



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Srovnání vybraných metod proteolytického štěpení se  
zaměřením na vzorky tylakoidní membrány**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Natálie Zemánková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2022

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Natálie Zemánková
Název práce	Srovnání vybraných metod proteolytického štěpení se zaměřením na vzorky tylakoidní membrány
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Ivo Chamrád, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Tato bakalářská práce je věnována srovnání vybraných metod proteolytického štěpení se zaměřením na vzorky tylakoidní membrány vyzolované z modelové rostliny huseníčku rolního ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ). Pro experimentální část byla vybrána metoda přípravy vzorku za pomoci membránového filtru (FASP). Na základě studia dostupných publikací bylo vybráno několik variant, s jejichž pomocí byly proteiny z tylakoidní membrány zpracovány, analyzovány pomocí LC-MS/M a získané výsledky byly poté vzájemně porovnány. Pro srovnání účinnosti zmiňované metody oproti donedávna běžně užívaným metodám proteolytického štěpení bylo také provedeno štěpení dané proteinové směsi v roztoku.
Klíčová slova	protein, proteomika, proteolytické štěpení, FASP, <i>Arabidopsis thaliana</i> , chloroplast, tylakoidní membrána
Počet stran	64
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Natálie Zemánková
Title of thesis	Comparison of selected protein digestion methods with a focus on thylakoid membrane samples
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of growth regulators
Supervisor	Mgr. Ivo Chamrád, Ph. D.
The year of presentation	2022
Abstract	This bachelor thesis is deals with the comparison of selected protein digestion methods, focusing on thylakoid membrane samples isolated from the model plant <i>Arabidopsis thaliana</i> . Namely, the filter-aided sample preparation (FASP) method was chosen for the experimental part. Based on the current literature, several variants of the method were selected and used for the digestion of thylakoid proteins, which were further analysed by LC-MS/MS. As a “golden standard”, in-solution digestion utilizing urea was also performed. The obtained results were then compared and discussed.
Keywords	protein, proteomics, proteolytic cleavage, FASP, <i>Arabidopsis thaliana</i> , chloroplast, thylakoid membrane
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Iva Chamráda, Ph. D. za použití literatury, kterou cituji a uvádím v seznamu citované literatury.“

V Olomouci dne 11. 8. 2022

Podpis:



## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Ivovi Chamrádovi, Ph. D. za vstřícný přístup, ochotu a cenné rady, které mi v průběhu práce věnoval. Taktéž děkuji Mgr. Tereze Vánské za pomoc při výsevu a pěstování rostlinného materiálu a Mgr. Rénému Lenobelovi, Ph. D. za pomoc s analýzou vzorků pomocí LC-MS/MS.

# Obsah

CÍLE PRÁCE.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	11
1.1 Proteiny .....	11
1.2 Od genomiky k proteomice .....	11
1.3 Proteomika.....	12
1.4 Příprava vzorku pro proteomický výzkum.....	13
1.4.1 Homogenizace biologického materiálu .....	13
1.4.2 Extrakce a solubilizace proteinů .....	14
1.4.3 Odstranění nežádoucích látek ze vzorku .....	16
1.5 Štěpení proteinů.....	17
1.5.1 Denaturace, redukce a alkylace proteinů .....	18
1.5.2 Proteolytické štěpení.....	19
1.6 Nejčastější metody proteolytického štěpení .....	21
1.6.1 Štěpení proteinů v gelu .....	21
1.6.2 Štěpení proteinů v roztoku.....	21
1.6.3 Příprava vzorku za pomoci filtru .....	22
1.6.3.1 Příprava vzorku za pomoci filtru umožňující zachycení N-glykosylovaných peptidů.....	24
1.6.3.2 Příprava vzorku za pomoci filtru s vícenásobným enzymatickým štěpením.....	26
1.6.3.3 Příprava vzorku za pomoci filtru v přítomnosti polyethylenglykolu s aktivovanými thioley ..	27
1.6.3.4 Příprava vzorku fixovaného pomocí formalinu a zalitého parafínem za pomoci filtru .....	29
1.6.3.5 Modifikovaná příprava vzorku za pomoci filtru.....	30
1.6.3.6 Zdokonalená příprava vzorku za pomoci filtru.....	31
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	32
2.1 Chemikálie.....	32
2.2 Roztoky .....	33
2.3 Použitý materiál.....	34
2.4 Přístrojové vybavení.....	35
2.5 Metody.....	36
2.5.1 Výsev a pěstování huseničky rolního ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) .....	36
2.5.2 Izolace tylakoidních membrán.....	37
2.5.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu .....	37
2.5.2.2 Izolace chloroplastů a tylakoidních membrán .....	37
2.5.2.3 Měření koncentrace chlorofylů.....	37
2.5.3 Štěpení proteinů v roztoku.....	38

2.5.3.1	Extrakce proteinů z tylakoidní membrány .....	38
2.5.3.2	Kvantifikace proteinů pomocí 2-D Quant kitu .....	38
2.5.3.3	Redukce a alkylace proteinů v roztoku .....	40
2.5.3.4	Enzymatické štěpení proteinů v roztoku .....	40
2.5.4	Štěpení proteinů pomocí metody FASP .....	41
2.5.4.1	Extrakce a redukce proteinů z tylakoidní membrány v rámci metody FASP .....	41
2.5.4.2	Kvantifikace proteinů v rámci metody FASP: 2-D Quant kit .....	41
2.5.4.3	Promytí a alkylace proteinů na membráně .....	41
2.5.4.4	Enzymatické štěpení na membráně .....	42
2.5.4.5	Filtrace peptidů přes membránu .....	42
2.5.5	Příprava peptidů před MS analýzou .....	43
2.5.5.1	Přečištění peptidů na C18 reverzní fázi .....	43
2.5.5.2	Zahuštění a finální naředění eluátů .....	43
2.5.6	LC-MS/MS analýza .....	44
2.5.7	Zpracování získaných MS/MS dat .....	45
3	VÝSLEDKY .....	46
3.1	Extrakce proteinů .....	46
3.2	Metoda FASP a její zvolené varianty .....	47
3.2.1	Počet identifikovaných proteinů .....	47
3.2.2	Počet přiřazených peptidů .....	48
3.2.3	Počet MS/MS spekter .....	49
3.2.4	Pokrytí sekvence proteinů .....	50
4	DISKUZE .....	52
5	ZÁVĚR .....	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	57

## Seznam zkratek

ABC	Uhličitán amonný
ACN	Acetonitril
AMK	Aminokyselina/y
ArgC	Endoproteáza štěpící proteiny na C-koncové straně argininových zbytků
ArgN	Endoproteáza štěpící proteiny na N-koncové straně argininových zbytků
BSA	Hovězí sérový albumin
C18	Uhlovodíkový řetězec obsahující 18 uhlíků
CAM	Karboxyamidomethylcystein
CMC	Kritická koncentrace micel
DDA	Analýza závislá na datech
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DRSC	Detergent-odstraňující centrifugační kolonka
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol (2,3-dihydroxy-1,4-dithiolbutan)
E1-E6	Eluční roztok 1-6
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
eFASP	Zdokonalená příprava vzorku za pomoci filtru
ESI	Ionizace pomocí elektrospreje
FA	Kyselina mravenčí
FASP	Příprava vzorku za pomoci filtru
FASP 1	Metoda FASP využívající ve svém postupu 8M UA
FASP 2	Metoda FASP využívající ve svém postupu 6M UA a 2M thiomočovinu
FASP 3	Metoda FASP s navýšenými promývacími kroky využívající ve svém postupu 8M UA
FASP 4	Metoda FASP s navýšenými promývacími kroky využívající ve svém postupu 6M UA a 2M thiomočovinu
GluC	Endoproteáza štěpící proteiny na C-koncové straně glutamových zbytků
HEPES	Kyselina 2-4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-ethansulfonová
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamono]-1-propanesulfonát
Chls	Chlorofyly
nLC	Nanokapilární chromatografie
IAA	Jodacetamid

IS	V roztoku
LC	Kapalinová chromatografie
LysC	Endoproteáza štěpící proteiny na C-koncové straně lysinových zbytků
MED	Vícenásobné enzymatické štěpení
MeSH	2-merkaptoethanol
mFASP	Modifikovaná příprava vzorku za pomoci filtru
MS	Hmotnostní spektrometrie
N-glyko	N-glykosylované
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
PNGáza F	N-glykosidáza F
PTM	Posttranslační modifikace
Q	Kvadrupól
Q-TOF	Hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem délky letu
SDC	Deoxycholát sodný
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TAPEG	Polyethylenglykol s aktivovanými thioley
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin

## Cíle práce

Cíle bakalářské práce byly stanoveny následovně:

- Vypracovat rešerši na téma příprava vzorku v proteomice se zaměřením na moderní metody štěpení proteinů, konkrétně na metodu FASP.
- Vyzkoušet si práci s modelovou rostlinou *A. thaliana* (výsev, pěstování) a následně také techniky izolace tylakoidní membrány.
- Vyzkoušet vybrané varianty metody FASP pro proteinové vzorky pocházející z tylakoidní membrány.
- Interpretovat, porovnat a diskutovat získané výsledky.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Proteiny

Neodmyslitelnou součástí každého živého organismu jsou makromolekuly označované jako proteiny (neboli bílkoviny). Molekuly proteinů jsou ve srovnání s molekulami sacharidů či solí obvykle větší. Tvořeny jsou jedním či více polypeptidy, jejichž základní stavební jednotky představují aminokyseliny (AMK). Přirozeně vyskytující se AMK v bílkovinách jsou označovány jako proteinogenní a je jich známo dvacet jedna, i když ve většině proteinů se jich vyskytuje pouze dvacet. Jednotlivé AMK jsou vzájemně propojené pomocí peptidové vazby mezi aminoskupinou jedné AMK a karboxylovou skupinou jejího souseda. Peptidová vazba vzniká kondenzací, tedy reakcí, při níž ze dvou výchozích organických molekul vzniká za odštěpení nízkomolekulární sloučeniny (v tomto případě vody) jedna větší molekula. Délka této vazby činí přibližně 1.32 Å, je tedy kratší než vazba jednoduchá, ale delší než vazba dvojná (Alberts B. *et al.*, 2014).

Proteiny představují základní efekторы všech buněčných procesů a současně také zabezpečují kooperaci mezi jednotlivými buněčnými aktivitami. Zajišťují tak tedy v podstatě správný chod organismu. Proteiny s podobnou funkcí pak (většinou) mají i podobné složení a sekvenci AMK. Podle toho, kterých buněčných dějů se účastní, je dělíme do sedmi základních tříd, a to mezi proteiny strukturní, transportní, obranné, regulační, katalytické, motorové či zásobní (Berg J. *et al.*, 2015).

Funkce, případně aktivita proteinů musí být v buňce pečlivě regulována. To se děje na několika úrovních. První z nich je regulace celkové hladiny daného proteinu, která jednak probíhá již při transkripci, případně může být zajištěna pomocí různých posttranskripčních mechanismů (například alternativní sestřih nebo RNA interference). Stejně tak ale může být množství proteinu regulováno i pomocí cílené degradace. Dalším významným krokem, kdy dochází k modulaci proteinových funkcí, je při skládání polypeptidového řetězce a následných posttranslačních modifikací (PTM), které významně ovlivňují konformaci bílkovin. Správná funkce proteinu je v neposlední řadě také dána jeho lokalizací v buňce, tkáni či organismu (Cox, J., Mann, M., 2007; Balbuena T. S. *et al.*, 2011).

## 1.2 Od genomiky k proteomice

Vývoj metod molekulární biologie během sedmdesátých až osmdesátých let minulého století s sebou přinesl obrovskou pozornost spousty vědců z celého světa. V první řadě došlo

především k rozvoji odvětví, známého jako genomika, která se zabývá studiem genomu konkrétního organismu. Jedním z nejzásadnějších projektů byl poté Projekt sekvenování lidského genomu (anglicky *The Human Genome Project*), který oficiálně započal v říjnu roku 1990 (Collins F. S. *et al.*, 2003a; Collinsová M., Jiráček J., 2004). Cílem projektu bylo určit sekvenci DNA celého euchromatického lidského genomu, a to do patnácti let, přičemž první výsledky byly publikovány v únoru roku 2001 (Lander E. S. *et al.*, 2001). V dubnu roku 2003 bylo oznámeno jeho ukončení (Collins F. S. *et al.*, 2003b) při příležitosti 50. výročí od objevu dvoušroubovice DNA (Collinsová M., Jiráček J., 2004).

S rozvojem odvětví zabývajícím se geny se pak vědci začali opětovně zabývat také více do hloubky studiem proteinů, jelikož právě prostřednictvím nich je genetická informace v organismu vyjádřena.

### 1.3 Proteomika

Na přelomu osmdesátých a devadesátých let tak vznikla nová vědní disciplína zvaná proteomika. Proteomika se zabývá studiem proteomu a jejím obecným cílem je systematický rozbor proteinů v závislosti na jejich vlastnostech. Je tak bez pochyby schopna značně přispět k pochopení funkcí genů. Definic proteomiky existuje však celá řada.

Se samotným pojmem "proteom" přišel poprvé australský molekulární biolog Marc Raymond Wilkins, když jej představil v roce 1994 na vědecké konferenci Od genomu k proteomu (anglicky *From Genome to Proteome*) v italském městě Sieně (Godovac-Zimmermann J., 2008; Balbuena T. S. *et al.*, 2011). Název vznikl složením dvou slov, a to: "PROTEin" a "genOM". Proteom je možné definovat jako veškerý soubor proteinů exprimovaných v konkrétním čase a za daných podmínek v dané buňce, tkáni či organismu, obsahující také veškeré jejich posttranslační modifikace, vzájemné interakce a formy.

Za posledních několik let se díky dalšímu rozvoji molekulární biologie, genomiky, bioinformatiky, separačních a spektroskopických metod (především hmotnostní spektrometrie; MS) stala proteomika jednou z nejdynamičtějších věd (Chmelík J., 2005) a také silnou bioanalytickou základnou pro zodpovídání různých vědeckých otázek z oblasti medicíny (např. studium mechanismů příčin různých onemocnění, převážně zaměřené na oblast rakoviny), biologie, farmacie (výzkum léčiv, biomarkerů, cílů drog), či biochemie (Megger *et al.*, 2013).

Její velmi důležitým úkolem je objasnit role bílkovin v jednotlivých buněčných procesech a drahách. K tomu je však třeba znát molekulovou hmotnost daného proteinu,



tedy přesnou sekvenci AMK, ze kterých je protein sestaven, a případně i jeho možné posttranslační modifikace. Zde tedy proteomika stále neodmyslitelně navazuje na genomiku (Chmelík J., 2005).

## **1.4 Příprava vzorku pro proteomický výzkum**

Příprava vzorku patří mezi jeden z nejkritičtějších úkonů, se kterým se každý proteomik před samotnou finální analýzou setká (Ahmed F. E., 2009). Před přípravou vzorku je však nejdříve velmi důležité stanovit, co je cílem vlastní analýzy, a zvolit tak pro daný biologický materiál i vhodnou metodu a poté dodržovat doporučené podmínky. V tomto případě je asi nejdůležitějším kritériem, zda mají být proteiny získány v nativní podobě, tedy se zachovanou biologickou aktivitou, nebo mohou být pro daný experiment v denaturovaném stavu. Podle této skutečnosti pak například volíme teplotu, při které experimenty provádíme, typ homogenizace, použitá činidla atd. Pro úspěšnou proteomickou analýzu je také důležité chránit proteiny před vlivem endogenních proteáz, a to přidáním jejich inhibitorů. Endogenní proteázy totiž způsobují proteolýzu, což vede k rozkladu proteinů na peptidy a v extrémním případě až na jednotlivé AMK. Používanými inhibitory jsou například PMSF, EDTA, leupeptin, aprotin a řada dalších (Bodzon-Kulakowska A. *et al.*, 2007). Kromě proteolýzy je ve vybraných případech nutné zabránit i degradaci PTMs jako jsou například defosforylace proteinů, což se v tomto případě zajišťuje přidáním inhibitorů fosfatáz jako je například fluorid sodný nebo vanadičnan sodný.

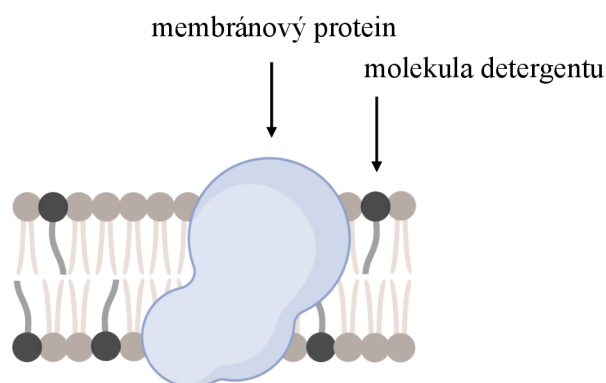
Ať už je ale zvolené experimentální schéma jakékoli, prvním krokem při samotné přípravě vzorku je vždy izolace proteinové směsi z vybraného biologického materiálu, která probíhá v následujících krocích: homogenizace a extrakce a solubilizace proteinů (Aebersold R., Mann M., 2016).

### **1.4.1 Homogenizace biologického materiálu**

Jak bylo napsáno výše, aby mohly být proteiny později převedeny do roztoku, je nutné nejdříve buňky používaného materiálu rozrušit, a to pomocí homogenizace. Ta hraje především u organismů s pevnou buněčnou stěnou (bakterie, archea, houby, řasy a rostliny) zásadní roli. Homogenizace může být provedena různými způsoby, mezi které patří např. homogenizace ultrazvukem, aplikací různých enzymů, opakovaným mražením a rozmrazováním, vysokým tlakem (např. French-press) nebo rozdrčením materiálu tloučkem v třecí misce s kapalným dusíkem (Pingoud A. *et al.*, 2002).

