

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Srovnání metod štěpení proteinů v roztoku
aneb příprava vzorků pro hmotnostní
spektrometrii**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Nikola Sklenovská

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Ing. Jana Uřinová, Ph.D.

Termín odevzdání práce: 14. 5. 2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Nikola Sklenovská
Název práce	Srovnání metod štěpení proteinů v roztoku aneb příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení biochemie proteinů a proteomiky
Vedoucí práce	Ing. Jana Uřinová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Proteomika je vědní obor, zabývající se studiem proteomu, tedy souboru všech proteinů přítomných v daném okamžiku v organismu, tkáni, buňce či její části. Jejím cílem je komplexní analýza proteinů z hlediska jejich množství, vzájemných interakcí, funkčních stavů, lokalizace, post-translačních modifikací a struktury. Díky vývoji hmotnostní spektrometrie a bioinformatiky je proteomika jedním z nejdynamičtější se rozvíjejících oborů současnosti. Má bakalářská práce se zabývá přípravou vzorků pro hmotnostní analýzu a jejím cílem je porovnání metod štěpení proteinů v roztoku. Bylo srovnáno šest variant štěpení proteinů v mikrozkuhavce a tři varianty štěpení proteinů na centrifugačním filtru. Z provedených experimentů vycházela jako nejlepší varianta štěpení proteinů v mikrozkuhavce za přítomnosti močoviny a thiomčoviny, ve které byl identifikován největší počet proteinů a peptidů.</p>
Klíčová slova	Proteomika, extrakce proteinů, detergenty, štěpení v roztoku, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	73
Počet stran příloh	7
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Nikola Sklenovská
Title of thesis	Comparison of proteins in-solution digestion methods: Preparation of samples for mass spectrometry
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Protein Biochemistry and Proteomics
Supervisor	Ing. Jana Uřinová, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>Proteomics is the scientific discipline dealing with the study of the proteome; the set of all proteins present at a given moment in a cell (or part thereof), tissue, or organism. The goal of proteomics is to provide a comprehensive analysis of proteins in terms of their quantity, interactions, functional states, localization, post-translational modifications and structures. Thanks to the development of mass spectrometry and bioinformatics, proteomics is one of the fastest developing fields today. This thesis investigates the preparation of samples for mass analysis and compares methods for the digestion of proteins in a solution. Six variants of protein digestion in a microtube and three variants on a centrifugal filter were compared. Among these, digestion in a microtube containing urea and thiourea proved to be the most effective; the greatest number of proteins and peptides were identified via this method.</p>
Keywords	Proteomics, extraction of proteins, detergents, cleavage in solution, mass spectrometry
Number of pages	73
Number of pages of appendices	7
Language	Czech

..

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením Ing. Jany Uřinové, Ph.D. s použitím literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 14. 5. 2015

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Janě Uřinové, Ph.D. za její čas, vstřícný přístup, věcné připomínky a odborné vedení jak během experimentální části, tak při vypracování vlastní práce. Mé velké poděkování patří také Mrg. Ivu Chamrádovi, Ph.D. za jeho ochotu, cenné rady, diskusi výsledků a pomoc s grafickou stránkou práce. Dále bych ráda poděkovala Mrg. Radimovi Simerskému, Ph.D. za jeho věcné rady a připomínky a Mgr. René Lenobelovi, Ph.D. za pomoc s analýzou vzorků. Také bych ráda vyjádřila poděkování mému příteli za podporu a pomoc se zpracováním velkého množství dat.

OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	- 8 -
1 Cíle práce.....	- 10 -
2 Teoretická část.....	- 11 -
2.1 Proteomika	- 11 -
2.2 Vybrané proteomické metody	- 12 -
2.2.1 Elektroforetické metody	- 13 -
2.2.2 Chromatografické metody.....	- 14 -
2.2.3 Hmotnostní spektrometrie	- 16 -
2.2.3.1 Ionizační zdroje.....	- 17 -
2.2.3.2 Hmotnostní analyzátory	- 19 -
2.2.3.3 Detektory.....	- 20 -
2.2.3.4 Interpretace získaných spekter po MS analýze	- 21 -
2.3 Příprava vzorku pro hmotnostní analýzu	- 21 -
2.3.1 Extrakce proteinů z biologického vzorku.....	- 22 -
2.3.2 Separace proteinů před štěpením.....	- 23 -
2.3.3 Precipitace a zakoncentrování proteinů.....	- 23 -
2.3.4 Rozpouštění proteinů a jejich denaturace.....	- 23 -
2.3.5 Redukce.....	- 25 -
2.3.6 Alkylace	- 25 -
2.3.7 Štěpení proteinů	- 26 -
2.3.8 Frakcionace peptidů a jejich přečištění	- 27 -
3 Experimentální část	- 29 -
3.1 Materiál a chemikálie.....	- 29 -
3.2 Přístrojové vybavení.....	- 29 -
3.3 Použité roztoky	- 30 -
3.4 Metody	- 30 -
3.4.1 Extrakce proteinů	- 31 -

3.4.2	Měření koncentrace proteinů.....	- 32 -
3.4.3	Srážení proteinů	- 32 -
3.4.4	Štěpení proteinů v mikrozkuhavce.....	- 32 -
3.4.5	Štěpení proteinů na centrifugačním filtru.....	- 34 -
3.4.6	Přečištění peptidů přes C18 reverzní fázi.....	- 37 -
3.4.7	Analýza vzorků na nano LS-ESI-MS a MS/MS	- 37 -
3.4.8	Bioinformatická analýza získaných výsledků	- 38 -
4	Výsledky a diskuse.....	- 40 -
4.1	Štěpení proteinů na centrifugačním filtru.....	- 41 -
4.1.1	Počty identifikací a pokrytí sekvence.....	- 41 -
4.1.2	Vlastnosti peptidů.....	- 43 -
4.1.3	Vlastnosti unikátních peptidů.....	- 46 -
4.1.4	Karbamidomethylace cysteinů	- 48 -
4.1.5	Opakovatelnost a reprodukovatelnost	- 48 -
4.2	Štěpení proteinů v mikrozkuhavce.....	- 50 -
4.2.1	Počty identifikací a pokrytí sekvence.....	- 51 -
4.2.2	Vlastnosti peptidů.....	- 53 -
4.2.3	Vlastnosti unikátních peptidů.....	- 56 -
4.2.4	Opakovatelnost a reprodukovatelnost	- 58 -
4.3	Porovnání nejlepších variant ze štěpení proteinů v mikrozkuhavce a FASP.....	- 59 -
4.3.1	Počty identifikací a pokrytí sekvence.....	- 59 -
4.3.2	Vlastnosti peptidů.....	- 60 -
4.4	Aplikace nejefektivnějších metod při analýze vzorku mikrosomální frakce <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 62 -
5	Závěr.....	- 63 -
6	Seznam použité literatury	- 65 -

