, zatímco K74 je vytvořen pouze v Henleho vrstvě (převzato a upraveno z Du et al. 2016).

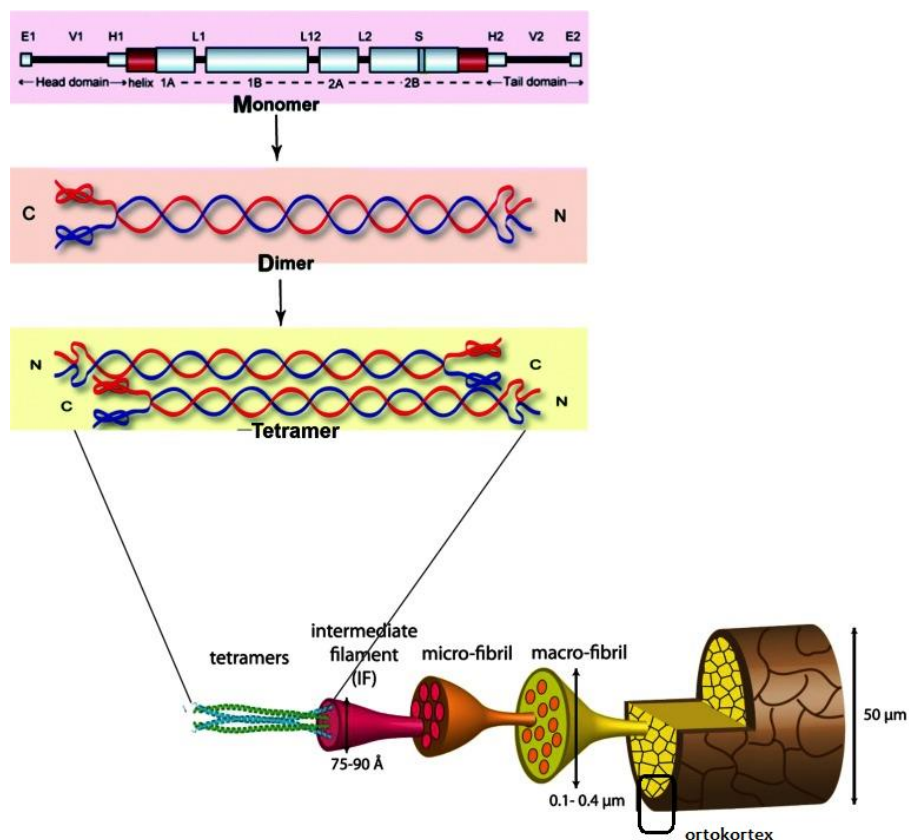
V kůře vlasu se nachází tzv. keratinový komplex, který se skládá z paralelně uspořádaných fibril a z amorfního materiálu základní hmoty (Barthélemy et al. 2012).

Monomery keratinů jsou tvořené asi 500 aminokyselinami, ty se dostávají k folikulárním buňkám z krevního oběhu aktivními transportními mechanismy. Monomery se skládají v dimery.

Dimery keratinů nejsou tvořeny dvěma stejnými řetězci. Jeden řetězec je kyselého charakteru, druhý zásaditého, proto je vznikající dimer označován jako heterodimer. Typ I. a II. tedy tvoří stočenou šroubovici, tzv. heterodimery prostřednictvím interakce jejich α -helikálních domén (Lupas et al., 2005).

Dva dimery se shromažďují a tvoří tetrametry, následně dva tetrametry tvoří oktamer a čtyři oktamery se spojí opět dohromady a tvoří válcové dlouhé vlákno (unit length filament, ULF). Spojené koncové vazby ULF a proces dotváření umožňují vznik zralých intermediálních filament (IF) s průměrem 10 nm, které plní díky silným kovalentním vazbám mechanické funkce, ale také biologické a signalizační. IF tvoří základní stavební jednotku kůry – mikrofibrilu.

Mikrofibrily se seskupují do kruhu, tvoří snopečky a vytvářejí tak další ohraničenou jednotku – makrofibrilu (Zahn et al., 2002). Celá struktura poskládaná z jednotlivých fibril se nazývá ortokortex a jedná se o část vlasové kůry s pravidelným uspořádáním (obr. 7; Lange et al. 2016).



Obr. 7: Hierarchická struktura vlasu na bázi primární struktury proteinů: Délka jednotlivých monomerů keratinů je asi 400–644 AMK, ty se světví do polymerů o velkých rozměrech. Konečný tvar molekuly – tzv. terciální struktura je zajišťena disulfidickými můstky (převzato a upraveno z Lange et al. 2016)

2.2.2.2 Proteiny asociované s keratinem (KAPs)

Proteiny asociované s keratinem jsou nevláknité proteiny, které tvoří hlavní složku vlasového vlákna. Tyto proteiny hrají důležitou roli při vytváření silného vlasového stvolu prostřednictvím zesíťování s keratinovými intermediálními filamenty (KIF), které jsou produkovány vlasovými keratiny. Doposud bylo charakterizováno pět skupin lidských genů KAP, což vede k identifikaci více než 80 individuálních lidských genů KAP (Barthélemy et al. 2012).

In situ hybridizační studie prokázaly sekvenční i prostorové expresní vzory těchto KAPs členů v rozdílných částech kortexu a kutikuly vlasového vlákna. Některé lidské KAPs geny mají velikostní polymorfismy, které jsou především z důvodu rozdílných počtu opakujících se segmentů bohatých na cystein a vzory těchto

velikostích variant se liší mezi jednotlivými lidskými populacemi (Laatsche et al. 2014).

Na základně aminokyselinového složení KAPs byly tyto proteiny rozděleny do 3 skupin. První skupina byla s vysokým obsahem síry (<30 mol% obsah cysteinu), druhá s extrémně vysokým obsahem síry (> 30 mol% obsah cysteinu), třetí skupiny byla s vysokým obsahem glycinu/tyrosinu.

Přestože bylo identifikováno několik KAPs, jejich nomenklatura byla stále velkým problémem. Rogers a Powell (1993) navrhli jednotnou nomenklaturu pro KAPs, kde jsou tyto proteiny rozděleny do rodin na základě jejich sekvenční homologie a povahy opakujících se struktur. Každý protein dostal jméno ve tvaru "KRTAPm-n", "KAPm-n"; "m" označuje rodinu a "n" se týká identifikačního čísla komponentu. Aktualitace byla provedena v roce 2012, která neznamenal změny v systému nomenklatury, ale byly doplněny některé informace (Gong et al. 2006). Dnes je více než 100 KAPs izolováno z ovce, myši, potkana, králíka a také člověka, a rozděleno do celkem 23 rodin., z nichž rodiny 1-3, 10-16 a 23 patří ke skupině s vysokým obsahem síry, rodiny 4, 5, 9 a 17 se řadí do skupiny s extrémně vysokým obsahem síry a rodiny 6-8 a 18-22 jsou skupinami s vysokým obsahem glycinu /tyrosinu (Rogers et al., 2006).

2.2.2.3 Proteiny nekeratinových oblastí

Kromě keratinů a KAPs jsou ve vlasech zastoupeny i proteiny, u kterých nedochází ke keratinizaci, jedná se o tzv. proteiny nekeratinových oblastí (non-keratins regions proteins; NKPs). NKPs jsou součástí komplexu buněčných membrán a epikutikuly společně s endokutikulou. Komplex buněčných membrán je důležitá struktura, která se skládá z buněčných membrán a adhezivních látek spojujících kutikulu a buňky kůry dohromady. Epikutikula je velmi tenká membrána (60 nm), kryjící povrch kutikuly a obsahující velké množství cystinu. Tyto oblasti kutikuly jsou velmi zranitelné části vlasu, podléhající zejména chemickému poškození, jako je trvalá ondulace a barvení, ale i např. česání (Robbins 2012). Stejně tak jako keratiny krají NKPs důležitou roli při tvorbě buněčných struktur, zajišťují mechanickou pevnost a jsou také zodpovědné za různé buněčné procesy. Jedná se především o proteiny IF – desmozomy, tubuliny atd.

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Deionizovaná voda pro MS; hydrogenfosforečnan disodný dihydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); dodecylsírán sodný (SDS, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$); dithiothreitol (DTT, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$); močovina (UA, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$); thiomočovina (TUA, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$); uhličitan amonný (NH_4HCO_3); jodacetamid (IAA, $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$); tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$); kyselina chlorovodíková (HCl); kyselina octová (AA, CH_3COOH); aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$); kyselina triflouroctová (TFA, $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$); kyselina mravenčí (FA, CH_2O_2); acetonitril (ACN); ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$); methanol (CH_3OH); hydroxid sodný (NaOH); beta-merkaptóetanol ($\beta\text{-ME}$, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$); ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$); detergent CHAPS ($\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$); amfolity; glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$); Trypsin; Lysin C

3.1.2 Roztoky

- 0,1M fosfátový pufr (pH 7,8): 45,75 ml roztoku A (3,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml dH_2O); 4,25 ml roztoku B (2,7g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml dH_2O); 50 ml dH_2O
- Promývací pufr: 2% SDS. 0,1M fosfátový pufr (pH 7,8)
- Extrakční pufr 1: 2% SDS; 0,1M fosfátový pufr (pH 7,8); 25 mM DTT
- Extrakční pufr 2: 2% SDS; 0,1M fosfátový pufr (pH 7,8; 25 mM DTT); 8M UA
- Extrakční pufr 3: 2% SDS; 0,1M fosfátový pufr, pH 7,8; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA
- 0,1M Tris/HCl (pH 8,5)
- 8M UA: 8M UA; 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)
- ABC: 0,05M NH_4HCO_3 ; dH_2O
- IAA: 0,05M $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$; 8M UA
- Pufr A: 0,5% AA

- Pufr B: 80% aceton; 0,5% AA
- Rozpuštěcí pufr: 2% aceton; 0,1% TFA
- Lyzační pufr: 0,2M NaOH; 1% SDS; 2%β-ME; 0,01M EDTA
- Vzorový pufr: 8M UA; 2M TUA; 4% CHAPS; 2% amfolyt; 5% glycerol
- BSA protein assay standard (Thermo Scientific, USA)
- BCA protein assay reagent (Thermo Scientific, USA)
- Bradford assay kit (Thermo Scientific, USA)

3.1.3 Biologický materiál

Pro přípravu vzorků byly využity vlasy předem vybraných osob známého původu. Z každého vlasu byla předem skalpelem uříznuta vlasová cibulka a nadále se pracovalo jen s vlasovým stvolem. Každá osoba byla charakterizována pohlavím, věkem, bylo zjištěno, jestli jsou vlasy ošetřené barvou a na základě ICC (obr. 4) byla určena barva (tab. 1)

Tab. 1: Tabulka použitých vzorků vlasů jednotlivých osob v experimentech a jejich charakteristika. Podle stupnice barvy vlasu na základě ICC byla zrakem charakterizována aktuální barva vlasu. Kód tvoří dvě čísla, z nichž první značí hloubku barvy od nejtmaší (1) po nejsvětější (10); druhé číslo odpovídá podtónu barvy od hnědé (1) po světle žlutou (10).

vzorek	pohlaví	věk	barvení	ICC
T	muž	32	nebarvené	6; 4
J	žena	28	barvené	4; 5
P	žena	24	barvené	3; 2
K	žena	25	barvené	8; 9
E	žena	24	nebarvené	7; 8
V	žena	22	barvené	6; 7
B	žena	31	nebarvené	5; 4
L	žena	27	barvené	4; 3
Z	žena	28	nebarvené	4; 6
Mj	žena	26	nebarvené	4; 3
Jp	žena	29	nebarvené	5; 4
R	žena	47	barvené	6; 6

3.1.4 Přístroje

- centrifugační filtrační mikrozkuřavky Microcon YM-30 (Millipore, Francie);
- spektrofotometr PerkinElmer Envision (PerkinElmer, USA);
- sonikátor Branson Digital Sonifier 450 (Emerson Industrial Automation, USA);
- centrifuga eppendorf (Eppendorf, Německo);
- Milli-Q Direct Systém (Millipore, Francie);
- termomixer comfort (Eppendorf, Německo);
- MS inkubátor (Biotech);
- Vakuová odparka Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo)

3.1.5 Software

EnVision Manager verze 1.13.3009.1401 (PerkinElmer, USA); Perseus verze 1.4.0.6 (Max Plank Institute of Biochemistry 2012, Německo), MS Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA), Venn diagram plotter 1.5; MaxQuant verze 1.4.1.2 (Max Plank Institute of Biochemistry 2012, Německo)

3.2 Metodika

3.2.1 Optimalizace zpracování odebraného vzorku vlasu

Pro zpracování vzorku vlasu a jeho homogenizaci bylo navrženo několik přístupů, z nichž se vybral ten nejefektivnější.