### 1.4.2 Extrakce a solubilizace proteinů

Po homogenizaci následuje extrakce a solubilizace proteinů. Nejčastěji používaná činidla, kterými je možno extrakci proteinů značně podpořit, jsou nazývána detergenty. Molekuly detergentů jsou tvořeny polární (hydrofilní) a nepolární (hydrofobní) částí, jsou tedy řazeny mezi látky amfipatické stejně tak jako i fosfolipidy tvořící buněčné membrány. Díky stejné povaze fosfolipidů a detergentů jsou detergenty po přidání do roztoku schopny interakce uvnitř membrány, a stát se tak její součástí (Obr. 1) za vzniku lipid-detergentových, protein-detergentových a lipid-protein-detergentových micel. To nastává při takzvané kritické micelární koncentraci detergentu, kdy tak dochází k rozrušení membrány, čímž je docíleno extrakce intracelulárních i transmembránových proteinů (Pingoud A. *et al.*, 2002).



Obr. 1: Fosfolipidová membrána (zobrazeno hnědou barvou) s membránovým proteinem a včleněnými molekulami detergentu (zobrazeno černou barvou). Vytvořeno v aplikaci BioRender (<https://biorender.com>).

Detergentů existuje celá řada a podle jejich charakteru se rozdělují do tří základních skupin, a to do iontových, neiontových a zwitteriontových.

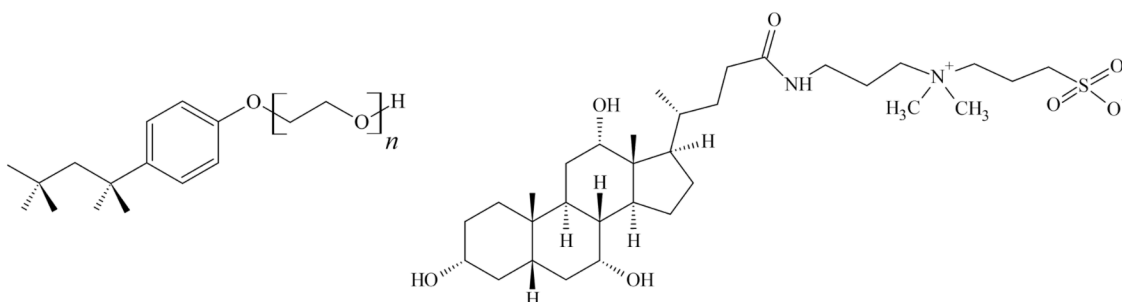
Nabitá část iontových detergentů nese buď kladný, či záporný náboj. Řadí se k silně denaturujícím činidlům a jedním z neznámějších zástupců je dodecylsulfát sodný (SDS).

Mezi neiontové detergenty, které na rozdíl od detergentů iontových nenesou žádný náboj, patří například digitonin, Triton X-100, Triton X-114, Zween 20 a Zween 80. Neiontové detergenty jsou běžně používány pro solubilizaci hydrofobních membránových proteinů, avšak nemají schopnost jejich denaturace a narušení protein-proteinových interakcí. Díky tomu je jejich užití vhodné při procesech, kdy je důležité zachovat strukturu proteinů v nativním stavu, a tedy i uchovat jejich původní aktivitu.

Kombinací vlastností iontových a neiontových detergentů jsou detergenty zwitteriontové neboli obojetné. Obojetné jsou nazývány, jelikož jejich molekuly obsahují

jak kladný, tak i záporný náboj a jejich celkový náboj je tak nulový. Denaturace způsobená obojetnými detergenty není tak účinná jako denaturace iontovými detergenty. Příkladem zwitteriontového detergentu je např. CHAPS (Reisinger V., Eichacker L. A., 2008).

Dalšími látkami, které se pro extrakci používají, jsou tzv. chaotropní činidla. Ta se do roztoku přidávají jak za účelem omezení elektrostatických interakcí, tak především pro přerušení nekovalentních vazeb (vodíkových můstků mezi karbonylovými a imidovými skupinami) v AMK, čímž dochází k rozpletení přirozené konformace proteinů čili k jejich denaturaci. Při práci s látkami tohoto typu, kterými jsou např. močovina, thiomočovina či guanidin hydrochlorid, je však třeba brát ohledy na pracovní teplotu, jelikož některé z nich patří mezi látky termolabilní a zvýšená teplota vede k jejich rozkladu na nežádoucí vedlejší produkty. Například u močoviny dochází při delších inkubacích při teplotách vyšších než 30 °C k jejímu postupnému rozkladu a vzniku reaktivních isokyanátových aniontů, které mohou náhodně modifikovat (přesněji karbamylovat) postranní řetězce AMK, což vede k nárůstu molekulové hmotnosti proteinu nebo peptidu, a takto značně komplikuje identifikaci proteinů pomocí MS analýzy.



Obr. 2: Strukturní vzorce detergentů; zleva: Triton X-100, CHAPS.

Pro zvolení vhodného detergentu a jeho koncentrace je důležitým faktorem charakter izolovaných proteinů, ale i kompatibilita činidla s metodami, které chceme v dalším postupu používat. Například v případě analýzy pomocí MS je vhodné volit činidla neiontová (např. Triton). Iontová činidla se také nedoporučují pro izoelektrickou fokusaci, a to právě kvůli jejich náboji, který může v průběhu fokusace narušit pH gradient a separaci tak negativně ovlivnit. Dalšími případy inkompatibility je např. vysoká koncentrace denaturujících činidel s enzymatickým štěpením proteinů či SDS elektroforéza, která nesnese vysoké koncentrace chaotropních činidel (Pingoud A. *et al.*, 2002). Pokud je ale použití interferujících činidel pro proteinovou extrakci a solubilizaci přeci jen nezbytné, případně pokud vzorek sám obsahuje velké množství takovýchto látek, je potřeba je ještě před dalšími kroky odstranit.

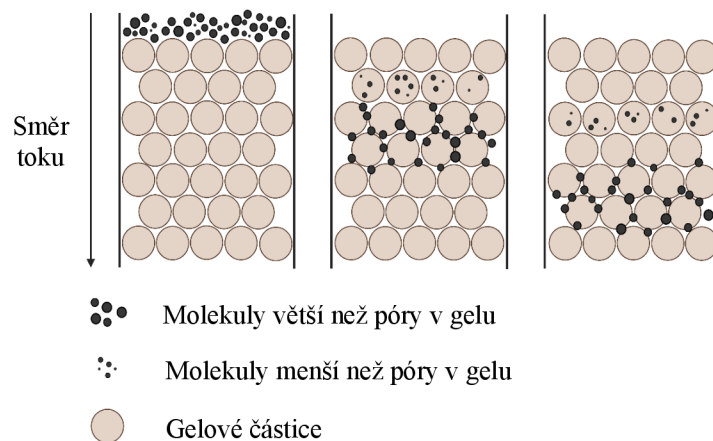
### 1.4.3 Odstranění nežádoucích látek ze vzorku

Odstraňovanými interferujícími látkami bývají především anorganické soli, respektive vznikající ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) a jiné látky, jako např. pigmenty, lipidy, nukleové kyseliny či přidané inhibitory proteáz, které by mohly rušit aktivitu později přidaného enzymu.

Jednou ze separačních metod sloužících k odstranění nechtěných molekul ze vzorku je dialýza. Principem metody je osmóza čili pasivní transport, při kterém skrze semipermeabilní membránu o různě velkých pórech difundují malé molekuly po koncentračním gradientu, a to do dialyzačního roztoku s mnohonásobně větším objemem, než je objem roztoku s proteiny na druhé straně membrány. Úplné minimalizace nečistot ve vzorku jsme schopni docílit opakovaným vyměňováním dialyzačního roztoku (Pientka Z., Palatý Z. (ed.), 2012).

Na podobném principu je založena i ultrafiltrace využívající ultrafiltrační membránu o vhodně zvolené velikosti pórů. Na rozdíl od dialýzy, která je založena na pasivním transportu molekul, je u ultrafiltrace k udržení stálého toku molekul skrze membránu potřeba využít určitého tlaku, často v rozpětí od 0,3-10 bar. Částice, které zůstávají zachycené membránou, se tak odvíjejí od průměru pórů. Obecně se volí membrány o velikosti pórů o desetinu větší, než je velikost molekul, které chceme od analytu oddělit (Pientka Z., Palatý Z. (ed.), 2012).

Další z využívaných metod pro čištění vysokomolekulárních látek (zejména proteinů) je gelová permeační chromatografie, pomocí které je separace jednotlivých molekul dosaženo taktéž v závislosti na jejich molekulové hmotnosti (Holding S. R., 1984). Směs v koloně prochází skrze stacionární fázi tvořenou malými gelovými kuličkami o definované velikosti pórů. Prostory stacionární fáze jsou vyplněny vhodným rozpouštědlem, tzv. mobilní fází (Kašpárková V., 2010). Molekuly o větší molekulové hmotnosti s částicemi dělicího materiálu neinteragují a jsou volně unášeny mobilní fází dál, kdežto molekuly menšího průměru jsou v průběhu sestupování kolonou zadržovány pórovitou hmotou gelu (Klouta P., 2003).



Obr. 3: Schéma gelové permeační chromatografie. Upraveno podle DRGP institute, 2018 v aplikaci BioRender (<https://biorender.com>).

K oddělení proteinů je dále možné využít metodu zvanou precipitace neboli vysrážení. Základním mechanismem této metody je taková změna rozpouštědla, která povede ke snížení rozpustnosti a následnému vysrážení proteinů (např. přidáním organického rozpouštědla nebo změnou pH). Rozpustnost proteinů závisí na uspořádání hydrofobních a hydrofilních AMK zbytků na jejich povrchu. Proteiny s vysokým obsahem hydrofobních AMK na povrchu jsou ve vodném rozpouštědle málo rozpustné. Hydrofilní povrchové zbytky proteinu naopak interagují s iontovými skupinami v rozpouštědle, a tím podporují jeho rozpustnost. Při srážení proteinů za pomoci organických rozpouštědel je třeba, aby bylo činidlo kompletně mísitelné s vodou. Příkladem organického rozpouštědla vhodného pro vysrážení proteinů je obvykle aceton, dále se můžeme setkat např. s methanolem či ethanolem (Pingoud A. *et al.*, 2002; Erde J. *et al.*, 2014).

## 1.5 Štěpení proteinů

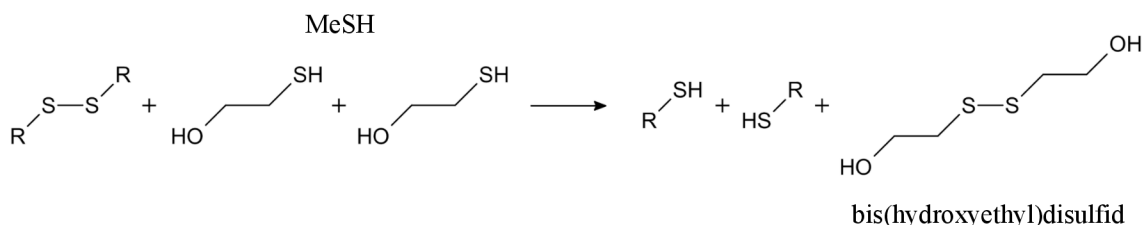
V předchozích kapitolách byly stručně popsány možnosti přípravy vzorku v proteomice, respektive její nejdůležitější body. Pro finální MS analýzu je však žádoucí pracovat s molekulami s nižší molekulovou hmotností, než jakou mají samotné proteiny. Z tohoto důvodu je před samotnou identifikací proteinů nutné provést jejich naštěpení na peptidy, a to buď neenzymaticky za využití chemikálií, nebo cestou enzymatickou prostřednictvím proteolytických enzymů (Switzar L. *et al.*, 2013). Jelikož se neenzymatické štěpení proteinů používá jen zřídka, v následujících kapitolách se budeme podrobněji věnovat enzymatické proteolýze. Nejprve si probereme její základní kroky a poté budou nastíněny konkrétní metodické postupy, které jsou v současnosti nejčastěji používány.

### 1.5.1 Denaturace, redukce a alkylace proteinů

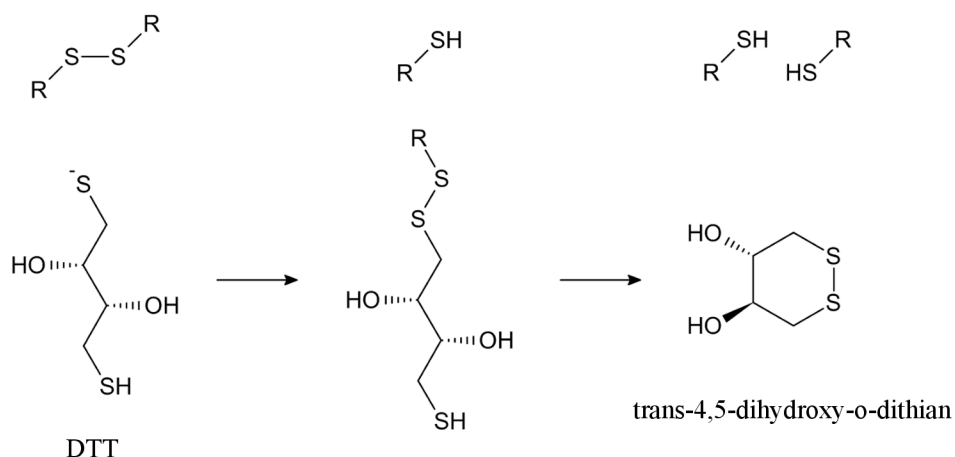
Při enzymatické proteolýze je z důvodu obtížné přístupnosti substrátu (jmenovitě daného štěpícího místa) u terciární struktury proteinu důležité jednotlivé proteiny nejprve denaturovat (Granvogl B. *et al.*, 2007a; Cleland W. W., 1964).

Denurací tedy dojde k rozpletení proteinů z jejich původní kvartérní či terciární struktury na strukturu primární, a to jednak rozrušením slabých vazebných interakcí (vodíkové můstky, van der Waalsovy síly), iontových vazeb, hydrofobních interakcí, elektrostatických interakcí a také kovalentních disulfidových vazeb molekul cystinů, které terciární strukturu značně stabilizují. Tím dochází k oddělení jednotlivých polypeptidů a k tzv. rozbalení proteinu, čímž je výsledná efektivita štěpení značně zvýšena. (Hale J. E. *et al.*, 2004).

V případě nekovalentních vazebných interakcí lze vazby přerušit s využitím již zmiňovaných chaotropních činidel a detergentů. Disulfidické můstky je možné rozrušit několika způsoby, redukční štěpení patří však mezi nejběžněji používanou metodu. Je prováděno v lehce zásaditém roztoku (~ pH 8), bez přítomnosti kyslíku a teplotě okolo 56-95°C. V minulosti byl nejpoužívanějším reduktantem 2-merkptoethanol (MeSH), jehož interakce s proteinem je znázorněna na Obr. 4. Ten je v dnešní době ale nahrazován zejména dithiothreitem (DTT) neboli Clelandovým činidlem, anebo izomerem dithiothreitolu – dithioerythreitem (DTE), a to z důvodu jejich nižší toxicity a vyššího redoxního potenciálu. Jelikož však DTT není schopné rozrušit cysteinové můstky uvnitř molekuly proteinu, musí proces redukce probíhat za denaturujících podmínek, a to například přidáním močoviny či SDS, jak již bylo uvedeno výše (kapitola 1.4.2). Redukce disulfidové vazby pomocí DTT probíhá jako dvoustupňová reakce, při níž dochází ke tvorbě cyklické termodynamicky stabilní sloučeniny trans-4,5-dihydroxy-o-dithianu, jak zobrazuje Obr. 5 (Cleland W. W. *et al.*, 1995; Simpson R. J., 2003).



Obr. 4: Redukce disulfidického můstku pomocí 2-merkptoethanolu. R – zbytek polypeptidového řetězce.



Obr. 5: Redukce disulfidického můstku pomocí dithiothreitolu. R – zbytek polypeptidového řetězce.

Jelikož jsou volné sulfhydrylové skupiny vysoce reaktivní, může dojít k jejich zpětné reoxidaci, čímž se protein vrací do původní struktury. Z tohoto důvodu je důležité na tyto skupiny navázat vhodná alkylační činidla, tedy látky, které přenášejí alkylové skupiny. Tento proces je označován jako tzv. alkylace (Hale J. E. *et al.*, 2004). Mezi nejčastěji používané alkylační činidlo patří jodacetamid, po jehož aplikaci se cysteinové zbytky jeví jako karboxyamidomethylcystein (CAM) se změnou hmotnosti přibližně +57 Da, čímž se specifická hmotnost AMK cysteinu zvýší z 103,009 Da na 160,031 Da. Alternativním alkylačním činidlem je například kyselina jodoctová (Granvogel B. *et al.*, 2007b; Switzer L. *et al.*, 2013).

V současné době byl vyvinut postup pro redukci a alkylation cysteinů v proteinech během jediného kroku, a to pomocí činidla sestávajícího z redukčního činidla triethylfosfinu, alkylačního činidla jodoethanolu a těkavého pufru uhličitanu amonného. Výhodou použití tohoto činidla je nižší počet kroků při zpracování a časově nenáročné odstranění přebytečných činidel (např. odpařením) a zároveň vykazuje v roztoku kompatibilitu s chaotropními činidly (Hale J. E. *et al.*, 2004).

Po denuraci, redukci a následné alkylation jsou proteiny připraveny ke štěpení typicky prostřednictvím některého z enzymů.

### 1.5.2 Proteolytické štěpení

Enzymatické štěpení je štěpení za využití některého z enzymů, nazývaných proteázy (taktéž peptidázy či proteinázy). Tyto enzymy, patřící do třídy hydroláz, štěpí peptidovou vazbu, a to buď na C- nebo N-konci polypeptidového řetězce (tzv. exoproteázy) nebo uvnitř řetězce

(tzv. endoproteázy) za účasti molekuly vody (Barrett A. J. *et al.*, 2014). Rozkladem proteinů pomocí specifické proteázy je získán definovaný počet charakteristických peptidů s danou molekulovou hmotností a tu lze poté využít v hmotnostní spektrometrii k jejich identifikaci.

K dispozici je pro tento účel široká škála proteáz (neboli peptidáz) (Switzar L. *et al.*, 2013). Každý enzym má své specifické podmínky pro to, aby byl aktivní. Je tedy třeba zajistit například optimální rozmezí teploty a pH reakčního pufru. Při překročení požadovaných hodnot by enzym totiž ztratil svoji stabilitu a proteolytickou aktivitu ztrácel. Důležité je i zvolit správnou koncentraci enzymu – poměr enzymu ku substrátu a dobu jeho inkubace. Dalším kritériem při výběru vhodného enzymu je jeho specifita, tedy schopnost rozrušení peptidové vazby mezi konkrétními AMK (López-Ferrer D. *et al.*, 2006).