Seznam použitých zkratek

DNA - deoxyribonukleová kyselina

RNA - ribonukleová kyselina

mRNA – messengerová RNA

1D - jednodimenzionální

2D - dvoudimenzionální

3D - třídimeznionální

MS – hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

IEX – Ionexová chromatografie

PAGE - polyakrylamidová gelová elektroforéza

SDS – dodecylsíran sodný

HPLC - vysokoúčinná kapalinovou chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

IEF – izoelektrická fokusace

MudPIT – technika multidimenzionální proteinové identifikace

ESI – ionizace elektrosprejem

MALDI - matricí asistovaná laserová ionizace

CI - chemická ionizace

APCI - chemická ionizace za atmosférického tlaku

FAB - bombardování rychlými ionty

CHCA - α -kyano-4-hydroxyskořicová

SI - 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina

DHB - 2,5-dihydroxybenzoová kyselina

HPA - 3-hydroxypikolinová kyselina

TOF – analyzátor doby letu

HR-MS - analyzátor s dvojí fokusací

FT-ICR - iontová cyklotronová rezonance

QQQ - tripl-kvadrupól

Q-TOF – kvadrupólový analyzátor doby letu

DDA - data dependentní analýza
CID – kolizí indukovaná disociace
PMF - mapy molekulových hmotností peptidů
FASP – štěpení na centrifugačním filtru
DOC - deoxycholát sodný
CHAPS – cholamidopropyl(dimethylamonio)-1-propansulfonát
DTT – dithiothreitol
TCEP - tris(2-karboxyethyl)fosfin
IAA - kyselina iodoctová
IAM – iodacetamid
NEM - N-ethylmaleimid
MED - multienzymové štěpení
ACN – acetonitril
SCX - kationt-měníčová chromatografie
TEAB - triethylamonný hydrogenuhličitanový pufr
FA - kyselina mravenčí
MeOH - methanol
TFA - trifluoroctová kyselina
iPrOH - isopropanol
BSA – hovězí sérový albumin
pI – izoelektrický bod
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
TRIS – 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

1 Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši na téma metody používané v proteomice se zaměřením na přípravu vzorků pro hmotnostní spektrometrii.
- Experimentálně ověřit vliv různých detergentů na štěpení proteinů v roztoku.
- Zpracovat a porovnat experimentální data a doporučit vhodný postup pro daný biologický vzorek a experiment.

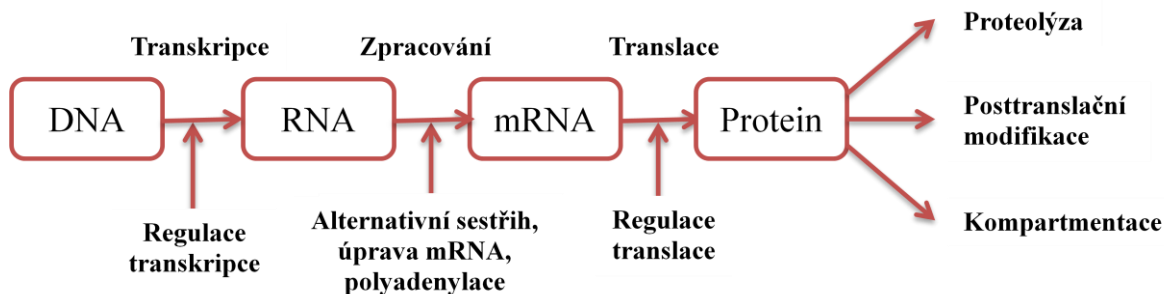
2 Teoretická část

2.1 Proteomika

Proteomika je vědní obor zabývající se identifikací proteinů, stanovením jejich exprese a lokalizace v buňce, posttranslačními modifikacemi, vztahem mezi strukturou a funkcí, ale také studiem vzájemných interakcí mezi proteiny, což je nezbytné pro pochopení vitálních biologických pochodů v buňce.

Proteiny jsou hlavními výkonnými jednotkami buňky a jejich funkce v buňce jsou velmi rozmanité – katalytické, řídicí, regulační, skladovací, transportní a mnohé další. Z tohoto důvodu jsou zodpovědné za téměř všechny biochemické aktivity buňky a to díky interakcím mezi sebou navzájem a s celým spektrem dalších molekul (Liebler D. C., 2002). Kompletní sada proteinů v daném místě (v organismu, ve tkáni, v buňce,..apod.) a v konkrétním čase se nazývá proteom. Tento termín byl poprvé použit poměrně nedávno Marcem R. Wilkinsem v roce 1994 pro označení proteinového komplementu genomu (Wilkins M. R., et al., 1995).