Do předem zvážené mikrozkuřavky bylo odebráno určené množství vlasů (40, 12 a 5) mg vlasů, u kterých byla skalpelem uříznuta vlasová cibulka.

3.2.1.1 Postup 1 (Lee et al. 2006)

- Vzorky vlasů byly jednou krátce propláchnuty v příslušném množství promývacího pufru (tab. 2) a vysušeny ve vakuové odparce po dobu 10 minut.

Tab. 2: Příslušná množství pufřů pro přípravy vzorku a množství alkoholu pro vysrážení proteinů využitých v experimentu, která odpovídají množství vlasů

množství vlasů (mg)	promývací pufř (ml)	extrakční pufř (ml)	precipitace (etanol nebo aceton; ml)
40	5	5	10
12	1.5	1.5	3
5	0.7	0.7	1200

Extrakce proteinů:

Pro extrakci proteinů byly navrženy různé postupy, přičemž se po stanovení koncentrace vybral ten nejefektivnější.

U prvního přístupu bylo ke vzorkům přidáno příslušné množství extrakčního pufřu 1 nebo 2 (tab. 2) a vzorky byly inkubovány při 65 °C 2 hodiny nebo přes noc. Další den byl materiál homogenizován pomocí ultrazvukového sonikátoru 1-2 minuty při amplitudě 20% (puls-on 0,5 s; puls-of 0,5 s). Po rozmělnění byly vzorky centrifugovány 15 min při 12 000 g a supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky.

Optimalizace precipitace proteinů:

K supernatantu bylo přidáno příslušné množství etanolu nebo acetonu (tab. 2), obsah byl protřepán a centrifugován po dobu 15 min při 12 000 g. Supernatant byl odebrán a pelet vysušen ve vakuové odparce po dobu 15 minut. Ten samý postup byl proveden s acetonem.

Měření obsahu proteinů pomocí BCA assay:

- Vysušené vzorky byly rozpuštěny v 500 µl 8 M močoviny a inkubovány v termobloku při 80 °C a 600 rpm 30 minut. Vzorky byly před měřením naředěny na koncentraci močoviny, která neinterferuje při BCA, a to na 2 M. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla měřena pomocí kitu BCA assay. Na 96-ti jamkovou destičku bylo napipetováno vždy 10 µl BCA standarů, 10 µl blanku (H₂O pro MS), 10 µl pufřu (2 M močovina) a 10 µl vzorku rozpuštěných v daném pufřu. Do všech jamek bylo následně napipetováno 200 µl roztoku pro BCA assay. Destička byla inkubována 30 minut při 37 °C.

- Z naměřených hodnot byl v programu Excel vypočítán průměr, vytvořena kalibrační přímka a z rovnice lineární regrese vypočtena koncentrace proteinů. Následovalo štěpení proteinů na základě přípravy vzorku pomocí filtru (FASP, Filter-Aided Sample Preparation) nebo in solution štěpení s proteázami Lysin C a Trypsinem. Následně byly vzorky přečištěny pomocí „Stage Tips“ a připraveny pro analýzu na hmotnostním spektrometru (viz dále - optimalizace digesce)
- U dalšího navrženého přístupu bylo ke vzorkům přidáno příslušné množství extrakčního pufru 3 a vzorky byly inkubovány při 65 °C přes noc. Další den byl materiál homogenizován pomocí ultrazvukového sonikátoru 2 minuty při amplitudě 20 %. Po rozmělnění byly vzorky centrifugovány 15 min při 12 000 g a 200 µl supernatantu bylo přeneseno na filtr Microcon YM-30 ve filtrační mikrozkuhavce a byla provedena digesce proteinů jako u předchozího přístupu.

3.2.1.2 Postup 2: dvoukroková extrakce (Wong et al. 2016)

Extrakce proteinů:

Vzorky vlasů byly inkubovány ve 300 µl lyzačního pufru po dobu 30 minut při 90 °C. Následně byla směs centrifugována při 14 000 g po dobu 5 minut. Po oddělení nerozpustných frakcí se extrakt přenesl do nové mikrozkuhavky a uschoval do chladničky se 4 °C. Ke zbývajícím peletě se přidalo opět 300 µl lyzačního pufru a směs se nechala inkubovat při pokojové teplotě 30 minut. Následně byly vzorky homogenizovány pomocí ultrazvukového sonikátoru po dobu 1 minuty při amplitudě 20%. Vzorky byly opět centrifugovány po dobu 5 minut při 14 000 g. Supernatant byl odebrán do nové mikrozkuhavky.

Precipitace proteinů:

Vzorek proteinů byl následně pročištěn a vysrážen smícháním 1 objemu supernatantu se 4 objemy předem vychlazeného acetonu. Směs byla protřepána a centrifugována po dobu 5 minut při 12 000 g. Po oddělení supernatantu byly vysrážené proteiny na dně zkuhavky rozpuštěny v 500 µl vzorkového pufru při

65 °C. Množství proteinů v každém vzorku bylo měřeno Bradfordovou metodou při 595 nm.

Měření obsahu proteinů pomocí Bradford assay:

Do 96-ti jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 2 µl BCA standarů, 2 µl blanku (H₂O pro MS), 2 µl pufru (2 M močovina) a 2 µl vzorku rozpuštěných ve vzorkovém pufru (pozice viz Měření obsahu proteinů pomocí BCA assay). Do všech jamek bylo následně napipetováno 100 µl roztoku pro Bradford assay a promícháno. Destička byla inkubovaná při pokojové teplotě 5 minut. Pomocí spektrofotometru byla měřena absorbance při 595 nm. Z naměřených hodnot byl v programu Excel vypočítán průměr, vytvořena kalibrační přímka a z rovnice lineární regrese vypočtena koncentrace proteinů a přepočítána na objem vzorku.

3.2.2 Optimalizace digesce

Pro digesti proteinů před MS analýzou byly navrženy 2 postupy: in solution digesce s následným přečištěním a digesce na základě FASP, kdy u obou metod byla různá délka inkubace s proteázami Lysinem C a Trypsinem. Z navržených postupů se po zhodnocení výsledků nakonec vybral nejvhodnější. Pokud je v protokolu psáno přes noc (o/n), délka inkubace odpovídá 18 hod.

In solution digesce

- Do mikrozkušavek bylo napipetováno 100 µg proteinů ze vzorku a přidáno 20 µl 25 mM DTT. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 65 °C. Následně bylo napipetováno 20 µl 65 mM IAA a vzorky se nechaly inkubovat 1 hodinu ve tmě. Poté byly přidány 2 µl proteázy Lys C a vzorky se nechaly inkubovat buď 2 hodiny při 37°C nebo přes noc. Dále bylo přidáno 50 µl 0,1 ABC a 3 µl proteázy Trypsinu, vzorky byly opět inkubovány při 37 °C buď 3 dny, nebo 2 dny. Vzorky byly přečištěny pomocí filtru Microcon 30 a následně byla měřena koncentrace pomocí BCA assay.

Digeste na základě přípravy vzorku za pomoci filtru

- Digeste byla provedena na filtru Microcon YM-30 ve filtrační mikrozkuhavce (obr. 8). Nanesený obsah 100 μ l proteinů s 200 μ l 8M močoviny v 0,1M Tris/HCl (pH = 8,5, dále jen UA) byl centrifugován při 14 000 g po dobu 15 minut. Následně bylo přidáno 200 μ l UA a mikrozkuhavky byly opět stočeny při 14 000 g 15 minut. Obsah mikrozkuhavky, který prošel přes filtr, byl vylit a bylo přidáno 100 μ l 0,05M jodacetamidu v UA. Mikrozkuhavky se nechaly třepat při 600 rpm v termomixeru po dobu 1 minuty a následně inkubovat ve tmě 20 minut. Po inkubaci byly mikrozkuhavky stočeny při 14 000 g 10 minut. Na filtr bylo napipetováno 100 μ l UA a mikrozkuhavky byly centrifugovány při 14 000 g 15 minut. Tento krok byl zopakován dvakrát. Bylo přidáno 100 μ l 0,05M roztoku ABC a mikrozkuhavky byly stočeny při 14 000 g po dobu 10 minut. Tento krok byl zopakován dvakrát. Následně byly přidány 2 μ l Lysinu C a vzorky byly inkubovány při 37 °C buď 2 hodiny, nebo přes noc. Po inkubaci bylo přidáno 40 μ l 0,025M ABC s Trypsinem (v poměru 1:100) a mikrozkuhavky byly třepány v termomixeru 1 minutu při 600 rpm. Filtry byly přeneseny do nových mikrozkuhovek a inkubovány po dobu 48 hodin nebo 24 hodin při 37 °C. Mikrozkuhavky byly stočeny při 14 000 g 10 minut a bylo přidáno 100 μ l 0,05M ABC. Mikrozkuhavky byly opět stočeny na 10 minut při 14 000 g a byla spektrofotometricky změřena absorbance peptidů metodou BCA při 562 nm.



Obr. 8: Microcon-30kDa filtr v centrifugační zkuhavce (převzato z www.merckmillipore.com)

Přečištění peptidové směsi

- Pro přečištění peptidové směsi byly připraveny C18 „Stage Tips“ (obr. 9). Provedla se aktivace přidáním 100 μ l methanolu, mikrozkumavky byly stočeny při 3000 g po dobu 2 minut. Bylo přidáno 100 μ l pufru A a mikrozkumavky byly opět stočeny při 3000 g po dobu 2 minut. Dále bylo přidáno 100 μ l pufru B, mikrozkumavky byly centrifugovány za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Následně bylo přidáno 15 μ g vzorku a mikrozkumavky byly opět stočeny jako v předchozím kroku. Bylo přidáno 100 μ l pufru A a mikrozkumavky byly centrifugovány jako v předešlém kroku. Špičky byly přesunuty do nové mikrozkumavky a bylo přidáno 100 μ l pufru B, mikrozkumavky byly stočeny při 3000 g po dobu 2 minut a objem, který prošel přes filtr, se nechal odpařit. Odparek byl rozpuštěn ve 150 μ l 2% ACN, 0,1% TFA, obsah byl přenesen do inzertu a analyzován pomocí hmotnostního analyzátoru Orbitrap.



Obr. 9: Připravená „Stage Tips“ kolona pro přečištění peptidové směsi (převzato a upraveno z Spruijt et al. 2013).