Z výběru všech komerčně dostupných proteolytických enzymů je v proteomice nejvyužívanější proteázou trypsin, který byl shodou okolností také nejdříve objeveným enzymem tohoto typu. Trypsin je řazen mezi serinové endoproteázy čili enzymy štěpící proteiny uvnitř peptidového řetězce, stejně tak jako méně specifický chymotrypsin. Jedná se o enzym odolný vůči autolýze s přesně definovanou specifitou štěpení, a to na C-konci základních zbytků lysinu (Lys; K) a argininu (R; Arg) s výjimkou případů, kdy za nimi následuje nepolární AMK prolin (Pro; P). Jelikož jsou lysin i arginin v proteinech bohatě zastoupeny, vznikají štěpením pomocí trypsinu peptidy o průměrné délce ~ 14 AMK, které jsou vhodné pro MS analýzu. (Switzar L. *et al.*, 2013; Burkhardt J. M. *et al.*, 2012; Štosová T. *et al.*, 2005). Jelikož je trypsin vylučován do tenkého střeva, jeho optimální pH je mírně alkalické (~ pH 7-9) a optimální teplota odpovídá teplotě tělesné (37 °C).

Dalším proteolytickým enzymem, který je součástí trávicího traktu obratlovců – konkrétně žaludku, je pepsin. Pepsin patří mezi endopeptidázy aspartátové a jeho optimální pH se odvíjí od kyselého prostředí, ve kterém se nachází (~ pH 2-4) (Štosová T. *et al.*, 2005). Na rozdíl od trypsinu je kvůli své nižší specifitě méně využívaným enzymem pro účely MS analýzy. Výsledným produktem nespecifických proteáz je totiž vysoký počet krátkých peptidů, což komplikuje jednak jejich detekci pomocí MS, ale hlavně jejich úspěšnou identifikaci, jelikož takto krátké peptidy mohou být často společné pro více proteinů (Switzar L. *et al.*, 2013).

Přehled dalších možných alternativ trypsinu, mezi které patří například endoproteáza GluC, LysC, ArgN, ArgC, je uveden v Tab. 1.



Tab. 1: Přehled proteáz používaných v proteomice (Štosová T. *et al.*, 2005).

Enzym	Místo štěpení	Výjimka	Rozsah pH
Trypsin	C-konec R-X, K-X	X = P	7,0-9,0
Chymotrypsin	C-konec F-, Y-, W-, L-, I-, V-, M-X	X = P	7,5-8,5
Endoproteáza GluC	C-konec E-X, D-X	X = P	4,0-8,0
Endoproteáza LysC	C-konec K-X	(X = P)	8,5-8,8
Endoproteáza ArgC	C-konec R-X	(X = P)	7,5-8,5
Endoproteáza AspN	N-konec X-D, X-E		6,0-8,5
Elastáza	C-konec A, V, L, I, G, S		8,5
Pepsin	F, M, L, W (zvl. F-L, F-F, F-Y)		2,0-4,0
Pronáza	Téměř všechny peptidové vazby		7,0-8,0 <sup>A</sup>
Subtilisin	C-konec nenabitě AMK		7,0-11,0
Thermolysin	W, Y, F, I, L, V, A, M (zvl. N-konec X-F, X-L)		6,0-10,0

<sup>A</sup> V závislosti na povaze směsi

## 1.6 Nejčastější metody proteolytického štěpení

### 1.6.1 Štěpení proteinů v gelu

Mezi často používanou metodu patří štěpení proteinů v gelu, která využívá separace extrahovaných proteinů pomocí SDS-PAGE. Štěpení proteinů v gelu má ale několik nevýhod, mezi které patří kupříkladu limitující velikost použité proteázy, a to z důvodu neschopnosti proteáz s vyšší molekulovou hmotností do gelu, což má za následek slabé naštěpení proteinů na peptidy. Dalším negativem, se kterým se u této metody můžeme setkat je nízká výtěžnost získaných peptidů z gelové matrice (Wiśniewski J. R., 2019).

### 1.6.2 Štěpení proteinů v roztoku

Další možnou alternativou je štěpení proteinů v roztoku, které je uskutečněno čtyřmi základními kroky, a to denurací, redukcí, alkylací a samotným enzymatickým štěpením, přičemž prvními třemi kroky jsou vytvořeny vhodné podmínky právě pro enzymatickou aktivitu používaných proteáz. V rámci této metody se pro extrakci a denuraci proteinů používají nejčastěji močovina či guanidin-hydrochlorid (případně i thiomčovina). Metoda v roztoku s sebou ale také přináší různé nevýhody. Jednou z nich je např. kontaminace peptidového vzorku použitými činidly (např. zbytky chaotropních, redukčních a alkylačních činidel či autolytické peptidy použitého enzymu). Dále se můžeme setkat s častou

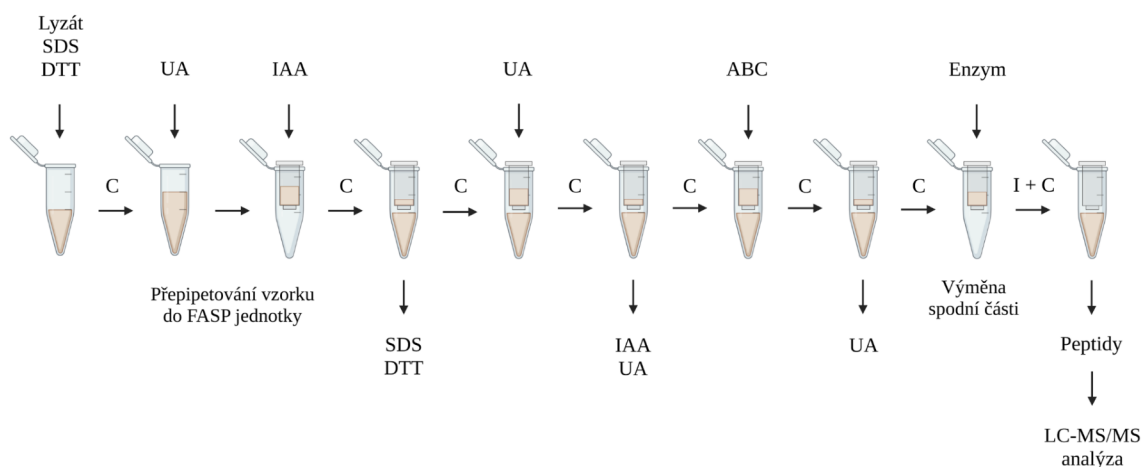
přítomností peptidů s vynechaným štěpným místem, která je způsobena nedostatečnou denaturací proteinu při využití některého ze zmíněných chaotropních činidel bez detergentu (Wiśniewski J. R., 2019).

### 1.6.3 Příprava vzorku za pomoci filtru

Příprava vzorku za pomoci filtru neboli zkráceně FASP (z anglického "*Filter-Aided Sample Preparation*") je univerzální a účinná metoda, která byla vytvořena za účelem zpracování proteinových extraktů, jejichž součástí jsou detergenty, ve většině případů SDS. U FASP, na rozdíl od ostatních přístupů, je k odstranění SDS využit odstředivý systém, nazýván jako ultrafiltrační FASP jednotka (anglicky "*ultrafiltration FASP unit*"). Ta obsahuje celulosovou membránu s definovanými póry, která umožňuje účinnou výměnu pufrů a s tím i odmytí detergentu. Díky tomu jsou také eliminovány značné ztráty vzorku, ke kterým může docházet například u srážení proteinů nebo u extrakce na pevné fázi (Wiśniewski J. R., 2019). Tím pádem může být SDS použit pro proteinovou extrakci, což je výhodné zejména pro proteiny hydrofobního charakteru, jejichž problematickou rozpustnost SDS řeší rozrušením lipidové membrány za tvorby micel. Detergent je následně schopen také interakce s hydrofobním jádrem proteinu, čímž ho navíc denaturuje (Kachuk C., Doucette A. A., 2018).

Metoda FASP byla poprvé prezentována roku 2009 *J. R. Wiśniewskim a kol.* v návaznosti na práci metody "spin filter", jejíž představení proběhlo roku 2005 *L. Manzou a kol.* Tkáňové či buněčné lyzáty připravené za vysoké koncentrace SDS jsou za účelem rozrušení disulfidických můstků nejprve vystaveny působení některého z redukčních činidel, často využívaný je např. DTT nebo TCEP. Po extrakci a redukci proteinů je třeba vzorek naředit, standardně pomocí 8M močoviny, tak, aby byla snížena kritická micelární koncentrace (CMC) detergentu. Tím je dosaženo rozpadu micel a komplexů protein-detergent, v důsledku čehož mohou molekuly detergentu snadno projít skrze filtrační membránu, a tak je docíleno jeho odstranění. Volné thiolové skupiny je následně potřeba ošetřit alkylačním činidlem, jak je již uvedeno v kapitole 1.5.1. Na závěr celé přípravy je na proteiny v prostředí vhodného pufru aplikována endoproteáza, typicky trypsin. Naštěpené peptidy jsou po inkubaci propuštěny skrze filtr a získáváme tak peptidovou směs jako ultrafiltrát, přičemž výtěžek peptidů odpovídá zhruba 50-70 % původního množství proteinů (Wiśniewski J. R., 2016; Wiśniewski J. R. *et al.*, 2011a; Wiśniewski J. R. *et al.*,

2009). Zjednodušené schématické znázornění postupu metody FASP můžeme vidět na Obr. 6.



Obr. 6: Schématické znázornění postupu metody FASP. ABC – 50 mM uhličitan amonný, DTT – dithiothreitol, IAA – jodacetamid, SDS – dodecylsulfát sodný, UA – močovina, C – centrifugace, I – inkubace. Vytvořeno v aplikaci BioRender (<https://biorender.com>).

Důležitým parametrem pro efektivní zpracování vzorku je nepochybně výběr vhodné ultrafiltrační centrifugační jednotky, který se v rámci metody FASP využívá. V praxi se setkáme se dvěma typy jednotek, a to s jednotkami "Microcon", které mají filtry uspořádané horizontálně (viz Obr. 7 vlevo), a s jednotkami "Amicon Ultra" (viz Obr. 7 vpravo) s ultrafiltračními membránami umístěnými po jejich stranách (Lipecka *et al.*, 2016; Wiśniewski J. R., 2016). Jako výkonnější byly prokázány jednotky "Microcon", což se zřejmě odráží na tzv. větším „prázdném objemu“ u jednotek "Amicon Ultra", který zpomaluje odstranění detergentu. Kromě toho i větší vnitřní povrch "Amicon Ultra" jednotek s nevratnou adsorpcí patrně souvisí s nižší výtěžností proteinů (Wiśniewski J. R., 2017).



Obr. 7: Komerčně dostupné ultrafiltrační jednotky. Vlevo: "Microcon", Vpravo: "Amicon Ultra". A – svrchní část jednotky, B – spodní část jednotky. Staženo z <https://www.ubuy.mv/en/>; <https://www.fishersci.se/se/en/home.html>.

Filtry jsou podle poréznosti membrány přijatelné pro proteiny odpovídající různé molekulové velikosti. Metoda byla v jejich počátcích vyvinuta s použitím filtračních membrán s malými póry s mezními hranicemi molekulových hmotností: 3 000 a 10 000 Da (3 a 10 kDa). Později se však ukázalo, že použití ultrafiltračních jednotek s nízkými mezními hodnotami je nepraktické z důvodu zvýšené retence delších peptidů a pomalejšího toku filtračním zařízením, který celý proces přípravy vzorku značně prodlužoval. Z tohoto důvodu jsou dnes doporučovány především 30 kDa filtry, které stále účinně zadrží denaturované proteiny, ale zamezí nechtěným ztrátám peptidů. Mezi další výhody 30 kDa filtrů patří taktéž snížení doby nutné pro centrifugaci (přibližně 3krát) a odstředivé síly z 14 000 g na 10 000 g, čímž se eliminuje riziko jejich protržení (Wiśniewski J. R., 2016; Wiśniewski J. R. *et al.*, 2011).

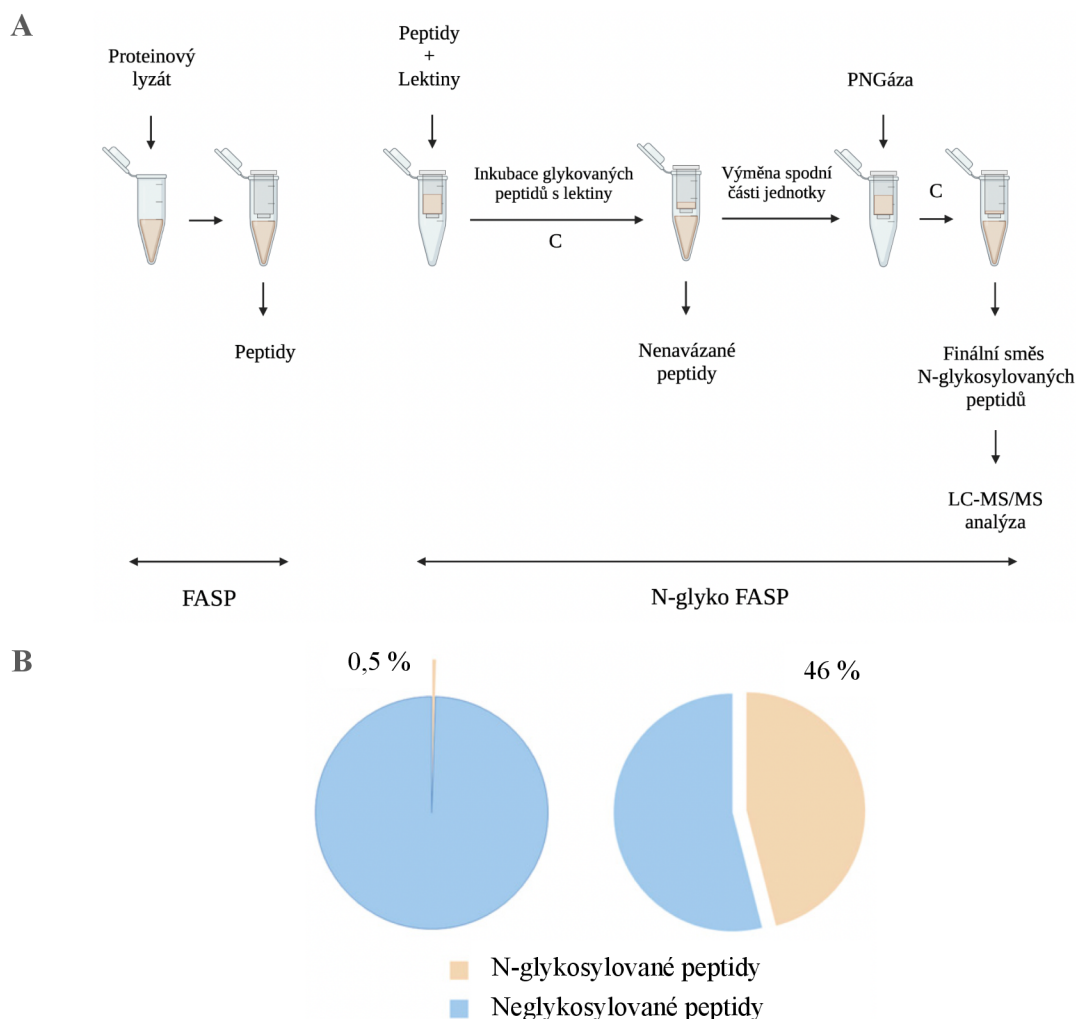
Dalším studovaným aspektem byla kapacita filtračních jednotek, kdy nejvyšší výtěžnost vykazovalo použití vzorků obsahujících do 100 µg celkové proteinové složky. Při použití vyšších množství byl pozorován kontinuální pokles výtěžku – např. u 400 µg byl pokles až poloviční oproti doporučené hranici 100 µg (Wiśniewski J. R., 2016).

Kromě celkového množství proteinů pak výsledek štěpení pro metodu FASP kriticky ovlivňují i další parametry vzorku, a to především celkové množství SDS, respektive jeho poměr ku proteinům. Doporučený poměr je 2:1, mezní poměr při použití trypsinu potom 4:1 až 6:1. Vyšší množství detergentu se již nedoporučuje, protože by bylo velmi problematicky odstranitelné, a následně by mohlo interferovat s trypsinovou aktivitou. Pro kvantitativní extrakci proteinů je nutné dosáhnout takové koncentrace SDS v extrakčním pufru, aby došlo ke tvorbě micel, tedy odpovídající jeho CMC. Ta je 0,2% (w/v), běžně se pak užívají koncentrace v rozmezí 1-4 % (w/v) (Wiśniewski J. R., 2019).

### **1.6.3.1 Příprava vzorku za pomoci filtru umožňující zachycení N-glykosylovaných peptidů**

Proteiny s navázanou cukernou složkou, tzv. glykoproteiny, tvoří přibližně polovinu přirozeně se vyskytujících proteinů. Proces glykosylace, probíhající v lumen endoplazmatického retikula a v Golgiho komplexu, tedy patří mezi jednu z nejběžnějších PTMs proteinů, která významně ovlivňuje jejich biologickou aktivitu a funkci (Aoki-Kinoshita K. F., 2022; Spiro R. G., 2002; Ruddock L. W., Molinari M., 2006). Glykany připojené na proteiny hrají podstatnou roli např. při sestavování proteinů či v dalších fyziologických procesech, jako je iontový transport, katalýza, buněčná imunita, regulace

růstu a vývoj organismu (Zielinska D. F. *et al.*, 2010; Herscovics A., 1999). Glykoproteiny jsou tak častým předmětem studia proteomickou analýzou.