Proteiny jsou kódovány sekvencemi jednotlivých genů. Na rozdíl od genomu jsou transkriptom i proteom dynamické entity, jejichž obsah může dramaticky kolísat v důsledku regulace transkripce, zpracování RNA, syntézy a modifikace proteinů (obr. 1). Díky těmto procesům může jeden gen produkovat mnoho různých mRNA. Na úrovni translace jsou proteiny modifikovány a odhaduje se, že díky těmto posttranslačním modifikacím a různému sestřihu může vzniknout až 200 různých typů proteinu (Krishna, R. G., et al., 1993). Posttranslační modifikace mohou být jak trvalé (např. glykosylace), tak přechodné (např. fosforylace) a přispívají k imunitnímu rozpoznávání, stabilizují konformace proteinů, pomáhají regulovat jejich funkci, apod (Twyman R. M., 2004). Kromě těchto posttranslačních modifikací může být funkce proteinů ovlivněna např. lokalizací proteinu, interakcemi s jinými molekulami, atd. Proto, i když je rozvoj proteomiky přímým důsledkem objevů v oblasti genomické DNA, je nemožné objasnit většinu mechanismů v buňce pouze studiem genomu a pro pochopení složitých biologických systémů je tedy potřeba komplexní studie (Graves P. R., et al, 2002; Twyman R. M., 2004).



Obr. 1: Mechanismy vzniku více genových produktů z jednoho genu (Graves P. R., et al., 2002).

Množství konkrétního proteinu je v čase regulováno mírou transkripce příslušného genu, efektivitou translace mRNA do proteinu a rychlostí degradace proteinu v buňce (Liebler D. C., 2002).

Proteomika přispívá v posledních desetiletích jak k základnímu výzkumu v mnoha biologických oborech, tak i v aplikovaných zemědělských, potravinářských a medicínských studiích. To je patrné na počtu proteomických publikací, který roste v posledních dvou desetiletích exponenciálně (Berggård T., et al., 2007; Delaney B., et al., 2008; Kim B., et al., 2013). V současné době proteomika zahrnuje širokou škálu různých výzkumných témat, od profilování proteinové exprese přes analýzu signálních drah až k identifikaci proteinových biomarkerů (Mallick P., et al., 2010).

2.2 Vybrané proteomické metody

Cílem proteomiky není pouze identifikace všech proteinů v buňce, ale také determinace funkce proteinu a vytvoření kompletní tří-dimenzionální (3D) mapy, která by znázorňovala lokalizaci proteinů v buňce. Proto je při proteomické analýze nutné použití také molekulárně-biologických, biochemických a bioinformatických metod (Graves P. R., 2002).

V eukaryotické buňce může být od 50 000 do 100 000 různých proteinů a bereme-li v úvahu i posttranslační modifikace tak i více. V jedné lidské buňce bylo pomocí MS analýzy identifikováno více než 10 000 různých proteinů (Beck M., et al., 2011). Protože jsou proteiny fyzikálně-chemicky velmi různorodé, je obtížné navrhnout způsob extrakce, který by byl vhodný pro všechny. Tyto fyzikální a chemické rozdílnosti jsou způsobeny různým počtem a pořadím aminokyselin v proteinu, odlišným druhem aminokyselin (hydrofóbní, hydrofilní,..) a posttranslačními modifikacemi, které na proteinu proběhly

(Twyman R. M., 2004). Z důvodu komplexnosti většiny biologických vzorků je před MS analýzou často nutné rozdělení proteinové směsi na několik frakcí.

2.2.1 Elektroforetické metody

Elektroforetické metody slouží k rozseparování komplexních směsí na základě velikosti a náboje proteinů pomocí elektrického proudu. Proteiny mohou být děleny v nativním nebo denaturovaném stavu. Jelikož jsou proteiny a peptidy amfoterní látky a jejich náboj závisí na pH prostředí, mají pufry používané pro elektroforézu přesnou hodnotu pH a iontovou sílu. V proteomice jsou analyzovány hlavně intaktní proteiny a peptidy, ale také neporušené buněčné organely a nativní proteinové komplexy, které mohou být také rozděleny pomocí elektroforézy (Westermeier R., et al., 2002).

V posledních desetiletích došlo k velkému rozvoji elektroforetických metod. Harry Svensson přišel v roce 1961 na možnost separace amfoterních molekul v gradientu pH. Později jeho žák, Olof Vesterberg, vypracoval syntézu nosičových amfolytů pro gradient pH a tím položil základy izoelektrické fokusace proteinů jako standardní separační techniku (Svensson H., et al., 1961; Vesterberg O., 1969). Rok poté, v roce 1962, byla představena polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) (Raymond S, et al., 1962) a později byla tato polyakrylamidová elektroforéza zkombinována s diskontinuálním pufrovým systémem (Laemmli U. K., 1970). Díky tomuto spojení a současnému přidání dodecylsírany sodného (SDS) do polyakrylamidového gelu vznikla SDS-PAGE, což je dnes jedna z nejběžněji používaných elektroforetických metod (Mallick P., et al., 2010). SDS je negativně nabitý detergent, který denaturuje a obalí molekuly proteinů a ty tím získají uniformní náboj. Díky tomu se poté proteiny dělí pouze podle své molekulové hmotnosti (Shapiro A. L., et al., 1967; Laemmli U. K., 1970). Jednodimenzionální elektroforézy (1DE) mohou být použity pro rozseparování proteinů s molekulovou hmotností od 10 do 300 kDa (Graves P. R., et al., 2002).

Metoda pro separaci proteinových směsí na základě dvourozměrné gelové elektroforézy (2DE) byla poprvé představena v roce 1970 (Twyman R. M., 2004). Oproti 1DE mají obrovskou výhodu, a to je schopnost rozdělit i proteiny, které podstoupily nějakou formu posttranslační úpravy. 2DE jsou vhodné pro rozdělení i komplexnějších vzorků, protože proteiny jsou děleny na základě dvou vlastností – nejdříve podle náboje a poté podle molekulové hmotnosti (Graves P. R., et al., 2002).