3.2.3 Hmotnostní analýza na Orbitrapu Elite

Hmotnostní analýza byla provedena na přístroji Orbitrap Elite (Thermo) spojeném s iontovým zdrojem Proxeon Easy-Spray a chromatogramem Ultimate 3000 RSLC nano. Na odsolovací kolonu PepMap 100 (75 μ m x 2 cm, 3 μ m, velikost pórů 100 Å; Thermo) zapojenou „in-line“ s analytickou kolonou PepMap RSLC (75 μ m x 15 cm, 3 μ m, velikost pórů 100 Å; Thermo) vyhřívanou na 35 °C se nanášel 1 μ l vzorku. Separace peptidů proběhla na analytické koloně s lineárně rostoucím gradientem organické fáze z 5 % na 35 % s celkovou délkou běhu 150 minut. Vodná fáze byla

voda s 0,1% kyselinou mravenčí a organická fáze acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí. Rozlišení orbitální pasti bylo nastaveno na 120000 a prekurzorové ionty byly skenovány v hmotnostním rozsahu 300-1950 m/z. V každém cyklu bylo vybráno dvacet nejintenzivnějších iontů pro fragmentaci kolizí indukovanou disociací a analyzováno v lineární pasti s kolizní energií 35 eV (Oždian et al., 2016).

3.2.4 Zpracování výsledků z MS analýzy

Výsledná hmotnostní spektra byla zpracována pomocí programu MaxQuant v. 1.3.0.5 používající databázi UniProt (aktuální k 4_4_2013) omezenou na lidské proteiny. Data byla následně odeslána do softwaru Perseus 1.4.0, kde došlo k identifikaci proteinů pomocí vyhledávacích algoritmů. Ze třech naměřených hodnot každého vzorku se stanovil průměrný počet identifikovaných peptidů a proteinů, v programu Microsoft Excel byly průměrné hodnoty vyneseny do grafu se směrodatnou odchylkou. Pomocí programu Venn diagram plotter 1.5 byly vizualizovány Vennovy diagramy. Pro porovnání metod byly využity identifikované proteiny. Proteinové rodiny a konkrétní proteiny se identifikují skládáním peptidů. K určení peptidů slouží úspěšná identifikace MS/MS spekter (Oždian et al., 2016). Pomocí Vennových diagramů byla určena míra překryvu identifikovaných proteinů a počet unikátních proteinů u jednotlivých metod. Z celkového počtu identifikovaných proteinů se dále stanovil počet proteinů v jednotlivých skupinách (keratiny, KAPs, NKPs) a v programu Microsoft Excel byl vytvořen graf s podílem různých proteinů ve vlasovém stvolu. Data z MS analýzy byla odeslána do softwaru Perseus 1.4.0, kde byla pomocí hierarchického klastrování a analýzy hlavních komponent (Principal component analysis; PCA) analyzována podobnost mezi vzorky jednotlivých osob.

4 Výsledky

4.1 Optimalizace protokolu pro zpracování vlasu a přípravy vzorku pro MS

Předmětem práce bylo optimalizovat přípravu vzorku vlasu pro hmotnostně-spektrometrickou analýzu, tzn. najít optimální množství vlasů pro efektivní extrakci proteinů, nejlépe vyhovující složení extrakčního pufru, délku inkubace a vhodnou teplotu. Bylo třeba zvolit způsob pro homogenizaci vlasového stvolu a vhodné organické rozpouštědlo k precipitaci proteinů. Další částí byla optimalizace digesce, bylo nutné vybrat nejlépe vyhovující enzym, metodu a dobu pro štěpení proteinů.

Příprava proteinových vzorků byla provedena na základě dvou přístupů, a to extrakcí na bázi DTT (Lee et al., 2006) s následnou modifikací postupu. Dále byla testována dvoukroková extrakce (Wong et al., 2016). Výsledná koncentrace extrahovaných proteinů byla porovnána a byl vybrán nejefektivnější přístup u vybraných vzorků a označením P a T.

4.1.1 Protokol podle Lee et al. 2006

V první části experimentu byla provedena extrakce proteinů na bázi DTT (Lee et al. 2006) a protokol byl postupně upravován.

4.1.1.1 Příprava vzorku dle parametrů protokolu

Pro přípravu vzorku bylo použito dle protokolu 40 mg vlasů (cca 45-50 kusů dle délky vlasu). Ve vzorcích vlasů byla stanovena koncentrace proteinů na základě kalibrační přímky z rovnice lineární regrese po spektrofotometrickém měření pomocí BSA assay při 562 nm ve 3 opakováních. Výsledné koncentrace shrnuje tabulka 3.

Tab. 3: Výsledná koncentrace proteinů stanovená spektrofotometricky při 562 nm BCA metodou. Vzorky byly připraveny ze 40 mg vlasů s extrakčním pufrem obsahujícím 2% SDS, 25 mM DTT (Lee et al. 2006).

vzorek	množství (mg)	extrakční pufr	inkubace (min); teplota	precipitace	c (µg/ml) proteinů
P	40	2% SDS; 25 mM DTT	o/n; 65°C	etOh	845.17
T	40	2% SDS; 25 mM DTT	o/n; 65°C	etOh	1101.75
J	40	2% SDS; 25 mM DTT	o/n; 65°C	etOh	444

4.1.1.2 Upravené parametry extrakčního pufru – přidání 8M UA

Pro přípravu vzorku ze 40 mg vlasů je zapotřebí mít k dispozici cca 50 vlasů 10 cm délky. S cílem snížit množství materiálu pro přípravu vzorku a urychlit extrakci za zvýšené efektivity bylo v dalším kroku upraveno množství vlasů. Současně byly navrženy 4 postupy pro extrakci. První vzorek byl připraven za stejných podmínek jako v předchozím kroku, ve druhém vzorku byla zkrácena doba extrakce na 2 hodiny, u třetího vzorku byla do extrakčního pufru přidána 8M močovina (Namakura et al. 2002) a čtvrtý vzorek se připravil opět po 2 hodinách inkubace v lyzačním pufru obohaceném o močovinu (tab. 4).

Tab. 4: Výsledná koncentrace proteinů stanovená spektrofotometricky při 562 nm BCA metodou. Vzorky byly připraveny s upravenými parametry protokolu čtyřmi rozdílnými přístupy (Lee et al., 2006).

vzorek	množství (mg)	extrakční pufr	inkubace (min); teplota	precipitace	průměr c (µg/ml) proteinů
P	12	2% SDS, 25 mM DTT	o/n; 65	etOh	137.46
T	12	2% SDS, 25 mM DTT	o/n; 65°C	etOh	89.74
P	12	2% SDS, 25 mM DTT	120; 65°C	etOh	101.26
T	12	2% SDS, 25 mM DTT	120; 65°C	etOh	139.67
P	12	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n; 65°C	etOh	366.22
T	12	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n; 65°C	etOh	432.62
P	12	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	120; 65°C	etOh	362.9
T	12	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	120; 65°C	etOh	123.92

4.1.1.3 Optimalizace sonikátoru

V dalším kroku bylo třeba upravit parametry homogenizace vzorku vlasu pomocí sonikátoru s cílem efektivnějšího rozmělnění vlasového stvolu (tab. 5)

Tab. 5: Optimalizace homogenizace vzorku vlasu pomocí sonikátoru. Tučně vyznačeno nejlépe vyhovující nastavení.

amplituda (%)	čas (s)	puls on/ puls off (s)	výsledek
50	120	0.5/0.5	příliš velká amplituda
50	60	1/1	příliš velká amplituda
25	60	0.5/0.5	příliš velká amplituda
10	60	0.5/0.5	malá amplituda - téměř žádné rozmělnění
15	60	0.5/0.5	malá amplituda - nedostatečné rozmělnění
20	60	0.5/0.5	optimální amplituda, krátký čas - nedostatečné rozmělnění
20	120	0.5/0.5	optimální nastavení - dostatečná homogenizace

4.1.1.4 Úprava množství materiálu a precipitace acetonem

Dále bylo opět sníženo množství potřebných vlasů pro přípravu vzorku na 5 mg a současně byl upraven i precipitační krok – k vysrážení proteinů byl použit aceton. Výsledná koncentrace byla stanovena pomocí BCA assay a výsledky byly porovnány (tab. 6)

Tab. 6: Výsledná koncentrace proteinů stanovená spektrofotometricky při 562 nm BCA metodou. Vzorky byly připraveny s upravenými parametry protokolu (Lee et al., 2006), precipitace byla provedena acetonem.

vzorek	množství (mg)	extrakční pufr	inkubace (min); teplota	precipitace	c (µg/ml) proteinů
P	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n; 65°C	etOh	465.89
T	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n; 65°C	etOh	743.11
P	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n; 65°C	aceton	1077.66
T	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n; 65°C	aceton	1316.01

4.1.1.5 Digesce trypsinem na základě FASP

Po dosažení dostatečné koncentrace proteinů byla provedena digesce proteinů na základě přípravy vzorky za pomoci filtru (FASP) s enzymem trypsinem přes noc. Koncentrace peptidů byla stanovována spektrofotometricky pomocí BCA assay při 562 nm (tab. 7). V experimentu bylo použito pro srovnání více různých druhů vlasů.

Tab. 7: Výsledná koncentrace peptidů stanovená spektrofotometricky při 562 nm BCA metodou. Štěpení proteinů proběhlo na základě metody FASP s trypsinem přes noc.

vzorek	množství (mg)	extrakční pufr	inkubace (min); teplota	precipitace	c (µg/ml) proteinů	digesce	c (µg/ml) peptidů
P	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n, 65 °C	acetone	519.33	TRY	86.66
T	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n, 65 °C	acetone	417	TRY	80.23
K	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n, 65 °C	acetone	269.67	TRY	92.5
B	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n, 65 °C	acetone	499	TRY	-
J	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n, 65 °C	acetone	580.67	TRY	-
V	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n, 65 °C	acetone	534	TRY	74.17
E	5	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	o/n, 65 °C	acetone	73	TRY	29.17

4.1.1.6 Úprava digesce

Digesce pomocí trypsinu nebyla dostatečně účinná, proto se hledaly jiné efektivní způsoby pro štěpení proteinů. Byly navrženy dva postupy: první způsob digesce byl proveden v roztoku (in solution), druhý způsob pomocí metody FASP, přičemž se v obou případech enzym trypsin kombinoval s lysinem C (Saveliev et al. 2013; tab. 8).

Tab. 8: Výsledná koncentrace peptidů stanovená spektrofotometricky při 562 nm BCA meto-
do a srovnání jednotlivých metod. Peptidy byly získány štěpením proteinů in solution s lysinem C a
trypsinem a metodou FASP se stejnými protězami jako u in solution metody.

vzorek	c (µg/ml) proteinů	c (µg/ml) peptidů in solution		c (µg/ml) peptidů FASP	
		o/n LysC + 48 hod Try	2 hod LysC + 72 hod Try	2 hod LysC + 48 hod Try	o/n LysC + 24 hod Try
P	312.17	480.2	232.2	329.6	189.6
T	417	368.2	389.2	117.6	374.6
J	276.33	569.2	397.2	235.6	308.6
V	179.67	523.2	369.2	206.6	335.6
B	233.83	435.2	351.2	361.6	381.6

Koncentrace peptidů po štěpení v roztoku přes noc s lyseinem C a dalších 48 hodin s trypsinem byla nejvyšší, proto byl tento způsob označen jako nejefektivnější. Při digesci v roztoku má enzym lepší přístup k proteinům a štěpí v celém objemu. Po přečištění na filtru Microcon však hodnoty koncentrace klesly (tab. 9). Z praktického hlediska byl vybrán způsob digesce pomocí FASP s lysinem C přes noc a následných štěpením trypsinem 24 hod. Štěpení přímo na filtru představuje zejména tu výhodu, že dochází současně k separaci peptidů od vysokomolekulárních látek, představujících kontaminaci. Tento přístup byl tedy použit pro všechny nadcházející digesce.