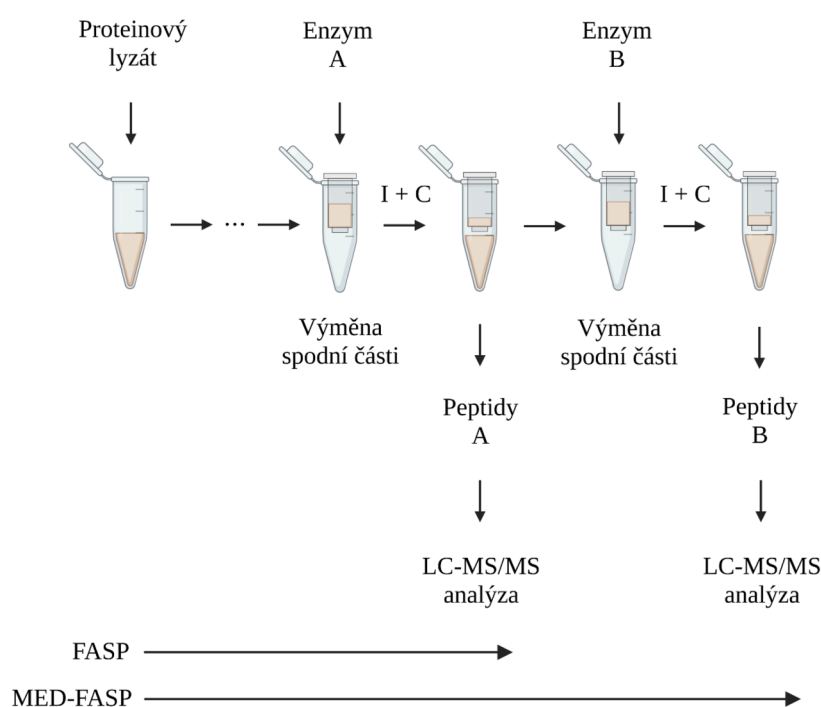
Obr. 8: A – Zjednodušené schéma postupu metody N-glyko FASP. C – centrifugace, LC-MS/MS – kapalinová chromatografie spojená s MS. B – Výtěžnost N-glykosylovaných peptidů, vlevo: bez použití PNGázy, vpravo: za použití PNGázy. Upraveno v aplikaci BioRender (<https://biorender.com>) podle Zielinska D. F. *et al.*, 2010.

Z důvodu častého výskytu glykosylačních míst u membránových proteinů, které jsou často obtížně analyzovatelné, byla vytvořena varianta metody FASP, pomocí které jsme schopni tyto proteiny velmi přesně mapovat. Touto variantou je tzv. N-glyko FASP („*FASP-based N-linked glycopeptide capture method*“; Obr. 8A). Počáteční kroky celého postupu jsou stejné jako u klasické metody FASP, kdy jsou proteiny naštěpeny v ultrafiltrační centrifugační jednotce na směs peptidů, po čemž následuje navázání glykosylovaných peptidů na afinitní matrici, kterou jsou v tomto případě lektiny. Poté dojde k centrifugaci, kdy neglykosylované peptidy projdou skrze filtr do spodní části jednotky, a směs komplexů

N-glykovaný peptid-lektin je zachycen na filtru díky sférickému tvaru lektinů. Pro rozrušení těchto komplexů je ke směsi na filtru přidán deglykosylační enzym PNGáza, bez kterého by finální výtěžek z původní složky N-glykovaných peptidů činil jen přibližně 0,5 %. Oproti tomu při jeho použití a následné centrifugaci získáme směs N-glykosylovaných peptidů se zhruba stonásobně vyšším obohacením (viz Obr. 8B). Finální směs peptidů se poté analyzuje pomocí LC-MS/MS (Zielinska D. F. *et al.*, 2010).

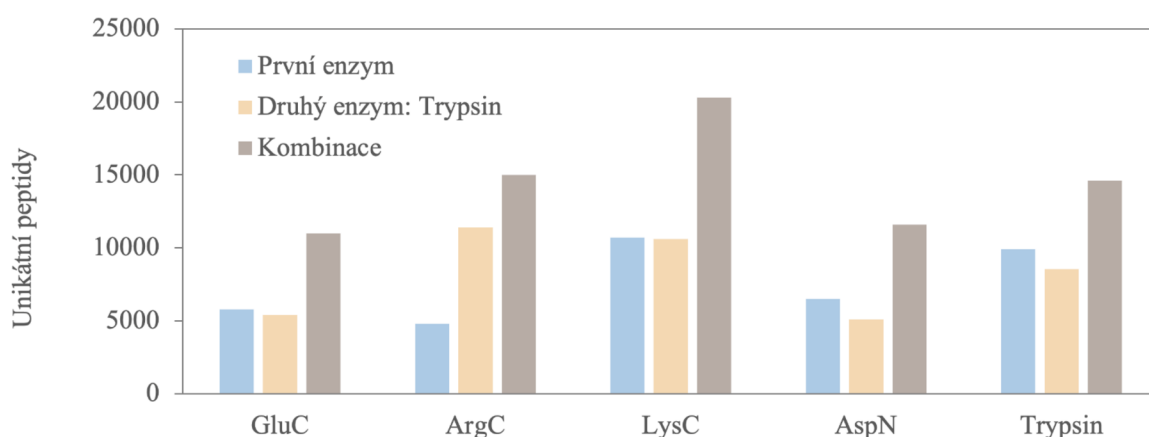
### 1.6.3.2 Příprava vzorku za pomoci filtru s vícenásobným enzymatickým štěpením

Jak již bylo popsáno v kapitole 1.6.3, ve standardním postupu metody FASP se pro zpracování proteinové směsi využívá jediný enzym, typicky trypsin. Můžeme se však také setkat s postupem s rozšířeným enzymatickým štěpením, kdy jsou proteiny vystaveny působení více enzymů (běžně dvou, ale i více) po sobě – tzv. MED-FASP (z ang. "*Multi-Enzyme Digestion FASP*"). Zjednodušený postup MED-FASP metody zobrazuje Obr. 9.



Obr. 9: Schématické znázornění rozšíření metody MED-FASP. C – centrifugace, I – inkubace. Vytvořeno v aplikaci BioRender (<https://biorender.com>).

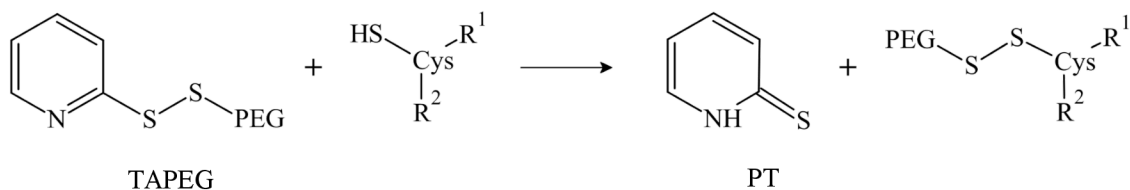
Hlavními výhodami MED-FASP jsou vyšší výtěžek a nižší pravděpodobnost vynechání jednotlivých štěpných míst (Wiśniewski J. R., Mann M., 2012). Jak můžeme vidět z Obr. 10, nejvhodnější kombinací enzymů pro dosažení nejvyššího výtěžku peptidů jsou LysC a trypsin, kdy se po naštěpení proteinů LysC a eluci vzniklých peptidů zbylý proteinový materiál na filtru vystaví působení trypsinu. Rozdílné peptidové vzorky získané z jednotlivých štěpení jsou poté odděleně analyzovány LC-MS/MS (Wiśniewski J. R., Mann M., 2012; Wiśniewski J. R., Rakus D., 2014).



Obr. 10: Počet identifikovaných peptidů po provedení MED-FASP za použití několika kombinací vybraných proteáz. Upraveno podle Wiśniewski J. R., Mann M., 2012.

### 1.6.3.3 Příprava vzorku za pomoci filtru v přítomnosti polyethylenglykolu s aktivovanými thioley

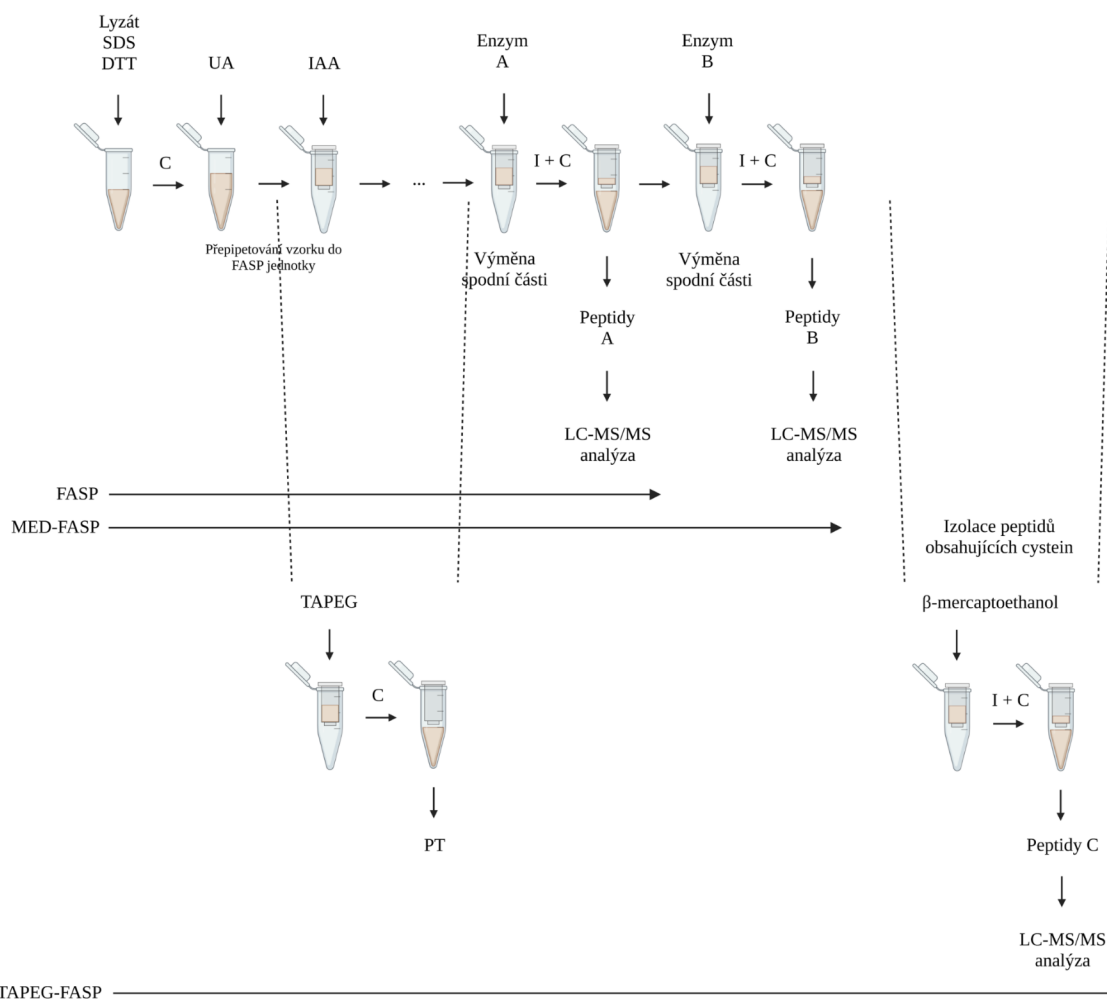
V kapitole 1.5.1 bylo popsáno, že přerušení disulfidových můstků a následná alkylace volných thiolových skupin patří mezi základní kroky proteomické přípravy vzorku. Alternativou k ošetření volných thiolových skupin jodacetamidem může být využití kovalentní chromatografie založené na principu navázání volných thiolových skupin na polyethylen glykoly (PEG) – tzv. PEGylace (viz Obr. 11), čímž je umožněna izolace peptidů obsahujících cystein. V praxi pak vede izolace těchto peptidů ke snížení složitosti vzorku a k usnadnění identifikace méně zastoupených proteinů. Modifikace FASP metody využívající k derivatizaci proteinů na cysteinových zbytcích PEG s aktivovanými thioley se označuje jako TAPEG-FASP ("*Thiol-Activated PolyEthylene Glycol FASP*") (Wiśniewski J. R., Prus G., 2015).



*Obr. 11:* Derivatizace volných sulfhydrylových skupin pomocí polyethylen glykolu s aktivovanými thioley (TAPEG); Cys – cystein, PEG – polyethylen glykol, PT – thionový tautomer pyridin-2-thiolu, R<sup>1,2</sup> – zbytky polypeptidového řetězce, TAPEG – polyethylenglykol s aktivovanými thioley. Upraveno podle Wiśniewski J. R., Prus G., 2015.

Jako výhodné se ukázalo také spojení metod MED-FASP a TAPEG-FASP, kdy postupným štěpením pomocí LysC a trypsinu získáváme dvě oddělené peptidové frakce, a nakonec redukcí disulfidových vazeb u peptidů obsahujících cystein a PEG umožňuje získat frakci třetí. Ve srovnání se samotnou metodou MED-FASP, kombinací MED-FASP s TAPEG-FASP jsme schopni identifikovat přibližně o 20-30 % více unikátních peptidů (Wiśniewski J. R., Prus G., 2015). Schématické znázornění postupu TAPEG-FASP můžeme vidět na Obr. 12.





Obr. 12: Schématické znázornění pracovních postupů metody: FASP, MED-FASP a TAPEG-FASP; C – centrifugace, I – inkubace, IAA – jodacetamid, LC-MS/MS – kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, UA – močovina, PEG – polyethylen glykol, PT – thionový tautomer pyridin-2-thiolu, TAPEG – polyethylen glykol s aktivovanými thioley. Upraveno v aplikaci BioRender (<https://biorender.com>) podle Wiśniewski J. R., 2017.

#### 1.6.3.4 Příprava vzorku fixovaného pomocí formalinu a zalitého parafínem za pomoci filtru

Při dlouhodobém uchování vzorků, především tak lidských tkání např. v nemocničních biobankách, je potřeba je upravit tak, aby nedošlo k jejich znehodnocení. Za tímto účelem jsou využívány stabilizační nebo též fixační činidla, která vyvolávají šetrnou denaturaci enzymů a tím vzorky konzervují proti vlastní autolýze. Příkladem takto ošetřených vzorků jsou tzv. "FFPE vzorky" ("*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*") čili vzorky fixované formaldehydem a zalité v parafínovém bločku.

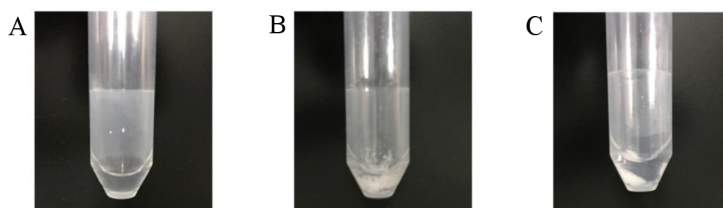
Pro proteomickou analýzu dlouhou dobu považována za jedinou vhodnou volbu byla čerstvá nebo zmrazená tkáň. Naopak použití tkáně chemicky ošetřené bylo z hlediska

analýzy příliš obtížné. FFPE materiál má však celou řadu předností jako je např. snadná manipulace, obrovský počet dostupných vzorků (např. z odvětví patologie) s možností jejich vzájemného porovnání a odolnost, která snižuje riziko degradace biologického materiálu, a s tím i spojené případné zkreslení výsledků (Ostasiewicz P., Wiśniewski J. R., 2017; Ostasiewicz P. *et al.*, 2010).

První návrh pracovního protokolu metody "FFPE FASP", který umožňoval účinnou izolaci z fixovaného materiálu, představil roku 2010 P. Ostasiewicz a kol. V první řadě je nutné FFPE vzorky nařezat na tenké tkáňové řezy (~ 4-10  $\mu\text{m}$ ), které se nanosou a uchytí za využití UV světla na povrch histologického sklíčka. Pro proteomickou analýzu je potřeba z těchto vzorků efektivně odstranit obsažené množství parafínu, což je uskutečněno deparafinací – promytím sklíčka v xylenu. Vzorek je poté rehydratován pomocí série různě koncentrovaných roztoků ethanolu (97, 80, 70 a 50%) ve vodě. Poté se vzorek vysuší ve vakuu a homogenizuje v přítomnosti Tris/HCl a SDS. Následně se homogenát inkubuje při teplotě ~ 99 °C, což zajistí přerušování methylenových můstků, které vznikly při fixaci formaldehydem. Dále je postup stejný jako u standardního protokolu FASP, popsáno v kapitole 1.6.3 (Ostasiewicz P. *et al.*, 2010; Gustafsson O. J. *et al.*, 2015).

### 1.6.3.5 Modifikovaná příprava vzorku za pomoci filtru

Modifikovaná příprava vzorku za pomoci filtru neboli zkráceně "mFASP" ("*modified Filter-Aided Sample Preparation*") je upravenou verzí FASP metody, od které se liší ve dvou hlavních bodech. Zaprvé se během štěpení proteinů trypsinem pro zvýšení aktivity enzymu přidává málo koncentrovaný (~ 0,4%) deoxycholát sodný (SDC). Po naštěpení proteinů trypsinem v přítomnosti SDC následuje buď okyselení roztoku 10% (v/v) kyselinou trifluoroctovou, čímž je v roztoku vytvořena bílá nerozpustná sraženina SDC, která se snadno odstraní centrifugací, nebo se před LC-MS/MS analýzou použije k odstranění detergentu tzv. "DRSC" (z ang. "*Detergent Removal Spin Column*") spinová kolona (Ni M. *et al.*, 2017). Průběh odstranění SDC okyselením znázorňuje Obr. 13.



Obr. 13: Odstranění SDC ze vzorku. A – dokončené štěpení trypsinem za přítomnosti SDC, B – vytvoření bílého precipitantu po okyselení vzorku, C – bílý pelet SDC na dně zkumavky po centrifugaci. Převzato z Ni M. *et al.*, 2017.

Při srovnání výtěžnosti metody mFASP využívající při štěpení SDC a DRSC kolonu a standardní metody FASP bylo zjištěno, že u mFASP bylo identifikováno vyšší množství peptidů, a to hlavně při použití DRSC kolon. Na základě této skutečnosti se předpokládá, že právě DRSC kolony jsou vhodné pro důkladné odstranění případně zbylého stopového množství detergentů (Ni M. *et al.*, 2017).

### 1.6.3.6 Zdokonalená příprava vzorku za pomoci filtru

S dalším upraveným postupem standardní FASP metody se můžeme setkat u tzv. zdokonalené přípravy vzorku za pomoci filtru neboli zkráceně eFASP ("*enhanced Filter-Aided Sample Preparation*"), která byla navržena jednak s cílem snížení ztrát vzorku, a také s navýšením výtěžnosti hydrofobních proteinů.