2.2.2 Chromatografické metody

Vedle metod elektroforetických jsou v proteomice běžně využívány také metody chromatografické, které slouží k rozdělení komplexních proteinových či peptidových směsí a to díky interakci jejich molekuly se stacionární fází. Molekuly s vyšší afinitou ke stacionární fázi se v ní budou pohybovat pomaleji než molekuly s nižší afinitou. Výhodou tohoto přístupu je možnost vyhnout se gelové separaci, což zvyšuje počet identifikovaných proteinů/peptidů díky nižším ztrátám (Graves P. R., et al., 2002; Kupiec T., 2004; Veenstra T. D., et al., 2006). Mezi chromatografické metody řadíme například vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), iontově-výměnnou chromatografii, gelovou filtraci, afinitní chromatografii a další (tab. 1).

Jedním z nejpoužívanějších přístupů pro rozdělení peptidových směsí je HPLC, která je taktéž používána pro separaci stabilních intaktních proteinů. Variabilita stacionárních fází a separačních módů zvyšuje využitelnost této separační metody. HPLC s reverzní fází je velice často napojena přímo na hmotnostní analyzátor (LC-MS). Velmi často je také využíváno kombinace různých separačních módů za sebou, označovaná jako tandemová HPLC, kterou můžeme dosáhnout lepšího rozdělení peptidů ze směsí. Pro tento postup byl poprvé použit termín „MudPIT“ (*Multidimensional Protein Identification Technique*) (Washburn M. P., et al., 2001), kdy je významně zvýšen počet identifikovaných peptidů při jedné analýze a to díky další separaci peptidů (Liebler D. C., 2002).

Iontově-výměnná chromatografie je metodou, kde je stacionární fází ionex. Principem je navázání analytů pomocí elektrostatických interakcí mezi analytem a opačně nabitým sorbentem. Tato metoda je velice citlivá a umožňuje rozdělení molekul, které se liší nábojem pouze minimálně (např. jednou nabitou aminokyselinou) (Mallick P., et al., 2010; Veenstra T. D., et al., 2006).

Narozdíl od iontově-výměnné chromatografie separuje metoda gelové filtrace proteiny podle jejich velikosti. Pokud je protein příliš velký na to, aby vnikl do pórovitého materiálu, je eluován z kolony nejrychleji. Se zmenšující se velikostí vnikají proteiny do pórů hlouběji a jsou více zpožděny (Veenstra T. D., et al., 2006).

Afinitní chromatografie je zcela rozdílná separační technika, kdy jsou proteiny nebo skupiny proteinů selektivně zachyceny na specificky interagujícím ligandu. Komplex ligand-protein je poté destabilizován přidáním soli, změnou pH, přidáním konkurenčního ligandu, denaturačního prostředku nebo enzymatickým štěpením (Mallick P., et al., 2010).

Metoda byla poprvé použita v roce 1968 Pedrem Cuatrecasasem pro izolaci enzymů (Cuatrecasas P., et al., 1968). Ligandem pro afinitní chromatografii může být jakákoliv dostatečně silně a specificky reagující molekula – například protilátka, metabolit a jiné (Azarkan M., et al., 2007). V průběhu let bylo popsáno využití mnoha rozdílných typů ligandů vázajících proteiny na základě různých vlastností - od elektrického náboje po biologickou afinitu (Mallick P., et al., 2010). Mimo jiné je díky afinitní chromatografii možné studovat interagující partnery. Konkrétní protein je exprimován, purifikován a poté imobilizován. Díky selektivní interakci se na něj naváže interagující protein, který je poté eluován (Kool J., et al., 2011).

Dalším důležitým typem chromatografie je chromatografie s reverzní fází, ve které je stacionární fází nepolární sorbent a mobilní fází polární kapalina. Dnes používané stacionární nepolární fáze (uhlovodíkové řetězce C₄ - C₁₈) jsou chemicky vázané na nosič (grafitové nebo uhlíkem potažené silikagely, kopolymery styrenu a divinylbenzenu atd.). Ve většině aplikací této metody slouží jako mobilní fáze směs vody a organického rozpouštědla (metanolu, isopropanolu, acetonitrilu ap.). Jelikož stacionární fáze má nepolární charakter, tak k ní mají větší afinitu látky s vyšším obsahem hydrofobních oblastí (méně polární). Proteiny či peptidy jsou poté z kolony postupně eluovány rostoucím gradientem koncentrace organického rozpouštědla. Nejběžněji používaným chromatografickým materiálem pro přečištění a odsolení vzorků před MS analýzou je reverzní fáze C₁₈ (Niessen W. M. A., 2006; Rappsilber J., et al., 2007; Mallick P., et al., 2010).

Vlastnost	Technika
Náboj	Iontově-výměnná chromatografie, chromatofokusace
Velikost	Gelová filtrace
Hydrofobicita	Chromatografie s reverzní fází, chromatografie s hydrofobními interakcemi
Ligandová specifita	Afinitní chromatografie

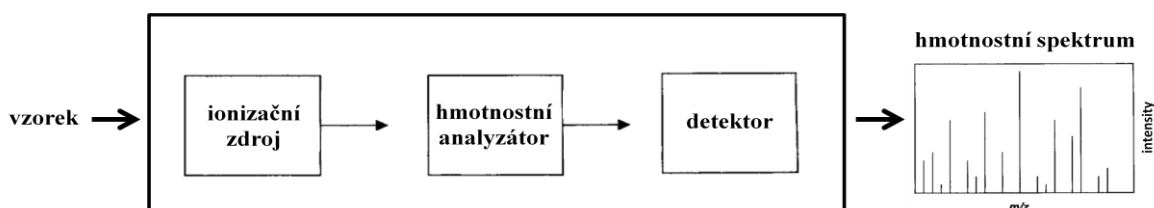
Tab. 1: Chromatografické metody a vlastnosti, podle kterých jsou při nich látky děleny (Westmermeier R., et al., 2002).

2.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která je klíčovou analytickou metodou v proteomice. Pomocí MS jsme schopni měřit poměr hmotnosti a náboje (m/z) (Fenn J. B., et al., 1989) a zjistit tak přesnou molekulovou hmotnost intaktních proteinů či proteolyticky štěpených peptidů (Liebler D. C., 2002). Hmotnostní spektrometrii řadíme díky její vysoké citlivosti, přesnosti, širokému dynamickému rozsahu, rychlosti analýzy a možnosti stanovení sekvence a posttranslačních modifikací proteinů mezi nejúčinnější metody identifikace biomolekul (Boháč M., et al, 2005).