Tab. 9: Výsledná koncentrace peptidů získaných štěpením in solution po přečištění na filtru
Microcon. Koncentrace byla stanovena spektrofotometricky při 562 nm BCA metodou.

vzorek	o/n LysC + 48 hod Try	2 hod LysC + 72 hod Try
P	129.34	70.66
T	88.46	191.44
J	333.52	215.81
V	117.98	322.13
B	50.46	171.26

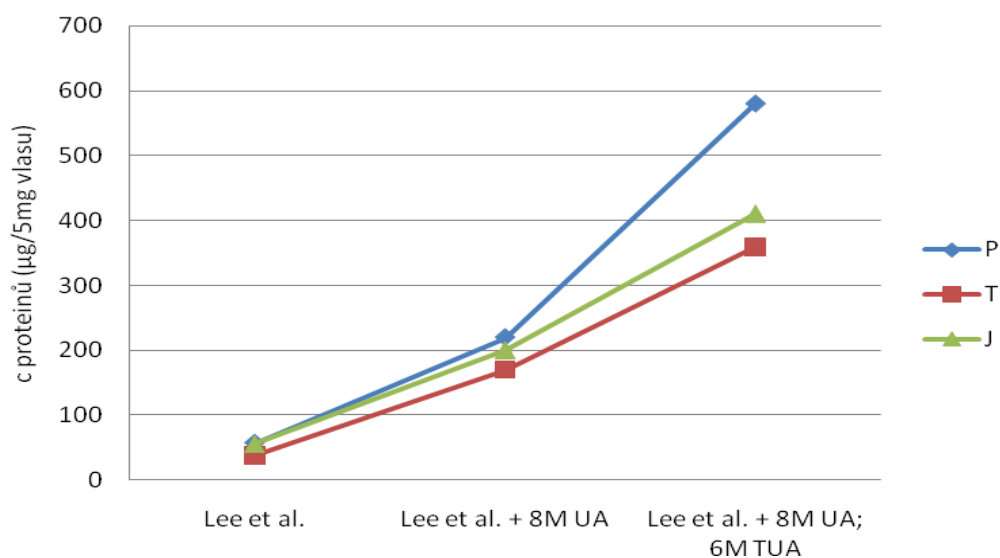
4.1.1.7 Zefektivnění extrakce 6M TUA

Pro další zvýšení efektivity extrakce proteinů bylo na základě informací z literatury (Nakamura et al. 2002; Han et al. 2007; Venkatesh et al. 2015) upraveno složení extrakčního pufru přidáním 6M thiomočoviny (tab. 10).

Tab. 10: Výsledná koncentrace peptidů stanovená spektrofotometricky při 562 nm BCA metodou. Vzorky byly připraveny s upravenými parametry protokolu (Lee et al., 2006), s přidavkem 6M thiomočoviny.

vzorek	(množství mg)	extrakční pufr	inkubace (min)	precipitace	digesce	c (μg/ml) peptidů
P	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA	o/n	acetone	LysC + Try	189.6
T	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA	o/n	acetone	LysC + Try	132.9
P	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	acetone	LysC + Try	3238.6
T	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	acetone	LysC + Try	3965.4

Optimalizace protokolu dle Lee et al. 2006 je shrnuta na obrázku 10. Nejeftivnější postup extrakce proteinů byl využit pro přípravu dalších vzorků pro rozšíření databáze profilů (tab. 11).



Obr. 10: Graf s vývojem extrakčního postupu podle protokolu Lee et al. 2006 u vybraných vzorků P, T a J. Koncentrace byly přepočítány na 5 mg vlasového materiálu.

Tab. 11: Výsledná koncentrace peptidů stanovená spektrofotometricky při 562 nm BCA metodou. Vzorky byly připraveny optimalizovaným postupem pro extrakci a digesce proteinů.

vzorek	(množství) mg	extrakční pufr	inkubace (min)	precipitace	digesce	c (µg/ml) peptidů
J	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	aceton	LysC + Try	2185.6
V	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	aceton	LysC + Try	4608.6
L	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	aceton	LysC + Try	2641.40
Js	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	aceton	LysC + Try	6461.40
Z	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	aceton	LysC + Try	3017.40
Mj	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	aceton	LysC + Try	2358.40
Jp	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	aceton	LysC + Try	6819.40
R	5	2% SDS; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA	o/n	aceton	LysC + Try	6748.40

4.1.2 Protokol podle Wong et al. 2016

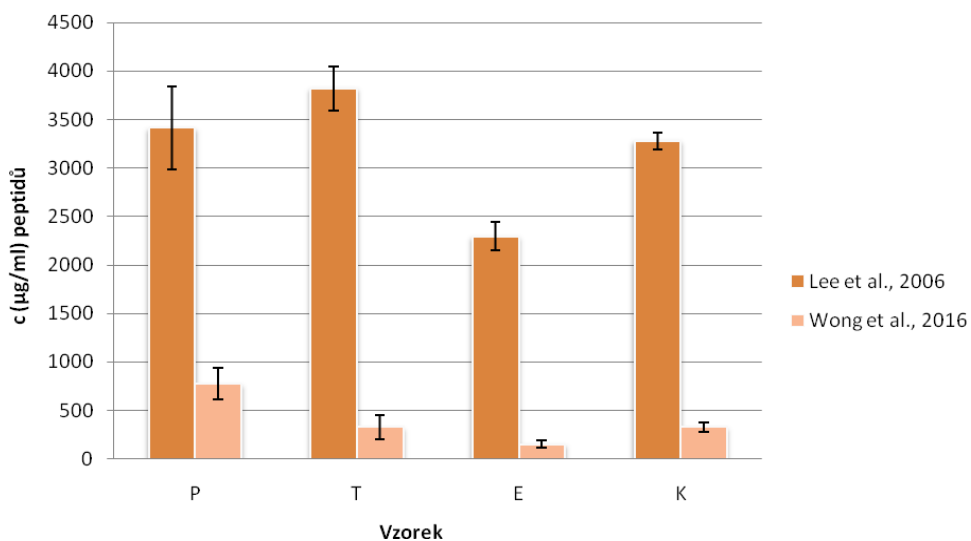
Ve druhé části experimentu byly vzorky vlasů připravovány tzv. dvoukrokovou extrakcí (Wong et al., 2016), proteiny byly štěpeny optimalizovaným přístupem pomocí FASP s lysinem C přes noc a následných štěpením trypsinem 24 hod.

Pro přípravu vzorku bylo zachováno množství 5 mg, extrakční pufr se lišil ve složení, obsahoval 1%SDS; 0,2M NaOH; 0,01M EDTA. Vzorky byly inkubovány po dobu 30 min, při 90°C. Koncentrace proteinů byla stanovována Bradfordovou metodou při 595 nm (tab. 12).

Tab. 12: Výsledná koncentrace peptidů stanovená spektrofotometricky při 595 nm Bradfordovou metodou.

vzorek	množství (mg)	extrakční pufr	inkubace (min); teplota	precipitace	c (µg/ml) proteinů	digesce	c (µg/ml) peptidů
P	5	1%SDS; 0.2M NaOH; 0.01M EDTA	30; 90°C	aceton	327	LysC + Try	618.7
T	5	1%SDS; 0.2M NaOH; 0.01M EDTA	30; 90°C	aceton	318.5	LysC + Try	238.5
B	5	1%SDS; 0.2M NaOH; 0.01M EDTA	30; 90°C	aceton	281.5	LysC + Try	179.5
V	5	1%SDS; 0.2M NaOH; 0.01M EDTA	30; 90°C	aceton	213.5	LysC + Try	594.5
E	5	1%SDS; 0.2M NaOH; 0.01M EDTA	30; 90°C	aceton	136	LysC + Try	156.75
K	5	1%SDS; 0.2M NaOH; 0.01M EDTA	30; 90°C	aceton	228	LysC + Try	288.5

Použité metody (optimalizovaný protokol dle Lee et al. 2006 s upravenými parametry a postup dle Wong et al. 2016) byly srovnány ve výsledné koncentraci peptidů u vybraných vzorků (obr. 11). Na grafu můžeme vidět velký rozdíl ve stanovených koncentracích, tudíž byla metoda podle Lee et al. 2006 na základě těchto výsledků považována na efektivnější.



Obr. 11: Srovnání výsledných koncentrací peptidů u použitých metod - Lee et al. 2016 a Wong et al. 2016 znázorněno pomocí grafů se směrodatnou odchylkou.

4.2 Vlasy ošetřené peroxidem vodíku

Součástí experimentu bylo zjistit, zda má barvení vlasů vliv na výslednou extrahovanou koncentraci proteinů ve vzorku. Vzorek vlasů, které nebyly nikdy barveny, byl po dobu 20 min inkubován ve 4% peroxidu vodíku, kontrolou byly vlasy nebarvené. Koncentrace proteinů byla stanovována pomocí BCA assay při 562 nm (tab. 13).

Tab. 13: Výsledná koncentrace peptidů stanovená spektrofotometricky při 562 nm BCA metodou. Srovnání vzorků nikdy nebarvených vlasů ošetřených v 4% peroxidu vodíku s kontrolními vzorky.

vzorek	extrakční pufr	c (µg/ml) proteinů	digesce	c (µg/ml) peptidů
B	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA + 4% H ₂ O ₂	872.3	LysC + Try	547
E	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA + 4% H ₂ O ₂	889.8	LysC + Try	239.5
B - kontrola	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	751.5	LysC + Try	247.83
E - kontrola	2% SDS, 25 mM DTT; 8M UA	639	LysC + Try	223.67

Podle těchto výsledků nelze jednoznačně určit, jestli barvení vlasů ovlivňuje obsažené proteiny. Výsledky nejsou statisticky významné, jelikož byl experiment proveden jen jednou, bez potřebného opakování. Podle výzkumu Fujii T. však účinek peroxidu vodíku vlasové proteiny ovlivňuje, zejména jejich rozpustnost. Po ošetření vzorků obsahujících močovinu peroxidem vodíku nebo bělidlem byla podle jejich výsledků solubilita proteinů snížena (Fujii et al. 2012). Tato problematika by mohla být součástí dalšího zkoumání vlasu z hlediska proteomiky, jelikož barvený vlas může být významným faktorem, ovlivňující celkovou koncentraci extrahovaných proteinů.