K tomuto účelu se jakožto mírný detergent používá kyselina deoxycholová, která jednak zlepšuje účinnost enzymatického štěpení u cytosolových i membránových proteinů, a také se dá následně jednoduše odstranit. Celková vyšší výsledná výtěžnost je navíc taktéž ještě podpořena pasivací membrány pomocí Tweenu 20, který znesnadňuje vazbu proteinů na povrchu filtračních membrán (Erde J. *et al.*, 2014, 2017).

## 2 Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

#### *Fluka (Spojené státy americké)*

- Močovina (UA)
- Thiomočovina
- Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP)

#### *GE Healthcare (Velká Británie)*

- 2-D Quant kit

#### *Lachner (Česká republika)*

- Sacharóza

#### *Merck (Německo)*

- Ethanol
- Methanol
- MS voda (ddH<sub>2</sub>O)
- Acetonitril (ACN)
- 2-propanol

#### *Promega (Spojené státy americké)*

- Sequencing Grade Modified Trypsin

#### *Serva (Německo)*

- Dodecylsulfát sodný (SDS)

#### *Sigma-Aldrich (Spojené státy americké)*

- Askorbát sodný
- Jodacetamid (IAA)
- Hydrogenuhličitan amonný
- Chlorid hořečnatý
- Chlorid sodný
- Hydrogenuhličitan amonný

- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)
- Kyselina 2-4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-ethansulfonová (HEPES)
- Kyselina mravenčí (FA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

## 2.2 Roztoky

### *Homogenizace rostlinného materiálu*

- Pufr A: 35 mM HEPES, 400 mM sacharóza, 400 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM askorbát sodný, 2 mg/ml BSA, pH 7,2

### *Izolace tylakoidních membrán*

- Pufr B: 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, pH 7,5
- Pufr C: 50 mM HEPES, 400 mM sacharóza, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2

### *Měření koncentrace chlorofylů*

- 80% (v/v) ACN

### *2-D Quant kit*

- Pracovní roztok: poměr Reagent A:Reagent B 100:1

### *Štěpení proteinů v roztoku*

- Extrakční pufr: 25 mM Tris/HCl, 6 M močovina, 2 M thiomočovina, pH 8,5
- Redukční roztok: 100 mM Tris/HCl, 25 mM TCEP, pH 8,5
- Alkylační roztok: 100 mM Tris/HCl, 330 mM IAA, pH 8,5
- 25 mM Tris/HCl, pH 8,5

### *Štěpení proteinů pomocí metody FASP*

- Extrakční pufr: 100 mM Tris/HCl, 2% (w/w) SDS, 5 mM TCEP, pH 7,6
- Promývací roztok A: 100 mM Tris/HCl, 8 M močovina, pH 8,5
- Promývací roztok B: 100 mM Tris/HCl, 6 M močovina, 2 M thiomočovina, pH 8,5
- Alkylační roztok A: 100 mM Tris/HCl, 8 M močovina, 50 mM IAA, pH 8,5
- Alkylační roztok B: 100 mM Tris/HCl, 6 M močovina, 2 M thiomočovina, 50 mM IAA, pH 8,5

- 25 mM Tris/HCl, pH 8,5

### ***Frakcionace peptidů na C18 reverzní fázi v uspořádání Stage Tip***

- Aktivační roztok: 2-propanol
- Ekvilibrační a promývací roztok: 5% (v/v) FA
- Eluční roztok 1: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 8% (v/v) ACN, pH 10
- Eluční roztok 2: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 12% (v/v) ACN, pH 10
- Eluční roztok 3: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 16% (v/v) ACN, pH 10
- Eluční roztok 4: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 20% (v/v) ACN, pH 10
- Eluční roztok 5: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 24% (v/v) ACN, pH 10
- Eluční roztok 6: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 48% (v/v) ACN, pH 10

### ***Mobilní fáze pro LC-MS/MS***

- Mobilní fáze A: 0,1% (v/v) FA
- Mobilní fáze B: 90% (v/v) ACN, 0,1% (v/v) FA

## **2.3 Použitý materiál**

### ***Dr. Maisch GmbH (Německo)***

- Reverzní fáze A (Reprosil-Pur 200 C18-AQ, 5 μm)
- Reverzní fáze B (Reprosil-Pur 200 C18-AQ, 3 μm)

### ***Eppendorf (Německo)***

- Automatické pipety (0,1-2,5 μl, 1-10 μl, 10-100 μl, 100-1000 μl, 0,5-5 ml)
- Pipetovací špičky (1-10 μl, 20 μl GELoader, 10-100 μl, 100-1000 μl)
- Mikrozukmavky (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)

### ***Hamilton (Spojené státy americké)***

- Hamiltonova jehla (průměr 16 G)

### ***Kimberly-Clark (Spojené státy americké)***

- Chemicky inertní laboratorní utěrky Kimwipes

***Merck Milipore (Irsko)***

- Filtrační jednotky Microcon Ultracel, YM – 30, cut off 30 kDa

***New Objective (Kalifornie – Spojené státy americké)***

- Kapilární předkolona (75 µm x 3 cm, IntegraFrit)
- Analytická kapilární kolona (50 µm x 20 cm, SilicaTip)

***Sigma-Aldrich (Spojené státy americké)***

- Solid Phase Extraction Disk – matrix active group C18 (oktadecyl)
- Kalibrované pH papírky P-4411 (rozsah: pH 1-14, pH 1-7, pH 7-14)
- Parafilm M

***Simax (Česká republika)***

- Skleněné odměrné válce
- Skleněné kádinky

***Waters (Spojené státy americké)***

- Skleněné vialky Total recovery

## **2.4 Přístrojové vybavení**

***Biochrom (Spojené státy americké)***

- Spektrofotometr WPA Lightwave II.

***BioSan (Spojené státy americké)***

- Magnetická míchačka MS-3000

***Bruker Daltonics (Německo)***

- Tandemový hmotnostní analyzátor Q-TOF vybaven ionizací elektrosprejem (ESI) (UHR-Q-TOF)

***Eppendorf (Německo)***

- Blokový termostat Thermomixer comfort
- Rotační vakuová odparka Concentrator plus

### ***IKA (Spojené státy americké)***

- Tyčový mechanický laboratorní homogenizátor T 25
- Třepačka Vortex 4 basic

### ***Ohaus (Švýcarsko)***

- Stolní centrifuga Frontier 5306

### ***Sartorius (Německo)***

- Laboratorní analytické váhy CPA225D – OCE

### ***Shinko Denshi (Japonsko)***

- Laboratorní váhy VIBRA

### ***Thermo (Spojené státy americké)***

- Centrifuga IEC CL31R Multispeed
- Systém nanokapilární chromatografie (nLC) (RSLCnano3000, Dionex)

### ***XS Instruments (Itálie)***

- Stolní pH metr pH50

## **2.5 Metody**

### **2.5.1 Výsev a pěstování huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*)**

Semena rostliny *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0), byla zasazena do předem sterilizované hlíny v několika květináčích (1 semeno na květináč). Květináče se zasazenými semeny byly uloženy do růstové komory (tzv. fytokomory). Podmínky osvětlení pro optimální růst byly stanoveny na světelný režim krátkého dne, 8 h den (od 7-15 h) a 16 h tma, přičemž intenzita osvětlení byla nastavena na  $110 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Rostliny byly pěstovány po dobu osmi týdnů při 22/20 °C a relativní vlhkosti 60 %. Během růstu byly rostliny pravidelně kontrolovány a zalévány vodou.



## **2.5.2 Izolace tylakoidních membrán**

### **2.5.2.1 Homogenizace rostlinného materiálu**

Osmítýdenní rostliny byly přesunuty z fytokomory do zatemněné laboratoře. Po 20minutové temnostní adaptaci probíhala všechna následující práce při tlumeném zeleném světle. Od rostliny byly odstříženy nejdříve celé listy, které byly posléze rozstříhány na jemnější kousky pro snadnější homogenizaci. Nastříhané kousky listů byly umístěny do homogenizační nádoby a poté zality 100 ml pufru A. Homogenizace rostlinného materiálu byla provedena za pomoci tyčového laboratorního homogenizátoru při 13000 otáčkách za minutu v pěti-vteřinových intervalech, které byly proloženy krátkými, asi patnáctivteřinovými přestávkami.

### **2.5.2.2 Izolace chloroplastů a tylakoidních membrán**

Homogenát byl přefiltrován přes nylonovou síťku do nové kádinky umístěné na ledu. Filtrát byl následně rovnoměrně rozdělen do čtyř centrifugačních zkumavek s kónickým dnem a byla provedena centrifugace za následujících podmínek: 5000 g, 6 min, 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován a získaný pelet byl pomocí štětečku rozsuspendován ve 2 ml vychlazeného pufru B. Po rozsuspendování peletu byl objem těchto čtyř zkumavek slit do dvou, které byly doplněny na výsledný objem 40 ml pufrem B. Byla provedena centrifugace, a to za podmínek: 5000 g, 10 min, 4 °C. Po skončení centrifugace byl supernatant odpipetován a pelet byl rozsuspendován ve 2 ml vychlazeného pufru C. Objem dvou zkumavek byl slit do jedné a následně doplněn na 40 ml pufrem C. Poté byla provedena poslední centrifugace: 5000 g, 10 min, 4 °C, po jejímž skončení byl supernatant odpipetován a pelet byl pomocí automatické pipety rozsuspendován v 1,5 ml pufru C. Výsledná suspenze s tylakoidními membránami byla přepipetována do nové mikrozkušavky, která byla zabalena do alobalu a při následné manipulaci skladována na ledu.

### **2.5.2.3 Měření koncentrace chlorofylů**

Byly připraveny čtyři 2ml mikrozkušavky, do kterých byly napipetovány 2 ml acetonu a 5 µl suspenze izolovaných tylakoidních membrán. Uzavřené mikrozkušavky byly vortexovány a poté centrifugovány za následujících podmínek: 10 000 g, 10 min, 4 °C. Supernatanty byly po skončení centrifugaci odpipetovány do nových mikrozkušavek. Objemy mikrozkušavek byly postupně přepipetovány do kyvety a na laserovém

spektrometru u nich byla změřena absorbance při vlnových délkách 470 nm (karotenoidy), 663,2 nm (chlorofyl *a*), 646,8 nm (chlorofyl *b*) a 750 nm (pozadí). Jako blank byl použit 80% vychlazený aceton.

Za pomoci Lichtenthalerových rovnic (Lichtenthaler, 1987) byla dopočítána koncentrace chlorofylu *a* a *b* (v  $\mu\text{g chl/ml}$ ) v suspenzi acetonového extraktu:

$$c_a = 12.25 \cdot (A_{663.2} - A_{750}) - 2.79 \cdot (A_{646.8} - A_{750}) = \textit{koncentrace chlorofylu a}$$
$$c_b = 21.50 \cdot (A_{646.8} - A_{750}) - 5.10 (A_{663.2} - A_{750}) = \textit{koncentrace chlorofylu b}$$

Suspenze byla po změření koncentrace chlorofylů rozdělena do 0,5ml mikrozkušavek na alikvoty, které obsahovaly 110  $\mu\text{g}$  celkových chlorofylů (25  $\mu\text{l}$ ). Alikvoty byly následně zmrazeny tekutým dusíkem a uskladněny při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  až do následného použití.

### **2.5.3 Štěpení proteinů v roztoku**

#### **2.5.3.1 Extrakce proteinů z tylakoidní membrány**

Náhodně vybrané tři alikvoty obsahující tylakoidní membrány byly po rozmražení centrifugovány za následujících podmínek: 1500 g, 4 min,  $-4\text{ }^\circ\text{C}$ . Supernatant byl odpipetován a k peletu bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  extrakčního pufru, ve kterém byl pelet pomocí pipety řádně rozsuspendován. Vzorky byly poté inkubovány v Thermomixeru za následujících podmínek: 1500 rpm, 1 hod,  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Následně byly vzorky opět centrifugovány za těchto podmínek: 15000 g, 10 min,  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Po centrifugaci byly supernatanty obsahující rozpuštěné proteiny přeneseny do nových 0,5ml mikrozkušavek a byl změřen jejich objem.

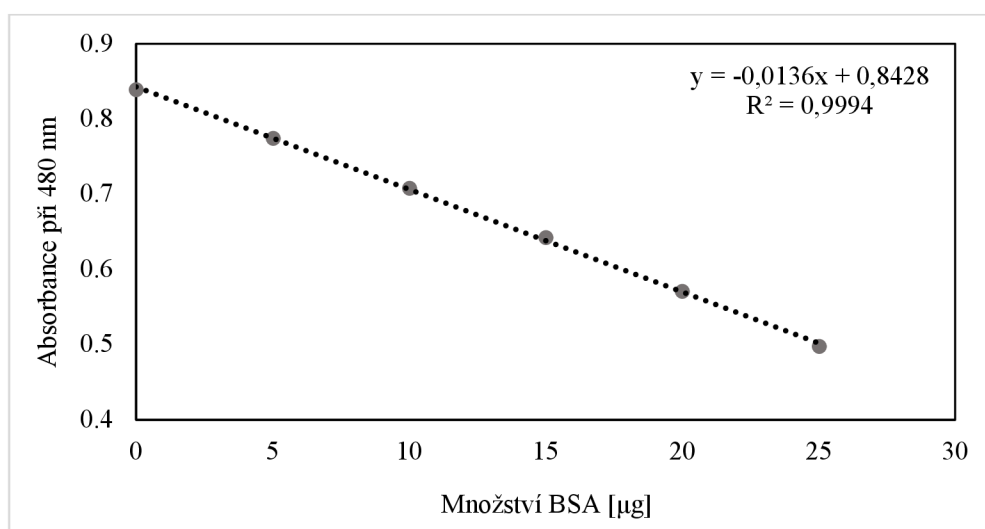
#### **2.5.3.2 Kvantifikace proteinů pomocí 2-D Quant kitu**

Nejdříve byl připraven pracovní roztok, a to smícháním reagentu A s reagentem B, v poměru 100 (A) : 1 (B). Poté byla ve dvou opakováních připravena kalibrační řada pomocí roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 2 mg/ml. Množství BSA pipetovaného do jednotlivých mikrozkušavek je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2: Kalibrační řada BSA.

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6
Množství BSA [ $\mu$ l]	0	5	10	15	20	25
Celkové množství proteinů [ $\mu$ g]	0	10	20	30	40	50

Ze tří připravených alikvotů obsahujících proteiny extrahované z tylakoidní membrány bylo odpipetováno 5  $\mu$ l do nových 2ml mikrozkušavek, a to vždy ve třech opakováních. Poté bylo ke všem vzorkům kalibrační řady i ke vzorkům proteinů přidáno 500  $\mu$ l roztoku precipitantu. Jednotlivé vzorky byly vortexovány a inkubovány 3 minuty při laboratorní teplotě. Poté bylo do všech mikrozkušavek přidáno 500  $\mu$ l co-precipitantu a vzorky byly opět promíchány za pomoci vortexu. Následně byly vzorky centrifugovány za těchto podmínek: 10 000 g, 5 min, 20 °C. Supernatant byl posléze opatrně odlit do odpadní kádinky a vzorky centrifugovány, v tomto případě však jen po dobu několika vteřin. Zbylý supernatant byl odstraněn pomocí pipety a k výslednému peletu bylo připipetováno 100  $\mu$ l roztoku mědi a 400  $\mu$ l vody. Vzorky byly intenzivně vortexovány a byl k nim připipetován 1 ml pracovního roztoku. Po opětovném provortexování byla provedena dvacetiminutová inkubace za laboratorní teploty. Následovalo měření absorbance jednotlivých vzorků při 480 nm pomocí laserového spektrofotometru. Jako blank byla použita voda. Výsledná kalibrační křivka je znázorněna na Obr. 14.



Obr. 14: Kalibrační křivka znázorňující závislost absorbance při 480 nm na množství BSA. Vynesené body reprezentují průměr hodnot ze dvou měření (z tohoto důvodu nejsou vyneseny chybové úsečky).

Z naměřených hodnot absorbancí byla za pomoci regresní rovnice dopočítána celková koncentrace a také celkové množství proteinů v analyzovaných vzorcích.

### **2.5.3.3 Redukce a alkylace proteinů v roztoku**

Na základě vypočítaných hodnot byly připraveny tři vzorky obsahující 20 µg proteinů. Jejich objem byl následně doplněn na 30 µl extrakčním pufrem a vzorky byly opatrně vortexovány. Poté byl připraven čerstvý roztok redukčního činidla tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP) o koncentraci 25 mM. Jelikož byla požadovaná finální koncentrace redukčního činidla ve vzorku obsahujícím proteiny 5 mM, bylo ho k jednotlivým vzorkům připipetováno 7,5 µl. Vzorky byly následně promíchány a inkubovány po dobu 30 minut v Thermomixeru při 1000 rpm a 20 °C.

Poté následovala alkylace proteinů pomocí čerstvě připraveného roztoku jodacetamidu (IAM) o koncentraci 330 mM. Alkylačního činidla bylo ke vzorkům se zredukovanými proteiny připipetováno 7,5 µl a výsledná koncentrace IAM v roztoku tak činila 55 mM. Vzorky byly vortexovány a inkubovány ve tmě po dobu 30 minut v Thermomixeru při 1000 rpm a 20 °C. Nakonec byly vzorky doplněny na finální objem 300 µl pomocí 25 mM Tris/HCl pH 8,5, čímž byla chaotropní činidla močovina a thiomočovina 10x naředěna a bylo tak zabráněno možné interferenci s aktivitou trypsinu. Poté byly vzorky vortexovány a proběhla kontrola jejich pH pomocí kalibrovaných pH papírků.

### **2.5.3.4 Enzymatické štěpení proteinů v roztoku**

K jednotlivým vzorkům, u kterých proběhla redukce i alkylace, byly připipetovány 2 µl roztoku trypsinu o koncentraci 0,5 µg · µl<sup>-1</sup> (výsledný poměr trypsinu ku proteinům: 1:20) a vzorky byly několikrát opatrně propipetovány. Poté byly v 5s intervalech jemně vortexovány a inkubovány do druhého dne v Thermomixeru za následujícího nastavení: 500 rpm a 37 °C. Po 24hodinové inkubaci byly vzorky až do dalšího zpracování umístěny do -20 °C (León I. R. *et al.*, 2013).