Fyzik J. J. Thomson je považován za otce hmotnostní spektrometrie a to díky jeho pracím o vychylování katodového záření v elektrickém poli (Thomson J. J., 1897). Thomson s pomocí Francise W. Astona sestrojil první hmotnostní spektrometr schopný měřit hmotnost nabitých atomů. Zařízení využívalo plynové výbojky jako zdroj iontů, které následně procházely elektrickým a magnetickým polem a byly vychylovány a detekovány na fotografické desce (Aston F. W., 1919). Oba obdrželi za své objevy Nobelovu cenu. První hmotnostní identifikace peptidů byly provedeny v roce 1958 (Andersson C-O., 1958; K. Biemann, et al, 1959). Během těchto více než 50 let vývoje byla výrazně zlepšena robustnost, citlivost a použitelnost MS analýzy. Ta je nyní rutinní součástí experimentálních pracovních postupů a díky MS bylo odhaleno nesčetné množství významných biologických fenoménů (Mallick P., et al., 2010). V současné době mohou být kvantifikovány a rychle identifikovány tisíce proteinů, čehož může být využito ke katalogizování proteinů produkovaných v daném typu buněk, charakterizování posttranslačních modifikací a také může být sledováno, jak se mění exprese proteinů ve vzorku za různých experimentálních podmínek (Twyman R. M., 2004).

Hmotnostní spektrometr je iontově-optické za řízení, které rozlišuje ionty podle poměru jejich m/z a skládá se ze tří základních částí – ionizačního zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru (obr. 2).

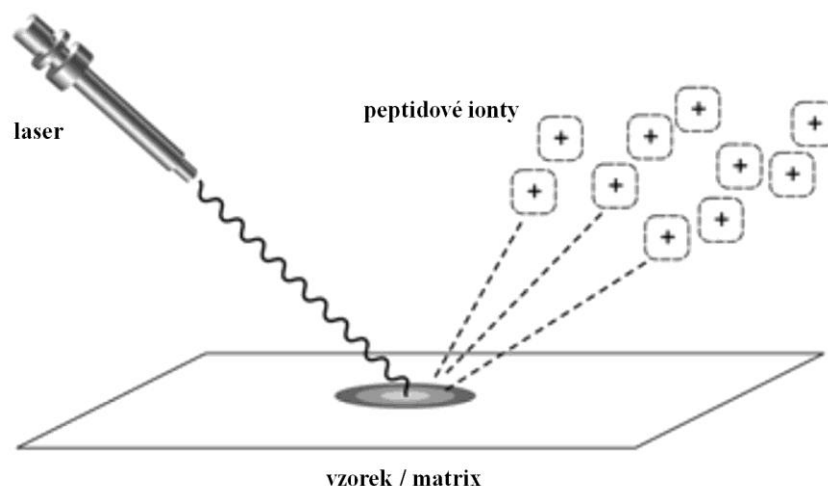


Obr. 2: Obecné schéma hmotnostního spektrometru (Liebler D. C., 2002).

2.2.3.1 Ionizační zdroje

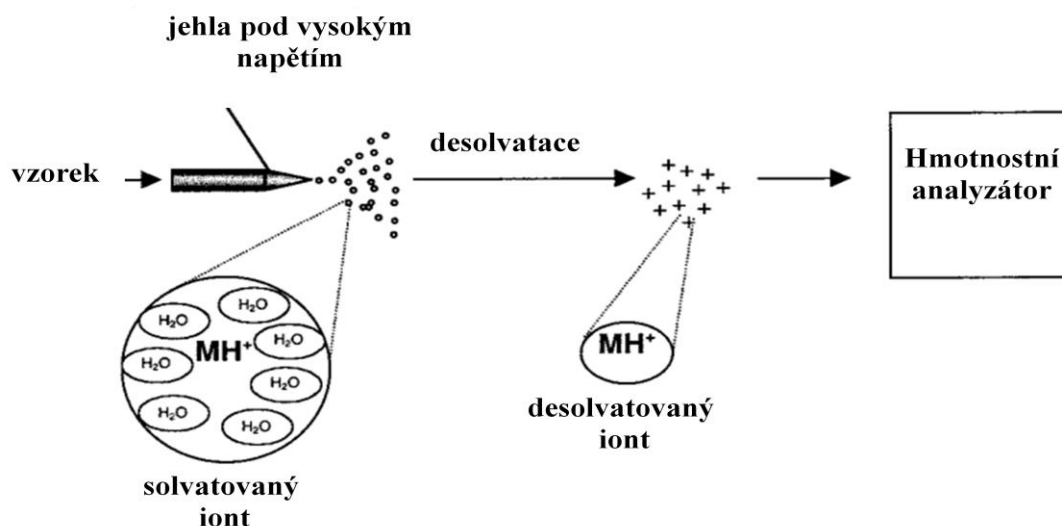
Ionizační zdroj je důležitou součástí hmotnostního spektrometru, ve kterém jsou proteiny/peptidy ionizovány. Podle množství dodané energie při ionizaci mohou být zdroje rozděleny na „měkké“ a „tvrdé“. Typickým zástupcem „tvrdé“ ionizace je například elektronová ionizace, která je založena na principu předávání energie letících elektronů molekulám analytu (Friedecký D., et al., 2012). Problémem použití „tvrdé“ ionizační techniky může být úplný rozpad molekulového iontu ve zdroji, a proto bývají častěji používány „měkké“ ionizační techniky jako je ionizace elektrosprejem (*Electrospray Ionization*, ESI), MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), chemická ionizace (CI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), bombardování rychlými ionty (FAB) a další. Nejčastěji používanými ionizačními zdroji jsou MALDI (Tanaka K., et al., 1988) a ESI (Fenn J. B., et al., 1989).