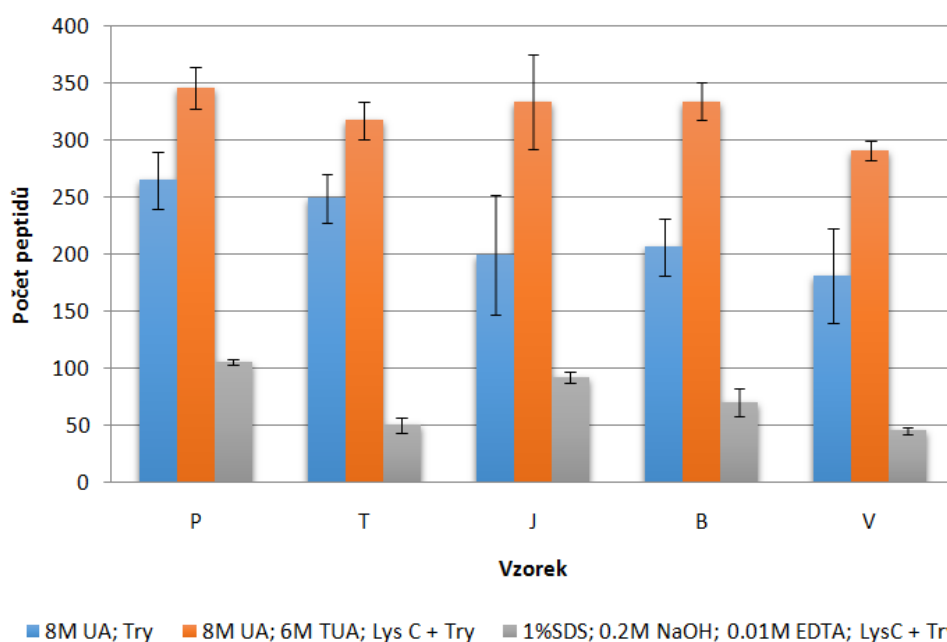
4.3 Analýza na hmotnostním spektrometru Orbitrap Elite

Proteinové vzorky pro hmotnostní analýzu byly připraveny na základě různých přístupů (viz kapitola Optimalizace přípravy vzorku vlasu pro hmotnostně-spektrometrickou analýzu). Pokud byla dosažena dostatečná koncentrace peptidů po enzymatickém

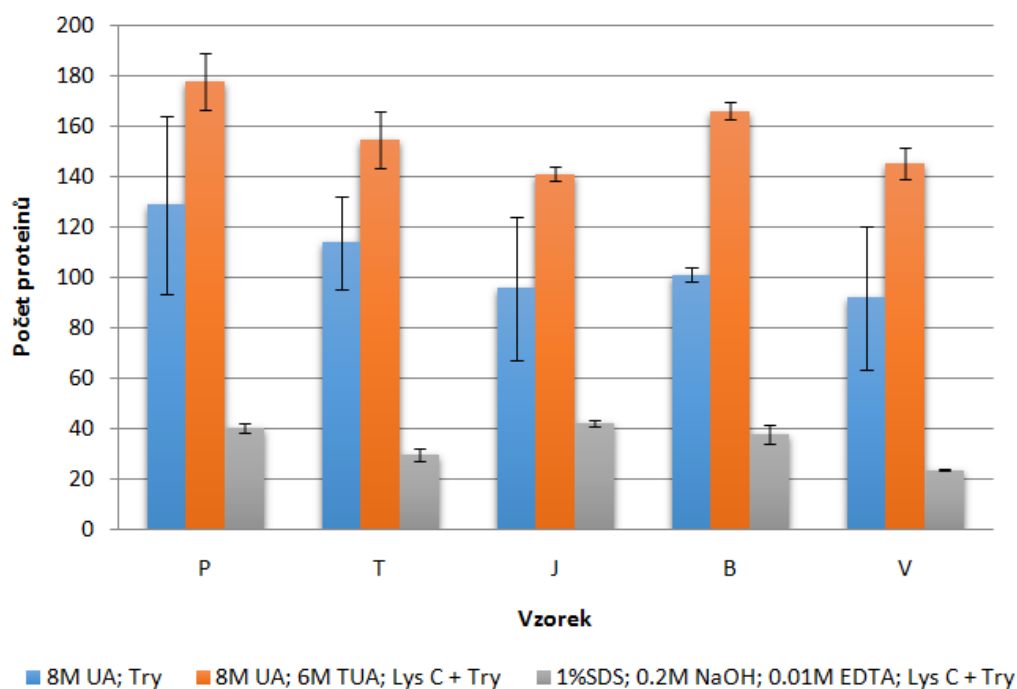
štěpení (minimálně 100 µg/ml), vzorky byly přečištěny a připraveny pro MS analýzu, kde byl pro každé měření použit 1 µg peptidové směsi.

4.3.1 Počet identifikovaných peptidů a proteinů

Pro srovnání byly testovány vzorky připravené extrakcí proteinů na bázi močoviny (modifikovaný protokol Lee et al. 2006) a následný štěpením pomocí FASP s trypsinem přes noc s proteinovými vzorky připravenými extrakcí na bázi močoviny a thiomčoviny (modifikovaný protokol Lee et al. 2006) a štěpením protézami lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod a se vzorky připravenými dle protokolu Wong et al. 2016. U vzorků se posuzoval počet identifikovaných peptidů (obr. 12) a následně proteinů (obr. 13) ve třech biologických opakováních.



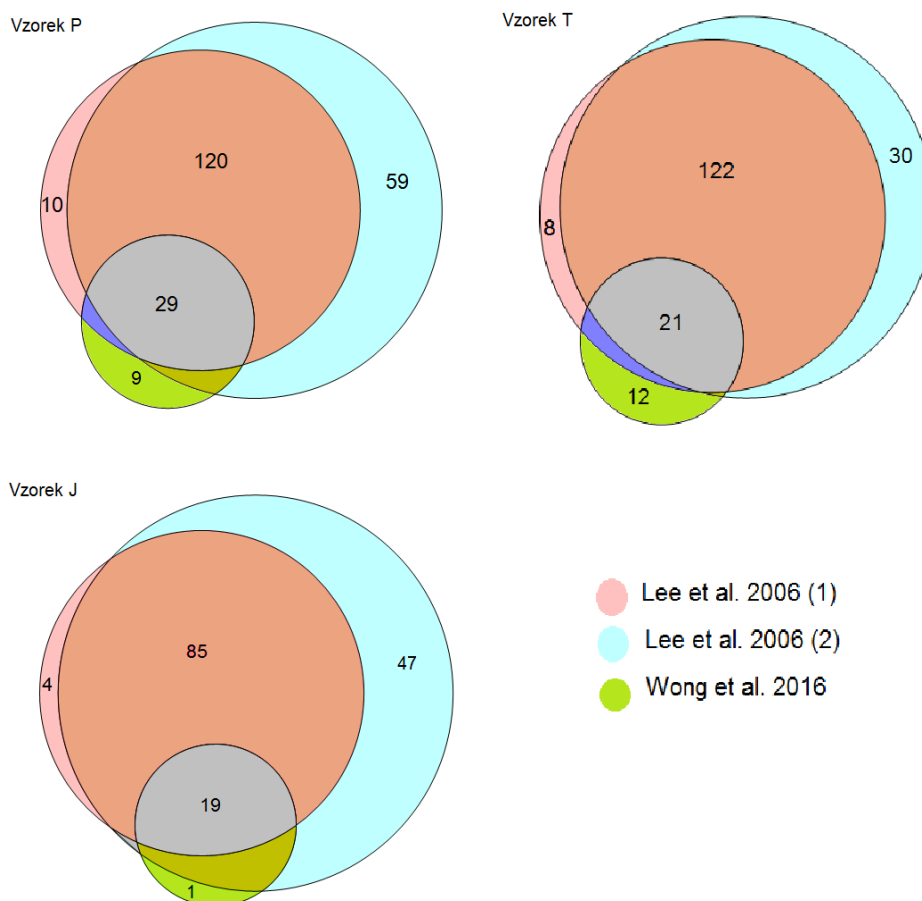
Obr. 12: Počet identifikovaných peptidů u jednotlivých vzorků v průměrných hodnotách ze tří biologických opakování s vyznačenou směrodatnou odchylkou. Vzorky byly připraveny extrakcí proteinů na bázi močoviny (Lee et al. 2006) a následný štěpením proteinů pomocí FASP s trypsinem přes noc. Druhým způsobem byly připraveny extrakcí proteinů na bázi močoviny a thiomčoviny (Lee et al. 2006) a štěpením protézami lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod, třetím způsobem byly vzorky připraveny dle protokolu Wong et al. 2016 s digescí lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod.



Obr. 13: Počet identifikovaných proteinů u jednotlivých vzorků v průměrných hodnotách ze tří biologických opakování s vyznačenou směrodatnou odchylkou. Peptidové vzorky byly připraveny extrakcí proteinů na bázi močoviny (Lee et al. 2006) a následný štěpením proteinů pomocí FASP s trypsinem přes noc. Druhým způsobem byly připraveny extrakcí proteinů na bázi močoviny a thiomčoviny (Lee et al. 2006) a štěpením protézami lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod, třetím způsobem byly vzorky připraveny dle protokolu Wong et al. 2016 s digescí lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod.

Na základě těchto výsledků byl počet identifikovaných peptidů nejvyšší u druhého způsobu přípravy vzorku, tedy extrakcí proteinů na bázi močoviny a thiomčoviny (Lee et al. 2006) a štěpením protézami lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod (347; 320; 331; 334; 279). Nejnížší počet peptidů byl získán přípravou vzorku dle protokolu Wong et al. (112; 50; 81; 68; 47) V případě proteinů, stejně tak jako u peptidů, je možno pozorovat významný rozdíl mezi 1./3. a 2./3. postupem. Nejvíce identifikovaných proteinů poskytoval druhý způsob přípravy vzorku (177; 159; 139; 171; 145), nejméně bylo nalezeno proteinů u třetího postupu (40; 29; 42; 37; 23).

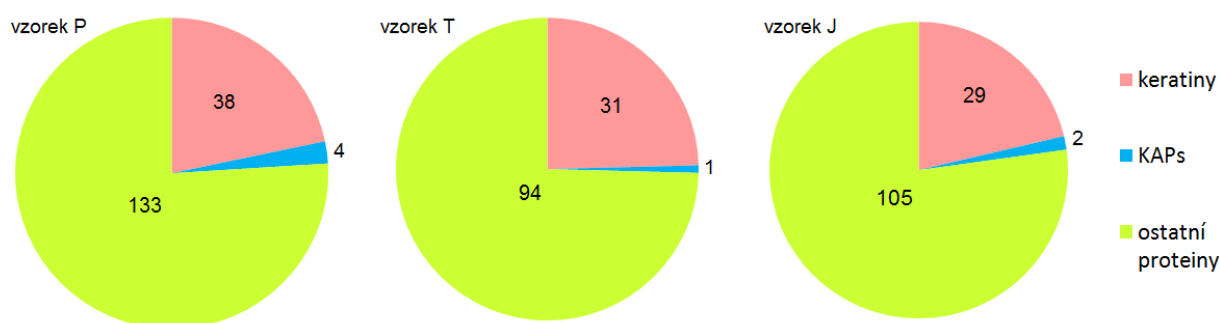
Pomocí Vennových diagramů byla srovnána míra překryvu identifikovaných proteinů u vybraných vzorků po MS analýze na základě různých přístupů přípravy vzorku vlasů (obr. 14). Každý vzorek byl měřen ve třech biologických opakováních, přičemž se celkový počet stanovoval z počtu proteinů, které se vyskytovaly alespoň v jednom z replikátů.



Obr. 14: Vennovy diagramy znázorňující společné a unikátní identifikované proteiny po MS analýze u vzorků P, T a J, které byly připraveny na základě různých přístupů. Lee et al. 2006 (1) - extrakce proteinů na bázi močoviny a následný štěpením proteinů pomocí FASP s trypsinem přes noc; Lee et al. 2006 (2) – extrakce proteinů na bázi močoviny a thiomčoviny a štěpením protézami lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod; Wong et al. 2016 – extrakce dle protokolu a štěpením protézami lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod.

4.3.2 Identifikované proteiny

Identifikované proteiny ve vybraných vzorcích byly rozděleny do jednotlivých skupin proteinů (keratiny, KAPs a ostatní proteiny) a stanovil se jejich počet. Na obr. 15 grafy znázorňují podíl skupin z celkového počtu proteinů. Celkový počet se stanovil z počtu proteinů, které se vyskytovaly alespoň v jednom z replikátů u všech použitých metod.



Obr. 15: Grafy vybraných vzorků s distribucí různých proteinů ve vlasovém stvolu – keratiny, KAPs a ostatní proteiny nekeratinového charakteru.

Největší zastoupení všech proteinů mají proteiny nekeratinového původu. Jedná se především o NKPs, které jsou součástí komplexu buněčných membrán a epikutukuly.