## **2.5.4 Štěpení proteinů pomocí metody FASP**

### **2.5.4.1 Extrakce a redukce proteinů z tylakoidní membrány v rámci metody FASP**

Extrakce proteinů z tylakoidních membrán byla v rámci metody FASP provedena obdobně, jako je uvedeno v kapitole 2.5.3.1 o extrakci proteinů před štěpením v roztoku, s výjimkou extrakčního pufru, který měl v tomto případě odlišné složení. Pro tuto metodu byl zvolen extrakční pufr obsahující 100 mM Tris/HCl pH 8,5, 2% (w/w) SDS a 5 mM TCEP, přičemž vypočtený poměr SDS ku proteinům byl 3,8:1.

### **2.5.4.2 Kvantifikace proteinů v rámci metody FASP: 2-D Quant kit**

Stejně tak jako u metody štěpení proteinů v roztoku (popsáno v kapitole 2.5.3.2) bylo i u metody FASP po extrakci proteinů z tylakoidních membrán provedeno jejich stanovení pomocí 2-D Quant kitu, čímž byla zjištěna koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

### **2.5.4.3 Promytí a alkylace proteinů na membráně**

#### ***Standardní provedení***

Do filtračních jednotek Microcon YM-30 s hodnotou cut-off 30 kDa byl napipetován objem vzorků odpovídající 20 µg celkových proteinů. Pro variantu A (varianta s močovinou) bylo poté ke vzorku připipetováno 200 µl promývacího roztoku A, u varianty B (varianta založená na kombinaci močoviny a thiomčoviny) pak 200 µl promývacího roztoku B. Vzorky byly následně inkubovány v Thermomixeru nastaveném na: 1 min, 750 rpm a 20 °C. Následovala centrifugace po dobu 15 min při 10 000 g a 20 °C. Celý krok byl u obou variant zopakován pouze s následujícími rozdíly: objem promývacích roztoků byl 100 µl, a centrifugace probíhala po dobu 20 min. Permeát byl posléze odlit do odpadní kádinky.

K retentátu bylo poté přidáno 100 µl příslušného alkylačního roztoku (A a B). Vzorky byly následně umístěny do Thermomixeru se stejným nastavením rychlosti míchání i teploty, kde byly inkubovány po dobu 20 min ve tmě. Po inkubaci vzorků byla provedena 10minutová centrifugace při 10 000 g a 20 °C. Následující kroky byly poté provedeny dvakrát: napipetování 100 µl příslušných promývacích pufrů (promývací pufr A a B) k odpovídajícím vzorkům, promíchání vzorků na Thermomixeru (750 rpm, 1 min, 20 °C) a centrifugace (10 000 g, 10 min, 20 °C). U obou variant pak bylo k retentátu napipetováno 100 µl 25 mM Tris/HCl pH 8,5, vzorky byly promíchány v Thermomixeru (750 rpm, 1 min, 20 °C) a centrifugovány (10 000 g, 5 min, 20 °C).

Ke všem vzorkům bylo dále připipetováno 50  $\mu\text{l}$  25 mM Tris/HCl pH 8,5 a bylo provedeno jejich promíchání v thermomixeru (1000 rpm, 5 min, 20 °C).

#### ***Provedení s navýšeným počtem promývacích kroků***

Paralelně byla provedena i druhá verze celého postupu, kdy byly u obou popsaných variant navýšeny počty jednotlivých promývacích kroků. Konkrétně se jednalo o následující změny. Promývacích roztoků bylo pro první promytí pipetováno dvakrát vyšší množství, tedy 200  $\mu\text{l}$ . Po alkylosti a centrifugaci vzorků byly provedeny tři promývací kroky (na rozdíl od standardního provedení, kdy byly promývací kroky provedeny dva). Třikrát bylo provedeno taktéž promytí pomocí 100  $\mu\text{l}$  25 mM Tris/HCl pH 8,5.

#### **2.5.4.4 Enzymatické štěpení na membráně**

Po redukci a alkylosti proteinů následovalo jejich naštěpení, a to enzymaticky pomocí trypsinu. Toho bylo k jednotlivým proteinovým vzorkům připipetováno 2  $\mu\text{l}$  o koncentraci 0,5  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , tudíž jeho zastoupení ve vzorku vzhledem k proteinům odpovídalo 1:20. Proběhlo rychlé promíchání vzorků v Thermomixeru (1 min, 1000 rpm, 20 °C), do Thermomixeru byl pro zvýšení vlhkosti přidán navlhčený brousek a následovala inkubace přes noc při 500 rpm a 37 °C.

#### **2.5.4.5 Filtrace peptidů přes membránu**

Po enzymatickém štěpení byly vzorky vytaženy z Thermomixeru, krátce centrifugovány na nízké otáčky pomocí stolní centrifugy a poté opět promíchány v Thermomixeru při nastavení: 750 rpm, 5 min, 20 °C. Následovala centrifugace za podmínek: 10 000 g, 5 min, 20 °C.

Po centrifugaci bylo k retentátu připipetováno 100  $\mu\text{l}$  25 mM Tris/HCl. Vzorky byly opět promíchány v Thermomixeru při: 750 rpm, 5 min, 20 °C a zcentrifugovány při: 10 000 g, 5 min, 20 °C. Tento krok byl ještě jednou zopakován.

Na závěr byl filtrát obsahující vzniklé peptidy přepipetován ze sběrné mikrozkušavky do předem označené vialky a byl pipetováním by změřen jeho objem. Všechny vzorky byly následně uskladněny v -80 °C.

## **2.5.5 Příprava peptidů před MS analýzou**

### **2.5.5.1 Přečištění peptidů na C18 reverzní fázi**

#### ***Příprava a aktivace C18 Stage Tips***

Z C18 disku byly za použití Hamiltonovy jehly o průměru 16 G vykrojeny dvě fritky, které byly následně vpraveny do zastříhnuté žluté špičky (10-100  $\mu$ l). Tímto způsobem byla připravena mikrokolonka, která byla dále vložena do otvoru ve víčku 1,5ml mikrozkušavky.

Do mikrokolonky bylo napipetováno 50  $\mu$ l 2-propanolu a poté byla provedena 3,5minutová centrifugací při nastavení 3000 g a 20 °C. Předchozí krok byl zopakován ještě jednou. Kolonka byla následně obdobným způsobem ve dvou krocích ekvilibrována 50  $\mu$ l 5% (v/v) FA (nastavení centrifugace bylo: 2000 g, 4 min, 20 °C) a přenesena do nové 1,5ml mikrozkušavky.

#### ***Nanesení a eluce peptidů***

Vzorky po enzymatickém štěpení byly nejprve okyseleny přidavkem čisté FA a to taky, aby každý vzorek dosahoval finální koncentrace 5 % (v/v). Do ekvilibrovaných mikrokolonek v čistých mikrozkušavkách byly naneseny vzorky v objemu odpovídajícímu 5  $\mu$ g peptidů (vždy 25 % z celkového objemu daného vzorku) a byla provedena centrifugace za podmínek: 1500 g, 7,5 min, 20 °C. Do mikrokolonek bylo dále naneseno vždy 50  $\mu$ l 5% (v/v) FA a byla provedena centrifugace při: 2000 g, 4 min, 20 °C.

Mikrokolonky byly následně přeneseny z mikrozkušavek do skleněných Total Recovery vialek. Do každé z mikrokolonek bylo pipetováno 50  $\mu$ l elučního roztoku 1 (E1), na mikrokolonku byla postupně nasazena plastová stříkačka a eluční roztok byl každou mikrokolonkou pomalu protlačen do vialky. Stejný postup byl zopakován i pro eluční roztoky E2-E6.

### **2.5.5.2 Zahuštění a finální naředění eluátů**

Posledním krokem před vlastní hmotnostní analýzou bylo zahuštění a naředění eluátů. Vialky s eluáty byly proto přeneseny do vakuové centrifugační odparky a v ní byly eluáty zahuštěny na finální objem 1-2  $\mu$ l při následujícím nastavení: V-AQ, 45 °C, brake-on. Na závěr byly zahuštěné vzorky naředěny přidavkem 20  $\mu$ l 5% (v/v) FA a po důkladném propipetování byly připraveny k následné LC-MS/MS analýze.

### 2.5.6 LC-MS/MS analýza

Analýza všech vzorků byla uskutečněna prostřednictvím systému nanokapilární chromatografie (nLC) s Q-TOF čili tandemovou hmotnostní detekcí a s ionizací elektrosprejem (ESI).

Vzorky ve skleněných vialkách byly vloženy do autosampleru systému nLC, jehož teplota byla nastavena na 10 °C, a poté následoval jejich nástřik pomocí nástřikové jehly do nLC systému. Z celkového objemu vzorku bylo do systému vstříknuto 5  $\mu$ l, tedy 25 %. Peptidy byly poté zachyceny na kapilární předkoloně (75  $\mu$ m x 3 cm) naplněné C18 reverzní fází A. Dalším krokem bylo 10minutové izokratické promytí zachycených peptidů, a to pomocí 20  $\mu$ l 2% (v/v) FA. Po dokončeném přečištění peptidů došlo k jejich postupnému uvolňování z předkolony 70minutovou gradientovou elucí při stálém průtoku 200 nl/min na analytickou kapilární kolonu (SilicaTip, 50  $\mu$ m x 20 cm) naplněnou C18 reverzní fází B. Složení mobilních fází A a B, použitých při eluci, zobrazuje Tab. 3.

Následovala ionizace vyeluovaných peptidů technikou ESI a jejich analýza tandemovou hmotnostní spektrometrií metodou zvanou data-dependent analysis (DDA) se srážkou vyvolanou fragmentací iontů v kolizní cele. Parametry nastavení iontového zdroje byly následující: napětí na vstupní kapiláře: 1250 V; sušící plyn: 8 l/min; teplota sušícího plynu v iontovém zdroji: 150 °C. Nastavení extrakce iontu do hmotnostního analyzátoru (Tune Page) odpovídalo: Ion funnel RF: 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 3.5 eV; collision energy 8 eV; Collision RF 1500 Vpp; transfer time 75  $\mu$ s; pre-puls storage 12  $\mu$ s). MS data v hmotnostním rozsahu byla skenována s dobou sběru 500 ms. Ionty v MS/MS modu byly fragmentovány v časovém cyklu 2 s s následujícím nastavením: minimální intenzita iontů: 2500 iontů (counts), kolizní energie je proměnná (je nastavována v rozsahu od 14-38 V) dle velikosti a náboje analyzovaného iontu, doba snímání fragmentačních spekter je v rozsahu od 60-250 ms v závislosti na intenzitě fragmentovaného iontu.



Tab. 3: Gradientová eluce peptidů

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	95	5
9	95	5
9,5	90	10
10,5	90	10
11	87	13
53	75	25
60	65	35
62	45	55
64	15	85
70	15	85

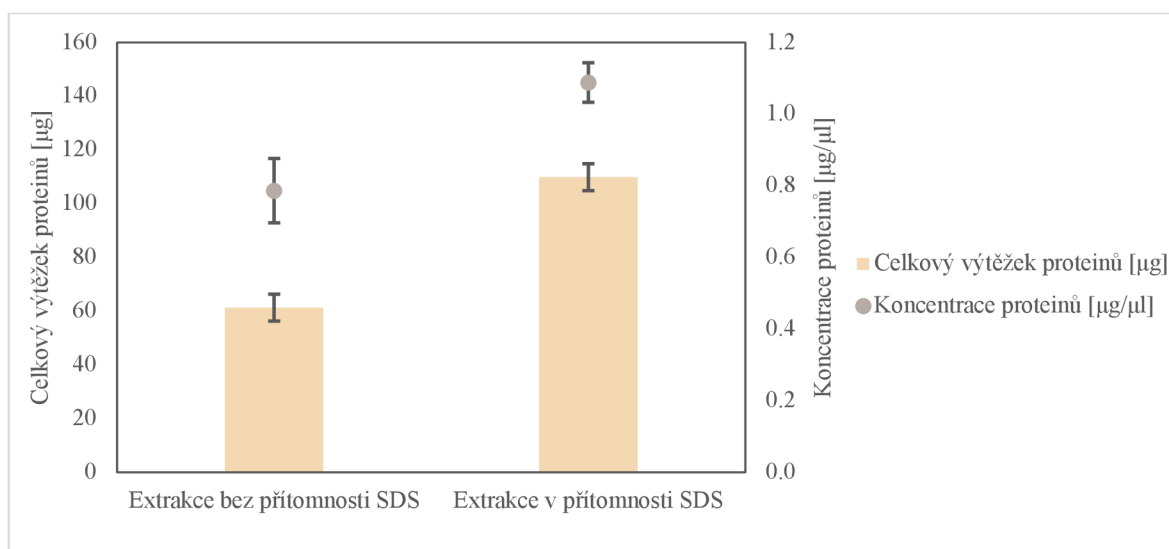
### 2.5.7 Zpracování získaných MS/MS dat

Hrubá data získaná z hmotnostního analyzátoru byla zpracována v programu MaxQuant software 2.0.3.0 (Tyanova *et al.*, 2016), který využívá prohledávací algoritmus Andromeda (Cox *et al.*, 2011) s využitím nastavení "Bruker TOF" (Beck *et al.*, 2015). Proteiny byly identifikovány pomocí databáze obsahující referenční proteom *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Columbia*, který byl stažen z databáze UniProt (staženo 7. 4. 2022; 39 328 sekvencí) a soubor častých kontaminantů (327 proteinových sekvencí). Proces identifikace v Andromeda byl následovný: možnost vynechání štěpných míst (anglicky *miss cleavage*): 2x; možné fixní modifikace peptidů: karbamidomethylace cysteinu; možné variabilní modifikace peptidů: deaminace asparaginu, N-koncová acetylace proteinů, minimální délka peptidového řetězce: 7 AMK; hladina filtrace falešných nálezů na úrovni spekter, peptidů a proteinů: 1 % FDR (*false discovery rate*) (Gupta *et al.*, 2011).

## 3 VÝSLEDKY

### 3.1 Extrakce proteinů

Pro extrakci tylakoidních proteinů byly provedeny dva odlišné postupy v závislosti na následně použité metodě přípravy, respektive štěpení vzorku. Při metodě štěpení v roztoku byla extrakce provedena za použití močoviny a thiomočoviny, avšak při metodě FASP bylo extrakci možno provést v přítomnosti SDS. V tomto případě představoval důležitý parametr správně zvolený poměr SDS ku proteinům. Alikvoty tylakoidní membrány, které byly k extrakcím použity, obsahovaly vždy 110  $\mu\text{g}$  celkových chlorofylů. Dostupná literatura uvádí, že tylakoidní membránu tvoří přibližně z 50 % proteiny a z 50 % lipidy, přičemž chlorofyly tvoří 21 % lipidů (Flannery S. E., 2021a). Pomocí znalosti množství chlorofylů ve vzorku je tak možné dopočítat i přibližné množství proteinů, které by mělo být okolo 520  $\mu\text{g}$ . Při objemu extrakčního pufru 100  $\mu\text{l}$  a finální koncentraci SDS 2 % (w/v) by tak výsledný vzájemný poměr SDS:proteiny měl být 3,8:1. Srovnání obou extrakcí zobrazuje Obr. 15.



Obr. 15: Srovnání výtěžnosti extrakce proteinů v závislosti na použití SDS. Shora: Finální koncentrace proteinů v roztoku v závislosti na použití SDS ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); Celkový výtěžek proteinů v závislosti na použití SDS ( $\mu\text{g}$ ). Znázorněné průměry a směrodatné odchylky byly vypočteny ze tří opakování.

Z těchto výsledků je patrné, že celkově vyšší výtěžnosti dosahovala extrakce v přítomnosti SDS, a to téměř dvojnásobně. Za zmínku určitě také stojí, že extrakce pomocí SDS byla z hlediska výtěžků také opakovatelnější, jak dokládá směrodatná odchylka (Obr. 15), případně vypočtený variační koeficient (pro extrakci bez SDS 11,4 %, kdežto

u extrakce s SDS odpovídal 4,4 %). I když byl poměr SDS:proteinům na základě doporučení dostupné literatury zvolen tak, aby při 2% (w/v) koncentraci a objemu extrakčního pufru 100 µl teoreticky dosahoval hodnot okolo 3,8:1, celkové množství proteinů však bohužel nedosahovalo předpokládaných hodnot a poměr SDS:proteinům se pohyboval spíše okolo 18:1.