Principem MALDI ionizace (obr. 3) je smíchání vzorku s matricí, která obsahuje malé organické molekuly s chromoforem absorbujícím světlo typických vlnových délek. Jako matrice je používána kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) pro peptidy menší než 10 kDa, 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina (sinapová kyselina, SI) pro proteiny větší než 10 kDa, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) pro neutrální sacharidy a 3-hydroxypikolinová kyselina (HPA) pro oligonukleotidy (Karas M., et al., 1995). Matrice se vzorkem je poté nanášena na kovovou destičku, na které směs zkrystalizuje. Poté je vzorek umístěn do zdroje, který je vybaven laserem (nejčastěji se používá dusíkový laser o vlnové délce 337 nm). Po dopadu laseru na krystal absorbují molekuly matrice svazek fotonů a stanou se elektricky nabitými. Tento nadbytek energie je potom přenesen na peptidy nebo proteiny a ty jsou tak ionizovány. Peptidové ionty jsou následně vystřeleny do plynné fáze a vstupují do hmotnostního analyzátoru. Celý proces probíhá ve vakuu (Liebler D. C., 2002).



Obr. 3: Schéma MALDI ionizace (Liebler D. C., 2002).

Dalším běžným ionizačním zdrojem je ESI, která byla vyvinuta Johnem B. Fennem a za kterou sdílel Nobelovu cenu za chemii v roce 2002 (Fenn J. B., et al., 1989). Na rozdíl od MALDI, při níž je vzorek zkrystalizován, je při ionizaci ESI vzorek rozpuštěn ve vodném roztoku. Jednou z největších výhod ESI je její kompatibilita s kapalinovou chromatografií. Peptidy tak mohou vstupovat do ionizačního zdroje přímo z kapalinového chromatografu (tzn. vše probíhá „online“) (Liebler D. C., 2002; Veenstra T. D., et al., 2006). Pro ionizaci těchto peptidů musí vzorek projít jehlou z nerezové oceli, která je pod vysokým napětím (2-5 kV) (obr. 4) (Friedecký D., et al., 2012). Podle aplikovaného napětí získávají molekuly pozitivní, či negativní náboj, avšak pro analýzu proteinů a peptidů je nejčastěji používána pozitivní ionizace (Veenstra T. D., et al., 2006). Z nerezové jehly je poté vzorek rozstříknut v jemných kapičkách, které obsahují jak peptidové ionty, tak složky mobilní fáze HPLC (vody, acetonitrilu, kyseliny octové, atd.). Zahřátím kapiláry a působením plynného dusíku dochází k desolvataci nastříkovaného vzorku. Elektroneutrální kapičky solventu jsou vypumpovány mimo zdroj, zatímco nabitě molekuly analytu vstupují do hmotnostního analyzátoru. To, co odlišuje ESI od ostatních ionizačních metod, je její schopnost tvořit násobně nabitě ionty z širokého množství biologických molekul. Počet nábojů, kterých může molekula nabýt, závisí na mnoha faktorech zahrnujících také její bazicitu a velikost. Peptidy se nejčastěji vyskytují jako jednou, dvakrát, nebo třikrát nabitě ionty (Liebler D. C., 2002).



Obr. 4: Schéma ESI ionizace (Liebler D. C., 2002).

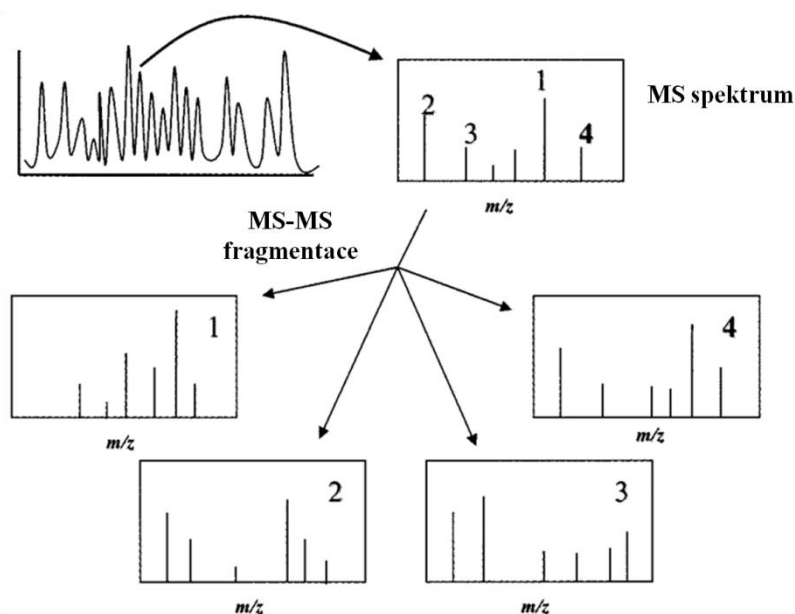
2.2.3.2 Hmotnostní analyzátoary

Po ionizaci vstupují peptidy do hmotnostního analyzátoary. Jedním z běžně používaných hmotnostních analyzátoary je analyzátoar doby letu (*Time of flight*, TOF) měřící čas, za který ionty urazí přesně definovanou vzdálenost od zdroje k detektoru. Doba, za kterou dorazí iont na detektor je přímo úměrná jeho m/z hodnotě, tzn. čím menší je m/z , tím rychleji iont letí. Příkladem hmotnostního analyzátoary je kvadrupól, iontová past, orbitální past (Orbitrap), analyzátoar s dvojí fokusací (*High Resolution*, HR-MS), iontová cyklotronová rezonance (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*, FT-ICR) a další.

Hmotnostní analyzátoary mohou fungovat také v tandemovém uspořádání (McLafferty F. W., 1981) - nejběžnějšími jsou tripl-kvadrupól (QQQ), TOF-TOF a Q-TOF (*Quadrupole-time of flight*) (Mallick P., et al., 2010).