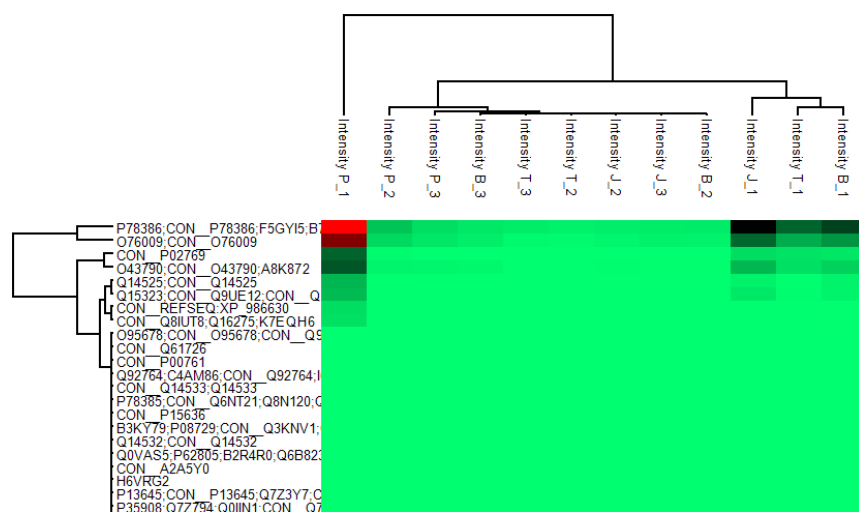
Keratiny tvoří asi čtvrtinu celkového počtu identifikovaných proteinů. Přitom 60 % z této části připadá na keratiny I. typu, z nichž polovinu tvoří kutikulární a druhou polovinu cytoskeletální keratiny. Zbýlých 40 % je zastoupeno keratiny II. typu se stejným poměrem kutikulárních a cytoskeletálních keratinů.

Zbylou část grafu zastupují KAPs, kde se většinou jednalo o rodiny s vysokým obsahem síry nebo glycinu/tyrosinu. Tabulka se seznamem identifikovaných proteinů u vzorku P je uveden v příloze.

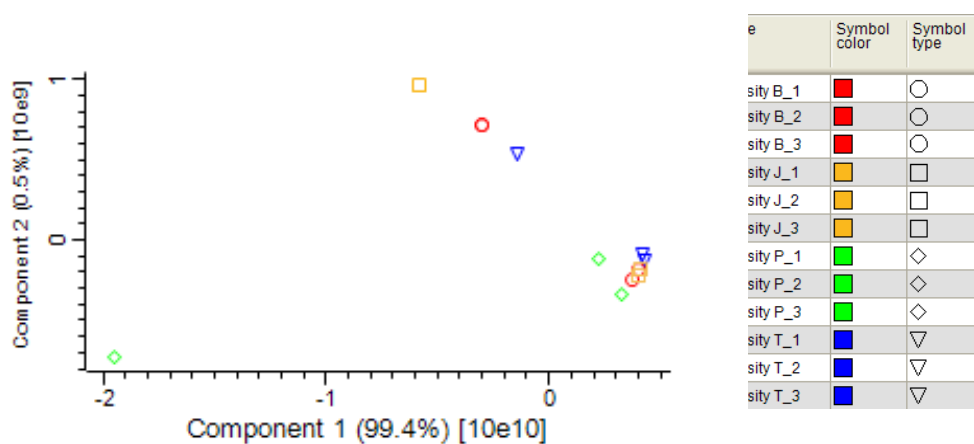
4.3.3 Analýza podobnosti vzorků osob

Po MS analýze vzorků vlasů, které byly připraveny optimalizovaným postupem, byla analyzována míra podobnosti vzorků jednotlivých osob pomocí statistických

metod. Bylo využito shlukové analýzy, konkrétně hierarchického klustrování (obr. 16) a PCA (obr. 17).



Obr. 16: Hierarchické klustrování na základě identifikovaných proteinů u vzorků připravených optimalizovaným postupem.



Obr. 17: Analýza hlavních komponent identifikovaných proteinů u vzorků připravených optimalizovaným postupem.

5 Diskuze

Lidský vlas je z proteomického hlediska dosud ne zcela objasněnou strukturou. Hlavní příčinou je velká mechanická i chemická odolnost vlasu, bránící efektivní extrakci proteinů. Dále nerozpustnost vlasových proteinů daná disulfidickými můstky, tedy kovalentními vazbami mezi dvěma atomy síry a křížovými vazbami. Jednou z příčin strohých informací o vlasovém proteomu je také nedostatek popsaných metod pro přípravu vzorku k analýze nebo málo účinných metod.

Cílem této práce bylo vyvinout postup metody extrakce, solubilizace a digesce proteinů lidského vlasu pro MS analýzu. Příprava vzorku byla provedena na základě různých přístupů, přičemž byl nakonec vybrán ten nejlépe vyhovující. Byly uskutečněny dva experimenty – první postup byl proveden podle Lee et al. 2006, kde byly jednotlivé kroky postupně upravovány, druhý postup vycházel z článku dle Wonga et al. 2016 slibující vysoký výtěžek proteinů. Bylo navrženo několik přístupů pro štěpení proteinů lišící se provedením, kombinací enzymů a délkou inkubace. Koncentrace extrahovaných proteinů i získaných peptidů byla v každém kroku průběžně stanovována pomocí BCA assay při 562 nm nebo Bradfordovou metodou při 595 nm.

Po vyhodnocení všech získaných výsledků měl nejlépe vyhovující složení extrakční pufr obsahující 2% SDS v 0,1M fosfátovém pufru, pH 7,8; 25 mM DTT; 8M UA; 6M TUA, ve kterém se vlasy inkubovaly přes noc při 65 °C. Rozpouštěcí pufr obsahoval 8M močovinu a optimální rozpuštění bylo za podmínek 80 °C při 600 rpm 30 min. Extrakční, neboli lyzační pufr by měl obsahovat chaotropní a redukční činidla, nebo detergenty a amfolity. Dithiotreitol (DTT) je velmi silné redukční činidlo, používané k přerušení disulfidických můstků, které udržují terciální a kvartérní strukturu proteinů. DDT však není schopno rozrušit disulfidické můstky uvnitř molekuly, redukce proto musí probíhat za přítomnosti SDS, močoviny a při vyšší teplotě, tedy za tzv. denaturujících podmínek. Thimočovina, stejně tak jako močovina jsou chaotropní činidla, která efektivně denaturují proteiny a zvyšují jejich solubilitu (Váňa, Šmarda 2004).

Nejvýhodnějším způsobem digesce proteinů pro tyto účely bylo zvoleno štěpení proteinů pomocí FASP s lysinem C přes noc a trypsinem 24 hod. Metoda FASP, tedy příprava vzorku za pomoci filtru má čtyři základní kroky. Prvním krokem je odstranění

nežádoucích nízkomolekulárních látek, pak redukce a alkylace, dalšími kroky jsou štěpení proteinů a eluce peptidů. Výhodou metody FASP je, že během eluce peptidů zůstanou na filtru vysokomolekulární látky, které by mohly narušit následnou MS analýzu peptidů. Trypsin je nejpoužívanější proteáza v MS, díky své vysoké proteolytické aktivitě a specifitě. Avšak stabilní proteiny, jako jsou keratiny, mohou proteolýze odolávat a štěpení pouze trypsinem je v tomto případě málo účinné. Navíc celá řada činidel, která jsou využita při přípravě vzorku, inhibují aktivitu trypsinu. Řešením této situace je kombinace trypsinu s proteázou lysinem C (Saveliev et al. 2013).

Efektivitu metody digesce výše uvedeným způsobem potvrdily i výsledky z MS analýzy na Orbitrapu Elite, kde byl u optimalizované extrakce proteinů na bázi močoviny a thiomčoviny nejvyšší počet identifikovaných peptidů i proteinů. Pomocí Vennových diagramů byla demonstrována míra překryvu identifikovaných proteinů, tedy společných proteinů u jednotlivých metod. Ve vzorku P byl počet společných proteinů u analyzovaných metod 29, ve vzorku T 21 a 19 ve vzorku J. Za tímto relativně nízkým počtem společně se vyskytujícími proteinů stojí nízký počet identifikovaných proteinů u metody dle Wonga a jeho skupiny.

Dále byl podrobněji zkoumán vlasový proteom z hlediska zastoupení jednotlivých skupin identifikovaných proteinů, tedy keratinů, KAPs a NKPs. Podle zveřejněných výsledků studie vlasových keratinů Wonga a jeho skupiny bylo z celkového počtu 60 identifikovaných proteinů 31 keratinů, jeden KAPs a zbylá část připadala na ostatní proteiny nekeratinového původu (Wong et al. 2016). Na základě výsledků této práce bylo zjištěno, že největší podíl nepatří keratinům, ale NKPs proteinům. Důvodem může být fakt, že zastoupení jednotlivých skupin proteinů se posuzovalo ze všech proteinů, vyskytujícími se alespoň v jednom z replikátu a všech použitých metod. NKPs jsou součástí komplexu buněčných membrán a epikutukuly s nízkým obsahem cystinu (Cruz et al. 2016) – kadheriny, proteiny aktinových filament, proteiny s ATPasovou aktivitou, histony a zejména proteiny IF, zaručující mechanickou odolnost a stabilitu struktury. Mezi významné proteiny, které byly identifikovány, patří desminy, desmozomy a desmoplakiny. Desmoplakiny jsou proteiny o velké molekulové hmotnosti (332 kDa), představující strukturální složkou cytoskeletu, která hraje důležitou roli při adhezi keratinocytů (Young et al. 2006). Dále laminy, proteiny tvořící hustou síť intermediárních filament na vnitřním

povrchu buněčného jádra a neurifilamenta. Ze skupiny mikrotubulů jsou to tubuliny, důležité proteiny cytoskeletu. Keratiny zastupovaly asi čtvrtinu celkového počtu identifikovaných proteinů, přibližně 60 % z této části připadalo na keratiny I. typu, tedy kyselé, z nichž polovinu tvořily kutikulární a druhou polovinu cytoskeletální keratiny. Zbylých 40 % bylo zastoupeno keratiny II. typu, neutrálními až bazickými, se stejným poměrem kutikulárních a cytoskeletálních keratinů jako u I. typu. Proteiny ze skupiny KAPs připadaly na zbylou část celkového počtu, jelikož nomenklatura KAPs není pořád zcela jasná, jednalo se pravděpodobně o rodiny s vysokým obsahem síry nebo glycinu/tyrosinu. Proteiny ze skupiny KAPs jsou důležité při zesíťování s IF, tvořenými keratiny, prostřednictvím disulfidických vazeb a s největší pravděpodobností se podílí na vlastnostech vlasu jako pevnost a rigidita (Gong et al. 2012).

Míra podobnosti jednotlivých vzorků byla analyzována hierarchickým klastrováním a PCA na základě identifikovaných proteinů u vzorků připravených optimalizovaným postupem. Jedná se o vícerozměrné statistické metody, které slouží jako nástroj pro zpracování a hlavně zjednodušenou vizualizaci velmi složitých dat. Hierarchického klastrování pomáhá třídít podobné jednotky, v našem případě vzorky, do shluků neboli klastrů. Metoda PCA pak využívá rozplytu hlavních komponent. Výstupy z těchto analýz vykazují vysokou podobnost jednotlivých vzorků. Tato podobnost je logická, protože se analyzovaly pouze bělošské vlasy, znemožňuje však zvažovanou forenzní analýzu. Další optimalizace protokolu by měla vést k lepšímu proteinovému pokrytí a tím pádem i ke zvýšení zachytu rozdílně exprimovaných proteinů. Tímto zvýšením poté dosáhneme kýženého cíle. Vzhledem k tomu, že příprava vzorku byla optimalizována v této práci a hmotnostně spektrometrická detekce využívající spektrometr Orbitrap je v současnosti jednou z nejlepších metod pro analýzu proteinů, jsou možnosti další optimalizace v podstatě jen dvě. První je pokračovat v optimalizaci přípravy vzorků a druhá možnost je zlepšení proteinového vyhledávání, například pomocí opakované analýzy s exclusion kritérii, nebo pomocí další optimalizace proteinové identifikace. Možnosti optimalizace vzorků jsou omezené, protože již v tuto chvíli se pro solubilizaci proteinů používají velmi drsné podmínky, proto bychom se v další fázi zaměřili na bioinformatické vyhodnocení změřených dat, případně na alternativní metody proteomické MS analýzy, které by mohly zvýšit poměr identifikovaných spekter, který je relativně nízký (Oždian et al., 2016).