## 3.2 Metoda FASP a její zvolené varianty

Na základě výsledků extrakcí byly pro porovnání s metodou štěpení v roztoku (IS) zvoleny dvě varianty metody FASP, každá ve dvou různých provedeních:

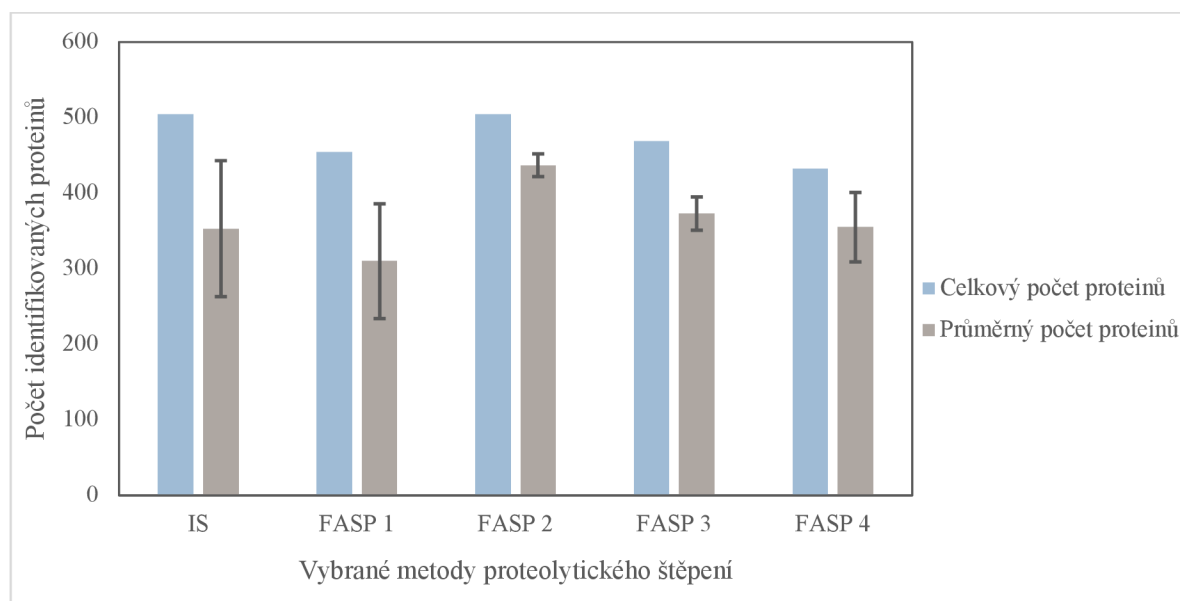
- Metoda FASP za použití 8M močoviny (FASP 1)
- Metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomočoviny (FASP 2)
- Metoda FASP za použití 8M močoviny s navýšeným počtem promývacích kroků (FASP 3)
- Metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomočoviny s navýšeným počtem promývacích kroků (FASP 4)

Každá z těchto metod pak byla provedena ve třech nezávislých opakováních, výsledné trypsinové lyzáty byly rozděleny na 6 frakcí a každý vzorek byl analyzován ve dvou LC-MS/MS měřeních. Vyhodnocení získaných výsledků pak bylo provedeno na základě srovnání základních parametrů dosažených identifikací. Konkrétně šlo o celkové a průměrné počty identifikovaných proteinů, peptidů, MS/MS spekter a průměrné pokrytí identifikované sekvence. Hodnocena byla také robustnost jednotlivých metod, a to na základě porovnání směrodatných odchylek, respektive vypočteného variačního koeficientu.

### 3.2.1 Počet identifikovaných proteinů

Z prezentovaného grafu (viz Obr. 17) je patrné, že co se týče celkového počtu identifikovaných proteinů, poskytly všechny testované metody poměrně srovnatelné výsledky. U hodnot průměrných, které vyjadřují počet identifikací na jedno opakování, pak už byly rozdíly vyšší. Nejvyšších hodnot celkově identifikovaných proteinů dosáhly metody FASP 2 a IS, u kterých bylo shodně identifikováno celkem 504 proteinů. Metoda IS však vykazuje daleko vyšší variabilitu (variační koeficient odpovídá 25 %) a zároveň jí bylo identifikováno i nižší průměrné množství proteinů než u FASP 2. Za nejméně účinnou metodu, a to jednak kvůli nejnižšímu průměrnému počtu identifikovaných proteinů, a také

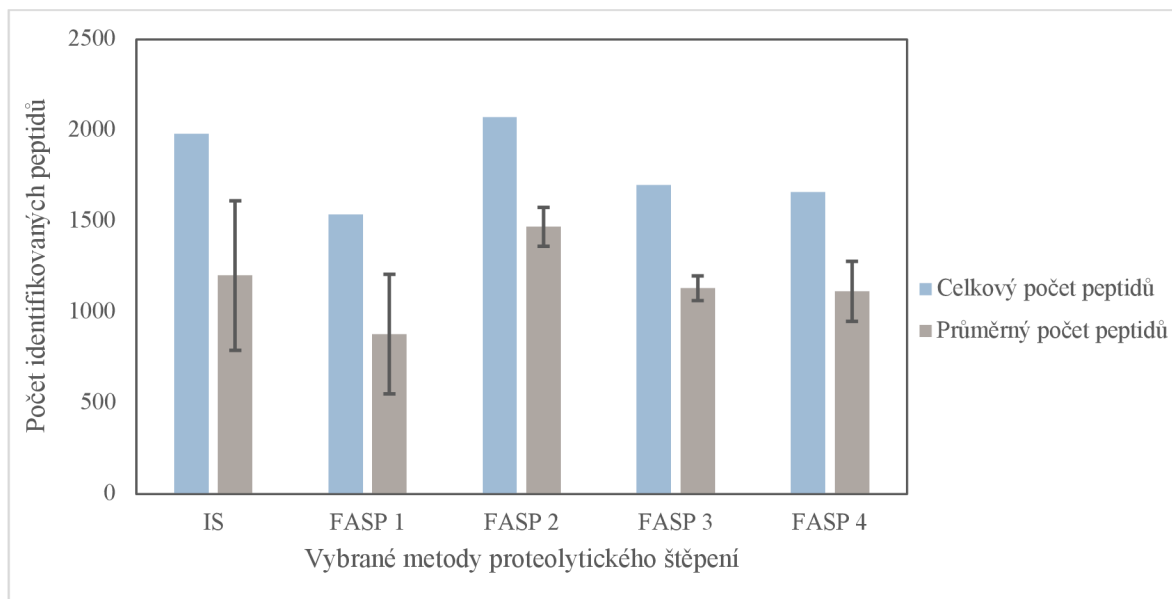
i kvůli vysoké variabilitě, můžeme překvapivě označit FASP 1, tedy základní provedení FASP.



Obr. 17: Graf znázorňující celkový a průměrný počet identifikovaných proteinů v závislosti na aplikaci jednotlivých proteolytických metod. IS – metoda v roztoku, FASP 1 – metoda FASP za použití 8M močoviny, FASP 2 – metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomočoviny, FASP 3 – metoda FASP za použití 8M močoviny s přidáním promývacími kroky, FASP 4 – metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomočoviny s přidáním promývacími kroky. Znázorněné průměry a směrodatné odchylky byly vypočteny ze tří opakování.

### 3.2.2 Počet přiřazených peptidů

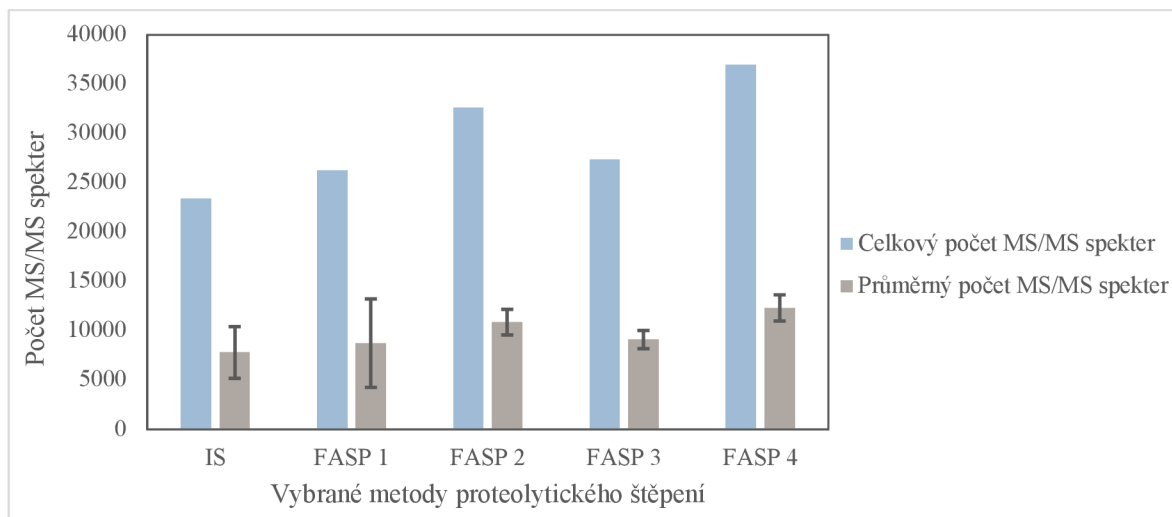
Z obecného hlediska se dá říct, že počty přiřazených peptidů pro jednotlivé metody poměrně věrně kopírovaly trendy popsané v předchozí kapitole. Jak můžeme vidět z grafu na Obr. 16, nejvýnosnější metodou se z hlediska počtu přiřazených peptidů stala metoda FASP 2. Touto metodou bylo identifikováno celkově 2074 peptidů. Vysoká detekce peptidů byla dosažena také u IS, u které sice bylo v rámci srovnání dosaženo druhého nejvyššího počtu, konkrétně 1982 přiřazených peptidů, avšak opět s vysokou variabilitou a variačním koeficientem dosahujícím až 34,2 %. Naopak nejnižších výsledků dosáhla opět metoda FASP 1, a to jak v celkových, tak i v průměrných číslech a velmi nízké opakovatelnosti charakterizované nejvyšším variačním koeficientem (37,4 %). Nejnižší variabilitu můžeme naopak vidět u metody FASP 3 (FASP využívající ve svém postupu 8 M močovinu, a navíc promývací kroky), kterou bylo identifikováno 1698 peptidů.



Obr. 16: Graf znázorňující celkový a průměrný počet přiřazených peptidů v závislosti na aplikaci jednotlivých proteolytických metod. IS – metoda v roztoku, FASP 1 – metoda FASP za použití 8M močoviny, FASP 2 – metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomčoviny, FASP 3 – metoda FASP za použití 8M močoviny s přidáním promývacími kroky, FASP 4 – metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomčoviny s přidáním promývací kroky. Znáznorněné průměry a směrodatné odchylky byly vypočteny ze tří opakování.

### 3.2.3 Počet MS/MS spekter

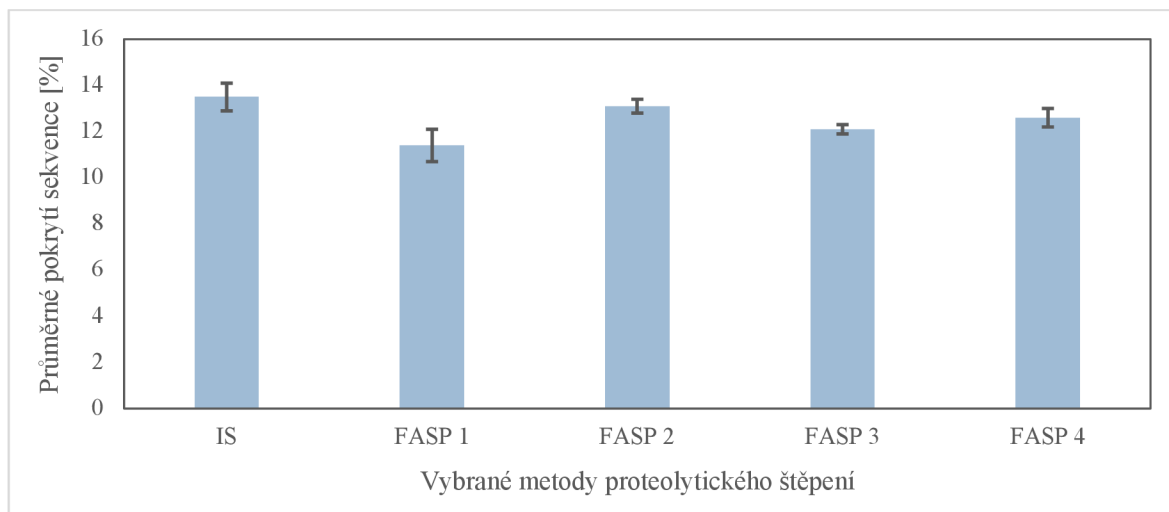
Další srovnávaný parametr použitý pro vyhodnocení provedených experimentu představoval počet MS/MS spekter. Toto číslo udává, kolik skenů fragmentačních spekter provedl hmotnostní spektrometr pro přiřazené peptidy, a je velmi důležité pro případnou MS kvantifikaci. V tomto případě nejvyšší hodnoty prokazovala metoda FASP 4. Konkrétně u této metody odpovídal celkový počet MS/MS spekter 36 955 a počet průměrný 12 318 MS/MS spekter. Na Obr. 18 můžeme také vidět nízkou variabilitu metody FASP 4 charakterizovanou malou směrodatnou odchylkou. Vysoký počet spekter s nízkou variabilitou byl taktéž získán metodou FASP 2 (celkový počet: 32 653; průměrný počet: 10 884). Metody FASP 1 a FASP 3 na tom byly s počtem spekter srovnatelně, avšak u FASP 1 můžeme vidět výrazně vyšší variabilitu, a tedy i nižší opakovatelnost.



Obr. 18: Graf znázorňující celkový a průměrný počet MS/MS spekter v závislosti na aplikaci jednotlivých proteolytických metod. IS – metoda v roztoku, FASP 1 – metoda FASP za použití 8M močoviny, FASP 2 – metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomčoviny, FASP 3 – metoda FASP za použití 8M močoviny s přidáním promývacími kroky, FASP 4 – metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomčoviny s přidáním promývací kroky. Znárodně průměry a směrodnatné odchylky byly vypočteny ze tří opakování.

### 3.2.4 Pokrytí sekvence proteinů

Co se týká průměrného pokrytí sekvence proteinů, nejvyšší hodnoty bylo dosaženo metodou IS, kterou bylo pokryto 13,5 % z celkové proteinové sekvence, jak můžeme vidět z Obr. 19. Nejmenší osekvenování identifikovaných proteinů pak dosahovala metoda FASP 1, pomocí které pak bylo detekováno průměrně 11,4 %. Na základě relativně malého rozdílu u těchto mezních hodnot pak můžeme konstatovat, že rozdíl mezi jednotlivými metodami nebyl u tohoto hodnoceného parametru příliš markantní.



*Obr. 19:* Graf znázorňující průměrné pokrytí sekvence proteinů v závislosti na aplikaci jednotlivých proteolytických metod. IS – metoda v roztoku, FASP 1 – metoda FASP za použití 8M močoviny, FASP 2 – metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomčoviny, FASP 3 – metoda FASP za použití 8M močoviny s přidáním promývacími kroky, FASP 4 – metoda FASP za použití 6M močoviny a 2M thiomčoviny s přidáním promývací kroky. Znárodně průměry a směrodatné odchylky byly vypočteny ze tří opakování.

## 4 DISKUZE

Tato bakalářská práce se věnovala srovnání vybraných metod proteolytického štěpení se zaměřením na vzorky tylakoidní membrány. Tylakoidní membrány jsou membrány, které jsou součástí rostlinných organel – tzv. chloroplastů, kde hrají velmi důležitou roli převážně ve spojení s jedním z klíčových biochemických dějů na naší planetě, s fotosyntézou. Právě zde totiž sídlí fotosyntetický aparát, tvořený několika proteinovými komplexy (Taiz L. *et al.*, 2018). Díky této skutečnosti se v poslední době tylakoidní membrána, a hlavně její proteinová složka, dostává do centra vědeckého zájmu. Jakožto membránové mají tylakoidní proteiny hydrofobní charakter, tudíž je jejich solubilizace oproti např. proteinům cytosolovým značně složitější. V jejich struktuře je navíc také většinou menší počet štěpných míst pro specifické proteázy a je u nich tedy žádoucí dosáhnout co nejkvalitnější denaturace (Smith S. M., 2017). To v praxi znamená použít místo chaotropního činidla (např. UA) spíše detergent, ideálně velmi účinný SDS. Nedávná proteomická studie zaměřující se na stechiometrické poměry jednotlivých fotosyntetických komplexů opravdu SDS pro extrakci, rozpuštění a denuraci s výhodou využila, avšak jeho odstranění bylo provedeno přesrážením proteinů pomocí systému chloroform-methanol (McKenzie S. D. *et al.*, 2020). Tato metoda je sice pro tento účel použitelná, ale bohužel může vést k nevratným ztrátám vzorku (Petřík I., 2015). (Flannery S. E. *et al.*, 2021a, 2021b) oproti tomu jako detergent využili laurát sodný, který byl odstraněn až po provedeném štěpení srážením za použití kyseliny trifluoroctové. I tento postup pak může v některých případech vést ke ztrátám (Holubová J., 2020). V této práci byla pro experimentální část zvolena metoda FASP, která umožňuje SDS použít, a díky ultrafiltračnímu membránovému systému ho vzorku během přípravy zbavit. Tím je tak zajištěna kompatibilita vzorku s trypsinovým štěpením a následnou LC-MS/MS analýzou, a navíc je ještě předejito zmiňovaným ztrátám (Wiśniewski J. R., 2019). Další výhody spočívají v možnosti jejího použití i pro poměrně malá množství proteinů (5-10 µg; Sielaff M. *et al.*, 2017) a také skutečnosti, že je celkově velmi vhodná pro membránové proteiny (Wiśniewski J. R. *et al.*, 2011b; Potriquet J. *et al.*, 2017; Mikulášek K. *et al.*, 2021).

Jedním z prvních kroků experimentální části byla příprava extrakčního pufru, v rámci které byla zásadním parametrem volba správné koncentrace SDS. Z odborné literatury je známo, že k úplné extrakci proteinů dochází až při koncentraci detergentu blízké se jeho CMC. Pro SDS pak platí, že při 2% (w/v) koncentraci v extrakčním činidlu dojde ke kvantitativní extrakci proteinů ze vzorku (Wiśniewski J. R., 2019). Je však také důležité brát



v potaz proteinové zastoupení v daném vzorku čili v tomto případě tylakoidní membrány, která je složena až z 50 % z proteinů (Flannery S. E., 2021a). Množství proteinů v jednotlivých alikvotech tylakoidních membrán bylo dopočítáno z naměřeného množství chlorofylů a na základě doporučení dostupné literatury byl poměr SDS ku proteinům zvolen tak, aby při 2% (w/v) koncentraci a extrakčnímu objemu 100  $\mu$ l teoreticky dosahoval hodnot okolo 3,8:1. Zvolený poměr by tak měl odpovídat předpokladu dostatečného navázání SDS na proteiny (k navázání by mělo dojít při poměru SDS ku proteinům odpovídajícímu 1,4:1) a SDS by při tom mělo být stále dobře odstranitelné (Wiśniewski J. R., 2019).

V kapitole 3.1 byla prezentována jak účinnost extrakce proteinů bez použití detergentu, tak za přítomnosti SDS pro metodou FASP. Většího množství vyextrahovaných proteinů bylo podle předpokladů, patrně v závislosti na jejich hydrofobním charakteru, dosaženo za použití detergentu (viz Obr. 15). Celková množství proteinů však bohužel nedosahovala hodnot vypočtených na základě teoretických předpokladů a poměr SDS:proteiny tak nebyl 3,8:1, ale pohyboval se spíše okolo 18:1. To by poté mohlo vést k nedostatečnému odstranění detergentu a jeho pozdějším interferencím. Proto byly na základě doporučení z literatury otestovány také varianty metody FASP s navýšeným počtem promývacích kroků, které by odmytí SDS mohly docílit (Wiśniewski J. R., 2019).