Běžně používanou strategií pro získání dat je DDA metoda (*Data Dependent Acquisition*) (Wu C. C., et al, 2002), kdy je ze směsi peptidových iontů v dané frakci vyselektován tandemovým hmotnostním analyzátoarem určitý počet m/z iontů o nejvyšší intenzitě (obr. 5). Množství vybraných iontů závisí na výkonnosti stroje, tzn. kolik MS/MS analýz je schopen provést za určitý čas. Tyto ionty jsou poté vystaveny kolizi-indukované disociaci (*Collision-Induces Dissociation*, CID), při které dochází ke srážkám ionizovaných peptidů s molekulami inertního plynu v kolizní cele. V důsledku toho dojde k rozrušení nejméně stabilních kovalentních vazeb peptidového řetězce a vzniku fragmentových iontů, které jsou detekovány v dalším hmotnostním analyzátoaru. Výběr

právě analyzovaných peptidových iontů je poté na určitou dobu zakázán, což umožňuje selekci méně zastoupených peptidových iontů. Získané iontové spektrum obsahuje informace, které umožňují odvození sekvence peptidů včetně typu a lokalizace posttranslačních modifikací (Liebler D. C., 2002; Neilson K. A., et al, 2011).



Obr. 5: Schematické znázornění automatizovaného sběru MS/MS spektra metodou DDA (Liebler D. C., 2002).

2.2.3.3 Detektory

Ionty vybrané hmotnostním analyzátozem jsou zaznamenány detektorem, následně je signál převeden do digitálního formátu. Detektory mohou být obecně rozděleny do dvou skupin podle způsobu záznamu iontů. První skupina detektorů zaznamenává všechny ionty bez ohledu na velikost m/z a jejich principem je přímé měření elektrického proudu, který vzniká při srážce iontu s dynodou. Druhá skupina detektorů je schopna zaznamenat ionty i ve vztahu k velikosti m/z , které jsou detekovány jako komplexní „proudový obraz“ všech přítomných iontů s různými hodnotami m/z , a to díky indukci proudu v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátozem (např. iontově cyklotronová rezonance a orbitrap) (Friedecký D., et al., 2012).

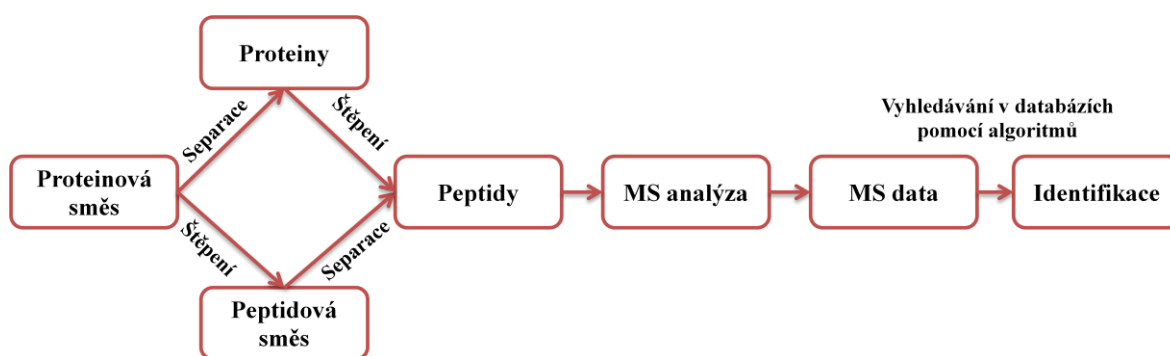
2.2.3.4 Interpretace získaných spekter po MS analýze

Identifikace proteinů je dnes prováděna prohledáváním dostupných databází, ze kterých jsou podle zadaných parametrů vhodným algoritmem vygenerovaná teoretická spektra, která jsou poté srovnávána se spektry experimentálně získanými. Při srovnání těchto spekter je to míra překryvu mezi sledovaným a předpokládaným píkem, co určuje nejlepší potenciaální shodu (Havliš J., et al., 2005).

2.3 Příprava vzorku pro hmotnostní analýzu

Příprava vzorku pro MS analýzu je nejdůležitějším, ale zároveň nejproblematičtějším krokem pro dosažení přesných a správných výsledků. Způsob přípravy vzorku se liší hlavně podle požadavků pro analýzu – zda je účelem analýzy identifikace všech proteinů v kompletní směsi, pouze určitá skupina proteinů, či dokonce jen jeden protein.

Podle účelu analýzy je vybrán jeden ze dvou základních proteomických přístupů. První z nich je top-down analýza, která nám poté umožňuje pracovat s intaktními proteiny, jež jsou fragmentovány a analyzovány pomocí MS/MS. Druhým přístupem je bottom-up analýza, označovaná jako „shotgun“. Ta je založená na počátečním štěpení složitého proteinového vzorku, vzniklá směs peptidů je následně separována a analyzována. Obecné schéma bottom-up experimentu je ukázáno na obrázku 6 (Verberkmoes N. C., et al., 2005).



Obr. 6: Obecný postup bottom-up analýzy (Liebler D. C., 2002).

V klasickém „bottom-up“ experimentu zahrnuje příprava vzorku extrakci a rozpuštění proteinů, redukci disulfidických vazeb, alkylaci volných cysteinových zbytků a štěpení proteinů na peptidy. Při této přípravě je velmi důležitým požadavkem rozpustění co

nejvíce proteinů s co nejmenšími kontaminacemi jinými biologickými materiály (např. lipidy, celulóza, nukleové kyseliny, atd.), čehož nejčastěji dosahujeme přidáním detergentů, redukčních činidel, denaturačních činidel a enzymů. Většina zmíněných aditiv musí být před MS analýzou odstraněna, protože znemožňují přesnou a správnou proteomickou analýzu. Nejčastějšími metodami odstranění aditiv je srážení, odpaření, fázový transfer a další, avšak způsob odstranění musí být vybrán podle typu použitého aditiva. Problémem je, že při odstraňování aditiv dochází ke ztrátě části vzorku, stejně tak jako při každém kontaktu vzorku s povrchem špičky pipety či mikrozkrumavky. Jelikož se v proteomice pracuje s velmi malým množstvím vzorku, mohou být výsledky analýzy signifikantě ovlivněny postupem a použitými pomůckami (Brownridge P., et al., 2011; Maurer M., et al, 2013).