6 Závěr

V teoretické části diplomové práce byla zpracována literární rešerše na téma dané problematiky, byla popsána struktura lidského vlasu a využití trichologického materiálu ve forenzní biologii. Do rešerše byly dále mimo jiné zahrnuty doposud zjištěné poznatky o proteomice vlasů a byla navrhována hypotéza o využití proteomické analýzy vlasu ve forenzní praxi.

Na základě informací z dostupné literatury byl v experimentální části optimalizován postup přípravy vzorku pro proteomickou analýzu, zahrnující volbu vhodné metody pro extrakci proteinů z vlasového stvolu, nejlépe vyhovujícího enzymu a způsobu pro štěpení proteinů. Z několika navržených přístupů byl po vyhodnocení výsledků a srovnání metod vybrán nejefektivnější přístup.

Po MS analýze na Orbitrapu Elite byly identifikované proteiny kvantifikovány, byl stanoven jak počet peptidů, tak proteinů. Dále byla demonstrována míra překryvu identifikovaných proteinů, jednalo se o společné proteiny u jednotlivých metod. Vlasový proteom byl analyzován i na základě zastoupení jednotlivých skupin identifikovaných proteinů ve vzorcích. Pomocí vícerozměrných statistických metod byla analyzována míra podobnosti jednotlivých vzorků.

Stanovené cíle v úvodu práce byly tímto splněny, optimalizovaný postup přípravy vzorku vlasu může být podkladem pro další studie vlasového proteomu.

SEZNAM LITERATURY

Barthélemy N. R., Bednarczyk A., Schaeffer-Reiss C., Jullien D., Van Dorsselaer A., Cavusoglu N. (2012) Proteomic tools for the investigation of human hair structural proteins and evidence of weakness sites on hair keratin coil segments. *Analytical Biochemistry* 421, 43–55

Bragulla H. H., Homberger D. G. (2009) Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* 214, 516-559

Cruz C. F., Costa C., Gomes A. C., Matamá T., Cavaco-Paulo A. (2016) Human Hair and the Impact of Cosmetic Procedures: A Review on Cleansing and Shape-Modulating Cosmetics. *Cosmetics* 3(3), 26; doi:10.3390/cosmetics3030026

Čihák R. Anatomie. 2. doplněné a přepracované vydání. Sv. 2. Praha: Grada, 2002. 516 s. ISBN 80-7169-970-5

Deedrick D. W. (2000) Hairs, Fibers, Crime and Evidence. *Forensic science communications* 2 (3)

Deedrick D. W., Koch S. L. (2004) Microscopy of Hair Part 1: A Practical Guide and Manual for Human Hairs. *Forensic Science Communication* 6 (1)

Deedrick D. W., Koch S. L. (2004) Microscopy of Hair Part 2: A Practical Guide and Manual for Animal Hairs. *Forensic Science Communication* 6 (3)

Du X., Li X. H., Smart N. G., Beutler B. (2016) Mutagenetix Phenotypic Mutation 'Plush'. MUTAGENETIX (TM), dostupné z: mutagenetix.utsouthwestern.edu

Franbourg A., Hallegot P., Baltenneck F., Toutaina C., Leroy F. (2003) Current research on ethnic hair. *Journal of the American Academy of Dermatology* 48, 115–119

Franke W. W., Schmid E., Osborn M., Webwr K. (1979) Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *The Journal of cell Biology* 81, 570-580

Fraser R. D. B., Parry D. A. D. (2012) The role of disulfide bond formation in the structural transition observed in the intermediate filaments of the developing hair. *Journal of Structural Biology* 180, 117-124

Fraser R. D. B., Parry D. A. D. (2014) Keratin intermediate filaments: differences in the sequences of the type I and type II chains explain the origin of the stability of an enzym-rezistante four-chain fragment. *Journal of Structural Biology* 185, 317-326

Fujii T., Ito Y., Watanabe T., Kawasoe T. (2012) Effects of oxidative treatments on human hair keratin films. *Journal od Cosmetics Sciences* 63(1), 15-25

Gaudette, B. D. (2000) Hair, Comparison: Significance of Hair Evidence. *Encyclopedia of Forensic Sciences* 1018– 1024.

Gavazzoni-Dias M. F. R. (2015) Hair cosmetics: An overview. *International journal of trichology* 7(1), 2-15

Gong H., Zhou H., McKenzie G., Yu Z., Clerens S., Dyer J. M., Plowman J. E., Wright M. W., Arora R., C. Bawden S., Chen Y., Li J., Hickford J. G. H (2012) An Uptadet Nomenclature for Keratin-Associated Proteins (KAPs). *International Journal of Biological Sciences* 8(2), 258-264

Grosvenor A. J., Marsh J., Thomas A., Vernon J. A., Harland D. P., Clerens S., Dyer J. M. (2016) Oxidative Modifi cation in Human Hair: The Effect of the Levels of Cu (II) Ions, UV Exposure and Hair Pigmentation. *Photochemistry and Photobiology*. 92: 144–149

Gupta A. (2014) Human Hair “Waste” and Its Utilization: Gaps and Possibilities. *Journal of Waste Management* ID: 498018, 1-17

Han M. O., Chun J. A., Lee W. H., Lee J. W., Chung Ch. H. (2007) A simple improved method for protein extraction from human head hairs. *International Journal of Cosmetic Science* 58, 527-534

Honda Y., Koike K., Kubo Y., Masuko S., Arakawa Y., Ano S. (2014) In vitro Assembly Properties of Human Type I and II Hair Keratins. *Cell structure and function* 39, 31-43

Kligman A. D. (1959) The human hair cycle. *The Journal of investigative dermatology* 33, 307-16

Kovářová H. (2005) Proteomika v postgenomové době. *Chemické Listy* 99, 886 – 889

Laatsch C. N., Durbin-Johnson B. P, Rocke D. M., Mukwana S., Newland A. B., Flagler M. J., Davis M. G., Eigenheer R. A, Phinney B. S., Rice R. H. (2014) Human hair shaft proteomic profiling: individual differences, site specificity and cuticle analysis. *PeerJ* DOI: 10.7717, 1-17

Lange L., Huang Y., Blusk P. K. (2016) Microbial decomposition of keratin in nature - a new hypothesis of industrial relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1100, 2083–2096

Lee Y. L., Rice R. H., Lee Y. M. (2006) Proteome analysis of human hair shaft: from protein identification to posttranslational modification. *Molecular and Cellular Proteomics* 5, 789–800

Lee B., Kim B. C., Chang M. S., Kim H. S., Na H. B., Park Y. I., Lee J., Hyeon T., Lee H., Lee S. W., Kim J. (2015) Efficient protein digestion using highly-stable and reproducible trypsin coatings on magnetic nanofibers. *Chemical Engineering Journal* 288, 770-777

Linch Ch. A., Whiting D. A., Holland M. M. (2001) Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist. *Journal of Forensic Sciences* 46(4), 844–853

Lupas A. N., Gruber M. (2005) The structure of α -helical coiled coils. *Advances in Protein Chemistry* 70, 37–38

Michalíková H. (2002) Struktura vlasu a vlasový cyklus. In: Arenberger, Petr a kol., *Klinická trichologie*. Praha: Maxdorf.

Moll R., Divo M. Langbein L. (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology* 129, 705–733

Nakamura A., Arimoto M., Takeuchi K., Fujii T. (2002) A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25(5), 569—572

Oždian T., Holub D., Rylová G., Václavková J., Hajdúch M., Dzubák P. (2016) Porovnání hmotnostně spektrometrických přístupů v proteomickém profilování léčiv. *Chemagazín* 5, 14-17

Parker G. J., Leppert T., Anex D. S., Hilmer J. K., Matsunami N., Baird L., Stevens Y., Parsawar K., Durbin- Johnson B. P., Rocke D. M., Nelson C., Fairbanks D. J., Wilson A. S., Rice R. H., Woodward S. R., Bothner B., Hart B. R., Leppert M. (2016) Demonstration of Protein-Based Human Identification Using the Hair Shaft Proteome. *Public Library of Science* DOI: 10.1371, 1-26

Plowman J. E. (2007) The proteomics of keratin proteins. *Journal of chromatography. B. Analytical technologies in the biomedical and life science* 849 (1-2), 181-189

Rice R. H. (2011) Proteomic analysis of hair shaft and nail plate. *Journal of cosmetic science* 62(2), 229-36

Rice R. H., Wu P. W., Mann S. M. (2015) Human Hair Proteomics - Improved Evidence Discrimination, 1-22

- Robbins C. R. (2012) Chemical Composition of Different Hair Types. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair* 105-176
- Rogers G. E., Powell B. C. (1993) Organization and expression of hair follicle genes. *The Journal of investigative dermatology* 101(1), 50-55
- Rogers M. A., Langbein L., Praetzel-Wunder S., Winter H., Schweizer J. (2006) Human hair keratin-associated proteins (KAPs). *International review of cytology* 251, 209-263
- Saveliev S., Bratz M., Zubarev R., Szapacs M., Budamgunta H., Urh M. (2013) Trypsin/Lys-C protease mix for enhanced protein mass spektrometry analysis. *Nature Methods* 10, 10-11
- Shimomura Y., Ito M. (2005) Human Hair Keratin-Associated Proteins. *The journal of investigative dermatology* 10, 230 –233
- Shin S., Lee A., Lee S., Lee K., Kwon J., Yoon M. J., Hong J., Lee D., Lee G. H., Kim J. (2010) Microwave-assisted extraction of human hair proteins. *Analytical biochemistry* 281-283
- Schweizer J., Bowden P. E., Coulombe P. A. (2006). New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of Cell Biology* 174 (2), 169–74
- Strnad P., Usachov V., Debes C., Gräter F., Parry D. A. D., Omary B. (2011) Unique amino acid signatures that are evolutionarily conserved distinguish simple-type, epidermal and hair keratins. *Journal of Cell Science* 124, 4221–4232
- Štefan J., Hladík J. (2012) Soudní lékařství a jeho moderní trendy. Praha: Grada Publishing, 2012. 437 s. ISBN 978-80-247-3594-8.
- Taupin J. M. (2004) Forensic hair morphology comparison — a dying art or junk science? *Science & Justice* 44, 95–100

Thibaut S., Barbarat P., Leroy F., Bernard B. A. (2007) Human hair keratin network and curvature. *International Journal of Dermatology* 46, 7–10

Venkatesh T., Anbarasu A., Subramanian O. S. (2015) Lab-Scale Extraction, Confirmation and Applications of Protein from Human Hairs. *International Journal of Technology and Engineering Science* 3 (8), 4008-4011

Wilson M. R., Polanskey D., Butler J., DiZinno J. A., Replogle J., Budowle B. (1995) Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *BioTechniques* 662-669

Wolfram L. J. (2003) Human hair: A unique physicochemical composite. *Journal of the American Academy of the Dermatology* 48, 106-114

Wong S. J, Lee S. S., Ashrafzadech A., Junit S. M., Abraham N., Hashimn O. H. (2016) A High-Yield Two-Hour Protocol for Extraction of Human Hair Shaft Proteins. *Public Library of Science* 11(10), 1-15

Yang F. C., Zhang Y., Rheinstädter M. C. (2014) The structure of people's hair. *PeerJ* DOI: 10.7717, 1-19

Zahn H. (2002) Progress report on hair keratin research. *International Journal of Cosmetic Science* 24, 163-169

Internetové zdroje:

Pantogar - struktura zdravého vlasu, dostupné z:

http://www.pantogar.com/en/allabouthair/structure_of_healthy_hair/index.jsp (staženo 29. 2. 2017)

Praktické cvičení z histologie, Univerzita Tasmánie, Austrálie, dostupné z:

<https://secure.health.utas.edu.au/intranet/cds/histoten/Practicals/04.Integumentary.html> (staženo 20. 11. 2016)

Merck Millipore, dostupné z: www.merckmillipore.com (staženo 20. 11. 2016)

Hair Transplants Surgery Center, dostupné z: www.hairtsc.com/en/Hair-Growth-Cycle.htm (staženo 22. 11. 2016)

SEZNAM ZKRATEK

AA	kyselina octová
ABC	hydrogenuhličitan amonný
ACN	acetonitril
BCA	bicinchoninic acid (kyselina bicinchoninová)
BSA	bovine serum albumine (hovězí sérový albumin)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FA	kyselina mravenčí
FASP	Filter-Aided Sample Preparation (příprava vzorku za pomoci filtru)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
IAA	jodacetamid
ICC	international colourcode (mezinárodní kód pro barvu)
IF	intermediální filamenta
KAPs	proteiny asociované s keratinem
Lys C	lysin C
β-ME	beta-merkptoetanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NKPs	proteiny nekeratinových oblastí
nsSNPs	nesynonymních jednonukleotidových polymorfismů
nuDNA	jaderná DNA
PCA	Principal component analysis (analýza hlavních komponent)
SAPs	polymorfismů jednotlivých aminokyselin
SDS	dodecylsírán sodný
TFA	kyselina trifluoroctová
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Try	trypsin
TUA	thiomočovina
UA	močovina

PŘÍLOHY

I. Seznam identifikovaných proteinů u vzorku P

Název genu	Název proteinu
PNKD	Probable hydrolase PNKD
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
TMF1	TATA element modulatory factor
ABLIM3	Actin-binding LIM protein 3
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase
KRT14	Keratin, type I cytoskeletal 14
MEMO1;C2orf4	Protein MEMO1
KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
DSG4	Desmoglein-4
TRIM29	Tripartite motif-containing protein 29
ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
SFN	14-3-3 protein sigma
DSP;DSP variant protein	Desmoplakin
KRT32	Keratin, type I cuticular Ha2
OTUB2	Ubiquitin thioesterase OTUB2
LAP3	Cytosol aminopeptidase

Název genu	Název proteinu
ANXA1	Annexin;Annexin A1
CSTB	Cystatin-B
ARL8B;ARL8A	ADP-ribosylation factor-like protein 8B;ADP-ribosylation factor-like protein 8A
EEF1A1L14;PTI-1;EEF1A1;EEF1A2	Elongation factor 1-alpha;Putative elongation factor 1-alpha-like 3;Elongation factor 1-alpha 1;Elongation factor 1-alpha 2
KRT81	Keratin, type II cuticular Hb1
CRYAB	Alpha-crystallin B chain
H3F3B;H3F3A;HIST2H3A;HIST3H3	Histone H3;Histone H3.2;Histone H3.1t;Histone H3.3;Histone H3.1;Histone H3.3C
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
NFKB1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit;Nuclear factor NF-kappa-B p50 subunit
KIAA2026	Uncharacterized protein KIAA2026
KRT82;KRTHB2	Keratin, type II cuticular Hb2
KRT36	Keratin, type I cuticular Ha6
HNRPA1;HNRNPA1;HNRNPA1L2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2
KRTAP7-1	Keratin-associated protein 7-1
UBTF	Nucleolar transcription factor 1
KRT35	Keratin, type I cuticular Ha5
KRT6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A
KRTAP24-1	Keratin-associated protein 24-1
LAMP2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
PTCD1;ATP5J2;ATP5J2-PTCD1	ATP synthase subunit f, mitochondrial
KRT76	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral
HSPB1	Heat shock protein beta-1
S100A3	Protein S100-A3
KRT19	Keratin, type I cytoskeletal 19
TUBB2A;TUBB2B;DKFZp566F223	Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-2B chain

Název genu	Název proteinu
LMNA	Lamin-B1;Lamin-B2;Prelamin-A/C;Lamin-A/C
PPP2CA;PPP2CB	Serine/threonine-protein phosphatase;Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform;Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform
EPS15	Epidermal growth factor receptor substrate 15
RPS18	40S ribosomal protein S18
LYG2	Lysozyme g-like protein 2
PFN1	Profilin-1
CJ012	Uncharacterized protein C10orf12
APOB	Apolipoprotein B-100;Apolipoprotein B-48
GPNMB	Transmembrane glycoprotein NMB
NPAS1	Neuronal PAS domain-containing protein 1
C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial
DNAJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6
YPEL5	Protein yippee-like 5
KRT83	Keratin, type II cuticular Hb3
FHOD1 - FH1/FH2	FH1/FH2 domain-containing protein 1
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
CS	Citrate synthase;Citrate synthase, mitochondrial
FABP5	Fatty acid-binding protein, epidermal
HNRNPH2;HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2
NEU2	Sialidase-2
BTK	Tyrosine-protein kinase BTK
FAM26D	Protein FAM26D
H2AFY	Histone H2A;Core histone macro-H2A.1
DCC	Netrin receptor DCC
MDH2	Malate dehydrogenase;Malate dehydrogenase, mitochondrial

Název genu	Název proteinu
MUC19	Mucin-19
TGM3	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E;Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E 50 kDa catalytic chain
TUBA1C;TUBA1B;TUBA1A	Tubulin alpha-1C chain;Tubulin alpha-1A chain;Tubulin alpha-1B chain
HIST1H4H;HIST1H4A;HIST1H4L	Histone H4
AIM1	Absent in melanoma 1 protein
DSC3	Desmocollin-3
KAT5	Histone acetyltransferase KAT5
S100A14	Protein S100-A14
HEPHL1	Hephaestin-like protein 1
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
KRT34	Keratin, type I cuticular Ha4
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain;L-lactate dehydrogenase
KRT31	Keratin, type I cuticular Ha1
KRT38	Keratin, type I cuticular Ha8;Keratin, type I cuticular Ha7
KIAA1109	Uncharacterized protein KIAA1109
KRT33B	Keratin, type I cuticular Ha3-II
RNF39;HCGV	RING finger protein 39
RRP15	RRP15-like protein
DKFZp686M148;CSRP1	Cysteine and glycine-rich protein 1
PKP3	Plakophilin-3
TUBA1C;TUBA1B;TUBA1A;TUBA3E	Tubulin alpha-1C chain;Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-1A chain;Tubulin alpha-3C/D chain;Tubulin alpha-3E chain
DUSP14	Dual specificity protein phosphatase 14
HIST1H2BL;HIST1H2BM;HIST1H2BN	Histone H2B type 1-L;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F
YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta
OASL	2-5-oligoadenylate synthase-like protein

Název genu	Název proteinu
KRT33A	Keratin, type I cuticular Ha3-I
RPSA;LAMR1P15;RPSAP58	40S ribosomal protein SA
ALB	Serum albumin
MYO18A;hCG_27198	Unconventional myosin-XVIIIa
KRTAP19-5	Keratin-associated protein 19-5
CTNNB1	Catenin beta-1
KRT85	Keratin, type II cuticular Hb5
ANXA2P2	Annexin;Annexin A2;Putative annexin A2-like protein
EIF4A2;EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I;Eukaryotic initiation factor 4A-II
GRM2	Metabotropic glutamate receptor 2
PLCD1;DKFZp686K101	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-1
LGALS7	Galectin-7
RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1
HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein 2
KRT75	Keratin, type II cytoskeletal 75
PS1TP5BP1;ACTG1;ACTB;ACTA1	Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed
JUP	Junction plakoglobin
KRT4	Keratin, type II cytoskeletal 4
ANXA2;ANXA2P2	Annexin A2;Annexin;Putative annexin A2-like protein
KRT5	Keratin, type II cytoskeletal 5
RPL11	60S ribosomal protein L11
KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1
MRPS28	28S ribosomal protein S28, mitochondrial
LRRC15	Leucine-rich repeat-containing protein 15
NEB	Nebulin

Název genu	Název proteinu
KRT80	Keratin, type II cytoskeletal 80
UFM1	Ubiquitin-fold modifier 1
HRSP12	Ribonuclease UK114
KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9
ATP5B	ATP synthase subunit beta;ATP synthase subunit beta, mitochondrial
KRT13	Keratin, type I cytoskeletal 13
UBB;RPS27A;UBC;UBA52;UbC	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40;Ubiquitin;60S ribosomal protein L40;Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
SLC25A6;SLC25A5;SLC25A4	ADP/ATP translocase 3;ADP/ATP translocase 2;ADP/ATP translocase 1;ADP/ATP translocase 4
KRT39	Keratin, type I cytoskeletal 39
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic
LMNA	Prelamin-A/C;Lamin-A/C
PMVK	Phosphomevalonate kinase
LDHB	L-lactate dehydrogenase;L-lactate dehydrogenase B chain
LAMP1	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
GDPD3	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 3
NPC1	Niemann-Pick C1 protein
SELENBP1	Selenium-binding protein 1
PDCD5	Programmed cell death protein 5
GBP1	Interferon-induced guanylate-binding protein 1
KRT86	Keratin, type II cuticular Hb6
KRT38	Keratin, type I cuticular Ha8
SLC25A3	Phosphate carrier protein, mitochondrial
STOML2	Stomatin-like protein 2, mitochondrial
CALML3	Calmodulin-like protein 3
HNRNPH3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3

Název genu	Název proteinu
HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial;Long-chain enoyl-CoA hydratase;Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
HIST1H1C;HIST1H1E;HIST1H1D	Histone H1.2;Histone H1.4;Histone H1.3
PKP1	Plakophilin-1
KRT6B	Keratin, type II cytoskeletal 6B;Keratin, type II cytoskeletal 6C
BLMH	Bleomycin hydrolase
DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X
VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2
VSIG8	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 8
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
KRT81	Keratin, type II cuticular Hb6;Keratin, type II cuticular Hb3;Keratin, type II cuticular Hb1;Keratin-81-like protein KRT121P
LGALS3	Galectin-3
ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial;ATP synthase subunit alpha
KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10
CSNK1A1	Casein kinase I isoform alpha
KRT16	Keratin, type I cytoskeletal 16
FABP4;PMP2	Fatty acid-binding protein, adipocyte;Myelin P2 protein
PLP2	Proteolipid protein 2
KRT86	Keratin, type II cuticular Hb6;Keratin, type II cuticular Hb1
RPS2;OK/KNS-cl.7;rps2	40S ribosomal protein S2
HNRNPH1;HNRNPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H; N-terminally processed;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
KRT17	Keratin, type I cytoskeletal 17
PDCD6	Programmed cell death protein 6
MAGT1	Magnesium transporter protein 1
KRTAP13-2	Keratin-associated protein 13-1;Keratin-associated protein 13-2
HIST1H2AJ;HIST1H2AH;H2AFJ	Histone H2A type 1-J;Histone H2A type 1-H;Histone H2A;Histone H2A.J;Histone H2A type 2-C;Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 3

Název genu	Název proteinu
SERPINB13	Serpin B13
PLD3	Phospholipase D3
GBP2	Interferon-induced guanylate-binding protein 2
TXN	Thioredoxin
LOXHD1	Lipoxygenase homology domain-containing protein 1
TUBB2C;TUBB4B;TUBB4A	Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A chain
GDI2;GDI1	Rab GDP dissociation inhibitor beta;Rab GDP dissociation inhibitor alpha
PPP1CB;PPP1CA	Serine/threonine-protein phosphatase;Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit;Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit
TUBB	Tubulin beta chain
XDH	Xanthine dehydrogenase/oxidase;Xanthine dehydrogenase;Xanthine oxidase