Metoda FASP tak byla provedena ve dvou variantách a dvou provedeních, tedy celkově čtyřech různých verzích. Jako standard byla použita klasická metoda štěpení v roztoku. Účelem prvních dvou verzí FASP bylo srovnání dvou různých promývacích roztoků založených na použití 8M UA oproti 6M UA a 2M thiomočoviny. Varianta s 6M UA a 2M thiomočovinou byla navržena z důvodu ověření dovednosti thiomočoviny lépe solubilizovat hydrofobní membránové proteiny než samotná UA. Inspirací pro tuto variantu bylo složení extrakčních pufrů využívaných pro 2D-elektroforézu, při které se směsi UA a thiomočoviny běžně používají (Pingoud A. *et al.*, 2002). Další dvě verze FASP byly poté provedeny za využití stejných chaotropních činidel jako varianty v první sérii s rozdílem v počtu promývacích kroků, které byly v tomto případě navýšeny z důvodů diskutovaných výše.

V předchozí kapitole s dosaženými výsledky byl prezentován počet identifikovaných peptidů a proteinů, dále počet MS/MS spekter a také pokrytí proteinové sekvence. U zvoleného standardu, IS, si v příložených grafech (viz Obr. 16-18) můžeme všimnout, že se v rámci tří provedených opakování vyskytly velké odchylky a s tím související relativně vysoký variační koeficient, který se pohyboval okolo 30 %. Opakovatelnost této metody, hodnocená dosti vysokou variabilitou výsledků, tedy nebyla příliš uspokojivá. Tím bylo

ověřeno tvrzení mnohých autorů (shrnuto ve Wiśniewski J. R., 2019) a současně i proteomické výzkumné skupiny Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého, že je extrakce membránových proteinů pouze za použití UA většinou problematická, jelikož patně nedochází k jejich úplné solubilizaci a denaturaci.

Nižšího počtu identifikovaných proteinů i peptidů než u IS bylo dosaženo metodou FASP 1, tedy základním provedením FASP, která navíc dosahovala překvapivě špatných výsledků i z hlediska své opakovatelnosti. V rámci dosaženého počtu identifikovaných proteinů a peptidů byl totiž variační koeficient podobný jako u standardu, u MS/MS spekter ale dosahoval až 50 %. Příčinou mohlo být stejně jako u IS použití UA, která asi není pro solubilizaci a denaturaci membránových proteinů tou nejvhodnější možností.

Metoda FASP 2 byla provedena sice obdobně, ale místo 8M UA u ní bylo použito 6M UA a 2M thiomočoviny, která by měla, jak už je uvedeno v textu výše, membránové proteiny solubilizovat a poté denaturovat lépe než UA. Tato skutečnost byla na základě získaných výsledků opravdu potvrzena. Variační koeficient byl oproti standardu a FASP 1 značně nižší, průměrně v rámci všech studovaných parametrů odpovídal jen 6 %. Současně byl touto metodou identifikován nejvyšší počet proteinů a peptidů a taktéž pokrytí proteinové sekvence bylo nejvyšší. Dá se tedy konstatovat, že použití thiomočoviny v rámci práce s membránovými proteiny zlepšilo robustnost této metody.

Dalšími variantami byly FASP 3 a FASP 4, které byly oproti prvním dvěma verzím FASP provedeny s navýšením promývacích kroků. Výsledky jednotlivých studovaných parametrů byly v rámci těchto dvou variant dosti podobné a lepší než u IS. Co se týče počtu identifikovaných proteinů a peptidů, varianta FASP 3 s 8M UA pak sice dosahovala vyšších počtů, ale pouze v řádu desítek, což není vzhledem k celkovým hodnotám signifikantní. Co se opakovatelnosti FASP 3 a FASP 4 týče, i ta se u obou verzí také příliš nelišila (variační koeficienty pro FASP 3 a 4 byly 6 % a 10 %). V rámci využití 8M močoviny (u FASP 1 a 3) můžeme říct, že navýšený počet promývacích kroků (u FASP 3) pravděpodobně vedl k efektivnějšímu odstranění SDS a zlepšil účinnost metody, a to jak v počtu identifikovaných proteinů i peptidů, tak i ve výrazném poklesu variability. To však neplatilo při srovnání verzí založených na přídatku 2M thiomočoviny (FASP 2 a 4), jelikož varianta FASP 2 dosahovala lepších výsledků, a to jak z hlediska vyššího počtu identifikovaných proteinů a peptidů, tak z hlediska nižší variability. Je možné, že důvodem této skutečnosti byl zvýšený počet kroků v celém postupu, který mohl vést k vyšším proteinovým ztrátám zapříčiněných např. delší inkubací proteinů na membráně, na které mohly zůstat zachyceny. Tento jev byl již dříve

popsán (Erde J. *et al.*, 2014) a teoreticky mohl převážit výhody pramenící z účinnějšího odstranění detergentu.

## 5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo srovnání vybraných metod proteolytického štěpení se zaměřením na vzorky tylakoidní membrány, které se staly jedním z předmětů zájmu proteomické skupiny Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého, a to hlavně z důvodu jejich spojení s fotosyntézou.

Experimentální část práce se převážně zaměřovala na metodu FASP (přípravu vzorku za pomoci filtru) a její varianty, přičemž standardem bylo proteolytické štěpení proteinů v roztoku. Příčinou této volby nebyly jen dlouho známé a výše diskutované výhody této metody, ale také několik nedávných reportů, které nezávisle na sobě upozorňovaly na její použitelnost pro štěpení membránových proteinů (Wiśniewski J. R. *et al.*, 2011b; Potriquet J. *et al.*, 2017; Mikulášek K. *et al.*, 2021).

Dosažené výsledky vedly k několika závěrům. Prvním z nich bylo poměrně překvapivé zjištění, že samotná extrakce, respektive vztah mezi koncentrací a množstvím SDS a proteinů ve vzorku, má významný vliv na výsledek štěpení. Dá se tedy říct, že se účinnost FASP metody odráží na samotné přípravě vzorku. Z tohoto pohledu by bylo ještě vhodné porovnat prezentované výsledky s experimenty se vzorky o vyšší proteinové koncentraci, a tedy lepším poměrem SDS:proteiny. Ty v rámci experimentální činnosti sice byly provedeny, ale jejich LC-MS/MS analýza již bohužel nemohla být do odevzdání této práce z časových a technických důvodů provedena.

Zároveň se také osvědčila solubilizace a denaturace tylakoidních proteinů pomocí thiomocoviny, kdy její úspěšná aplikace celkově svědčila o tom, že práce s membránovými proteiny klade odlišné nároky na zpracování vzorku. Jeví se tedy velice vhodné vždy otestovat a případně optimalizovat několik vybraných variant zpracování, jak tomu bylo v této bakalářské práci. Velmi zajímavé by proto bylo také experimentální srovnání s dalšími známými variantami FASP, konkrétně mFASP (Ni M. *et al.*, 2017) a eFASP (Erde J. *et al.*, 2014), které jsou založeny na použití odlišných detergentů a pasivaci membrány. To však bylo zcela mimo časové možnosti této bakalářské práce.

Celkově však tato práce přinesla první úspěšnou aplikaci metody FASP v laboratoři proteomické skupiny Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého a její výsledky přinesly cenná vodítka směrem k další experimentům s cílem zavést FASP do rutinní praxe. Cíle práce byly splněny.

## Seznam použité literatury

Aebersold, R., & Mann, M. (2016). Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*, 537(7620), 347–355.

Ahmed F. E. (2009). Sample preparation and fractionation for proteome analysis and cancer biomarker discovery by mass spectrometry. *Journal of separation science*, 32(5-6), 771–798.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland Science.

Aoki-Kinoshita K. F. (2022). Functions of Glycosylation and Related Web Resources for Its Prediction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2499, 135–144.

Balbuena, Tiago S., Dias, Leonardo L. C., Martins, Mariana L. B., Chiquieri, Tatiana B., Santa-Catarina, Claudete, Floh, Eny I. S., & Silveira, Vanildo. (2011). Challenges in proteome analyses of tropical plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(2), 91–104.

Barrett, A. J., Fred Woessner, J., & Rawlings, N. D. (2014). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Science.

Beck, S., Michalski, A., Raether, O., Lubeck, M., Kaspar, S., Goedecke, N., Baessmann, C., Hornburg, D., Meier, F., Paron, I., Kulak, N. A., Cox, J., & Mann, M. (2015). The Impact II, a Very High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Instrument (QTOF) for Deep Shotgun Proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 14(7), 2014–2029.

Berg, J., Tymoczko, J., Gatto, G. and Stryer, L. (2015). *Biochemistry*. 8th ed. New York, NY: Freeman.

Bodzon-Kulakowska, A., Bierczynska-Krzysik, A., Dylag, T., Drabik, A., Suder, P., Noga, M., Jarzebinska, J., & Silberring, J. (2007). Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 849(1-2), 1–31.

Buczak, K., Kirkpatrick, J. M., Truckenmueller, F., Santinha, D., Ferreira, L., Roessler, S., Singer, S., Beck, M., & Ori, A. (2020). Spatially resolved analysis of FFPE tissue proteomes by quantitative mass spectrometry. *Nature protocols*, 15(9), 2956–2979.

Burkhart, J. M., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A., & Zahedi, R. P. (2012). Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of proteomics*, 75(4), 1454–1462.

Collins, F. S., Green, E. D., Guttmacher, A. E., Guyer, M. S., & US National Human Genome Research Institute (2003b). A vision for the future of genomics research. *Nature*, 422(6934), 835–847.

Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A. (2003a). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5617), 286–290.

Collinsová, M., & Jiráček, J. (2004). Současný vývoj v proteomice. *Chemické listy*, 98(12).

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., & Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research*, 10(4), 1794–1805.

Cleland W. W. (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 3, 480–482.

Cox, J., & Mann, M. (2007). Is proteomics the new genomics?. *Cell*, 130(3), 395–398.

Erde, J., Loo, R. R., & Loo, J. A. (2014). Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *Journal of proteome research*, 13(4), 1885–1895.

Erde, J., Loo, R. R., & Loo, J. A. (2017). Improving Proteome Coverage and Sample Recovery with Enhanced FASP (eFASP) for Quantitative Proteomic Experiments. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1550, 11–18.

Flannery, S. E., Hepworth, C., Wood, W., Pastorelli, F., Hunter, C. N., Dickman, M. J., Jackson, P. J., & Johnson, M. P. (2021a). Developmental acclimation of the thylakoid proteome to light intensity in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 105(1), 223–244.

Flannery, S. E., Pastorelli, F., Wood, W., Hunter, C. N., Dickman, M. J., Jackson, P. J., & Johnson, M. P. (2021b). Comparative proteomics of thylakoids from *Arabidopsis* grown in laboratory and field conditions. *Plant direct*, 5(10), e355.

DRGP Institute [online] (2018). Gel Permeation Chromatography. [cit. 2018-07-02].

Godovac-Zimmermann J. (2008). 8th Siena meeting. From genome to proteome: integration and proteome completion. *Expert review of proteomics*, 5(6), 769–773.

Granvogl, B., Gruber, P., & Eichacker, L. A. (2007a). Standardisation of rapid in-gel digestion by mass spectrometry. *Proteomics*, 7(5), 642–654.

Granvogl, B., Plösch, M., & Eichacker, L. A. (2007b). Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(4), 991–1002.

Gupta, N., Bandeira, N., Keich, U., & Pevzner, P. A. (2011). Target-decoy approach and false discovery rate: when things may go wrong. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(7), 1111–1120.

Gustafsson, O. J., Arentz, G., & Hoffmann, P. (2015). Proteomic developments in the analysis of formalin-fixed tissue. *Biochimica et biophysica acta*, 1854(6), 559–580.

Hale, J. E., Butler, J. P., Gelfanova, V., You, J. S., & Knierman, M. D. (2004). A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and mass spectral analysis. *Analytical biochemistry*, 333(1), 174–181.

Herscovics A. (1999). Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1473(1), 96–107.

Holding, S. R. (1984). Gel permeation chromatography. *Endeavour* 8 (1), 17–20.

Holubová J. (2020). Analýza proteinového složení tylakoidní membrány pomocí metod moderní proteomiky. Diplomová práce (Mgr.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta.

Chmelík, J. (2005). Proteomic guide. *Chemické listy*, 99(12).

Kachuk, C., & Doucette, A. A. (2018). The benefits (and misfortunes) of SDS in top-down proteomics. *Journal of proteomics*, 175, 75–86.

Kašpárková, V., & Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Technologická fakulta. (2010). Charakterizace polymerních roztoků a částicových soustav = On the characterization of polymer solutions and particulate systems : teze habilitační práce.

Klouda, P. (2003). Moderní analytické metody (2., upr. a dopl. vyd). Pavel Klouda.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., ... International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome.



León, I. R., Schwämmle, V., Jensen, O. N., & Sprenger, R. R. (2013). Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, *12*(10), 2992–3005.

Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids, the Pigments of Photosynthetic Biomembranes. In: Douce, R. and Packer, L., Eds., *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York, 350–382.

Lipecka, J., Chhuon, C., Bourderioux, M., Bessard, M. A., van Endert, P., Edelman, A., & Guerrero, I. C. (2016). Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics*, *16*(13), 1852–1857.

López-Ferrer D, Cañas B, Vázquez J, Lodeiro C, Rial-Otero R, Moura I, et al. Sample treatment for protein identification by mass spectrometry-based techniques. *TrAC Trends Anal Chem.* listopad 2006;25(10):996–1005.

McKenzie, S. D., Ibrahim, I. M., Aryal, U. K., & Puthiyaveetil, S. (2020). Stoichiometry of protein complexes in plant photosynthetic membranes. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, *1861*(2), 148141.

Megger, D. A., Bracht, T., Meyer, H. E., & Sitek, B. (2013). Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochimica et biophysica acta*, *1834*(8), 1581–1590.

Mikulášek, K., Konečná, H., Potěšil, D., Holánková, R., Havliš, J., & Zdráhal, Z. (2021). SP3 Protocol for Proteomic Plant Sample Preparation Prior LC-MS/MS. *Frontiers in plant science*, *12*, 635550.

Ni, M. W., Wang, L., Chen, W., Mou, H. Z., Zhou, J., & Zheng, Z. G. (2017). Modified filter-aided sample preparation (FASP) method increases peptide and protein identifications for shotgun proteomics. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, *31*(2), 171–178.

Ostasiewicz, P., & Wiśniewski, J. R. (2017). A Protocol for Large-Scale Proteomic Analysis of Microdissected Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissue. *Methods in enzymology*, 585, 159–176.

Ostasiewicz, P., Zielinska, D. F., Mann, M., & Wiśniewski, J. R. (2010). Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. *Journal of proteome research*, 9(7), 3688–3700.

Petřík I. (2015). Optimalizace protokolu extrakce a štěpení rostlinných proteinů před LC-MS analýzou. Diplomová práce (Mgr.). UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Přírodovědecká fakulta.

Pientka, Z. (2012). Zdeněk Palatý (ed.): Membránové procesy. *Chemické Listy*, 106(11), 1086.

Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J., & Jeltsch, A. (2002). *Biochemical methods: A concise guide for students and researchers*. Wiley-VCH Verlag.

Potriquet, J., Laohaviroj, M., Bethony, J. M., & Mulvenna, J. (2017). A modified FASP protocol for high-throughput preparation of protein samples for mass spectrometry. *PloS one*, 12(7), e0175967.

Reisinger, V., & Eichacker, L. A. (2008). Isolation of membrane protein complexes by blue native electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 424, 423–431.

Ruddock, L. W., & Molinari, M. (2006). N-glycan processing in ER quality control. *Journal of cell science*, 119(Pt 21), 4373–4380.

Sielaff, M., Kuharev, J., Bohn, T., Hahlbrock, J., Bopp, T., Tenzer, S., & Distler, U. (2017). Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. *Journal of proteome research*, 16(11), 4060–4072.

Simpson, R. J. (2003). *Proteins and proteomics: a laboratory manual*. CSHL press.

Smith S. M. (2017). Strategies for the Purification of Membrane Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1485, 389–400.

Spiro R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), 43R–56R.

Switzar, L., Giera, M., & Niessen, W. M. (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of proteome research*, 12(3), 1067–1077.

Štosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebela M. (2005) Proteolytické enzymy: Význam pro proteomiku. *Chem. Listy* 99, 896-905.

Taiz, L., Zeiger, P. E. E., Mller, P. E. I. M., & Murphy, P. A. C. A. (2018). *Fundamentals of plant physiology*. Sinauer Associates.

Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature protocols*, 11(12), 2301–2319.

Voet, D., & Voet, J. G. (1995). *Biochemie* (přeložil Arnošt KOTYK). Victoria Publishing.

Wiśniewski J. R. (2019). Filter Aided Sample Preparation - A tutorial. *Analytica chimica acta*, 1090, 23–30.

Wiśniewski J. R. (2017). Filter-Aided Sample Preparation: The Versatile and Efficient Method for Proteomic Analysis. *Methods in enzymology*, 585, 15–27.

Wiśniewski, J. R., Ostasiewicz, P., & Mann, M. (2011b). High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *Journal of proteome research*, 10(7), 3040–3049.

Wiśniewski, J. R., & Pruś, G. (2015). Homogenous Phase Enrichment of Cysteine-Containing Peptides for Improved Proteome Coverage. *Analytical chemistry*, 87(13), 6861–6867.

Wiśniewski, J. R., & Mann, M. (2012). Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis. *Analytical chemistry*, *84*(6), 2631–2637.

Wiśniewski J. R. (2016). Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Analytical chemistry*, *88*(10), 5438–5443.

Wiśniewski, J. R., & Rakus, D. (2014). Quantitative analysis of the Escherichia coli proteome. *Data in brief*, *1*, 7–11.

Wiśniewski, J. R., Zielinska, D. F., & Mann, M. (2011a). Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. *Analytical biochemistry*, *410*(2), 307–309.

Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods*, *6*(5), 359–362.

Zielinska, D. F., Gnad, F., Wiśniewski, J. R., & Mann, M. (2010). Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell*, *141*(5), 897–907.