2.3.1 Extrakce proteinů z biologického vzorku

Rozpustnost a lokalizace proteinu v rámci buněčných struktur zásadně ovlivňují účinnost štěpení. Proteiny mohou být intracelulární nebo extracelulární, jsou také součástí různých organel či membrán. Důsledkem je, že extrakce rozdílných proteinů často vyžaduje optimalizaci složení extrakčního pufru – iontová síla, detergenty, apod., ale i celého experimentálního postupu (Mallick P., et al., 2010). Byly vyvinuty metody pro extrakci proteinů z různých typů vzorků (extrakce proteinů z listu se bude lišit od extrakce proteinů z buněčné kultury). Tyto postupy se odlišují především použitím aditiv a typem homogenizace (Liebler D. C., 2002).

Biologický vzorek je vždy nutné nejdříve homogenizovat, např. pomocí tekutého dusíku, sonikováním či jiným způsobem podle povahy vzorku a rozpustit jej ve vhodném pufru. Degradaci proteinů zabráníme přidáním inhibitorů proteáz a důsledným chlazením vzorku po celou dobu extrakce.

Velice důležitým krokem při extrakci proteinů je odstranění nukleových kyselin, kterého je dosaženo přidáním příslušných štěpících enzymů, DNAsy, popř. také RNAsy (Liebler D. C., 2002).

2.3.2 Separace proteinů před štěpením

Separace proteinů před jejich štěpením je provedena pokud je potřeba snížit komplexitu vzorku, nebo nás zajímá pouze konkrétní skupina proteinů. Pro tuto separaci proteinů je nejčastěji použita 1DE, 2DE, izoelektrická fokusace (IEF), případně HLPC. Důvodem je rozdělení proteinů podle jejich vlastností (podle jakých závisí na zvolené metodě) a separace komplexní směsi do několika frakcí, se kterými se dále pracuje. Případně jsou štěpeny pouze vybrané frakce obohacené o proteiny, které nás zajímají (Liebler D. C., 2002).

2.3.3 Precipitace a zakoncentrování proteinů

Pro zakoncentrování proteinů jsou používány metody jako je precipitace, vakuové vymrazování (lyofilizace), centrifugační odparka či centrifugace přes filtr. Precipitace proteinů s sebou nese výhodu oddělení iontů a látek interferujících s proteiny, které po precipitaci proteinů zůstávají v roztoku. Precipitace může být jak denaturující, tak nativní.

Příkladem denaturující precipitace je chloroform/metanolová precipitace, která může být použita při objemu vzorku od 10 do 150 μ l. Proteiny jsou rozpuštěny v roztoku s methanolem a poté srazeny chloroformem. Přidání vody rozdělí voda/methanol/chloroformový roztok na dvě fáze a sražené proteiny zůstávají v interfázi.

Je-li nutné zachovat aktivity proteinů, je vhodné použít precipitační techniky, které následně umožní vrácení proteinů do nativního stavu. V tomto případě jsou proteiny precipitovány při nízké teplotě síranem amonným, polyethylén glykolem (PEG), nebo s organickými rozpouštědly (např. aceton) (Rehm H., 2006).

2.3.4 Rozpouštění proteinů a jejich denaturace

Po extrakci proteinů ze vzorku a jejich precipitaci (pokud byla použita) je třeba získané proteiny dobře rozpustit. Cílem rozpouštění a denaturace získaných proteinů je zpřístupnění míst pro štěpení. Rozpustnost jednotlivých proteinů závisí na jejich vlastnostech. Velice problematické je rozpouštění proteinů hydrofóbní a amfipatické povahy, které jsou ve vodě nerozpustné. Proto je pro úplné rozpouštění proteinů nutné použití detergentů, které tento proces usnadňují. Tyto detergenty musí být před MS analýzou odstraněny (Zhou J., et al., 2006).

Detergenty jsou amfipatické molekuly, které se skládají z hydrofóbní (fenylové deriváty, alifatické řetězce,..) a z hydrofilní části (ionizovaná skupina, sacharid, hydroxylová skupina, nebo polyethylenglykol). Díky tomuto složení jsou detergenty schopny narušit nekovalentní interakce v molekulách proteinu (protein-proteinové interakce, sekundární i terciální strukturu proteinu) a to tak, že se svou polární hydrofilní částí váží k molekulám polárního rozpouštědla (molekuly vody), zatímco hydrofobní řetězce interagují s molekulami hydrofobních částic. Detergenty mohou být iontové (silně denaturační), neiontové (nedenaturační) či obojetné (zwitteriontové) (Bennion B. J., 2003; Liebler D. C., 2002; Rehm H., 2006).

Jedním z nejčastěji používaných silných detergentů s denaturačními účinky při rozpouštění proteinů je dodecylsírán sodný (SDS), který však nesmí být přítomen v roztoku při štěpení proteinů (Maurer M., et al, 2013). Musí být tedy z roztoku odstraněn a to nejčastěji precipitací organickými rozpouštědly (Botelho D., et al., 2010). Tento krok ale způsobuje relativně velké ztráty vzorku, metoda je časově náročná a není příliš efektivní (Beers M. F., et al., 1992). Řešením problému s odstraněním SDS ze vzorku je nedávno představená metoda přípravy vzorku na centrifugačním filtru (*Filter Aided Sample Preparation*, FASP). Při této metodě jsou odstraněny nízkomolekulární látky (včetně SDS) díky výměně pufrů. Zmíněné látky prochází centrifugačním filtrem, zatímco proteiny a další vysokomolekulární látky jsou na filtru zachyceny (Manza L. L., et al., 2005; Wiśniewski J. R., et al., 2009a).

Druhým často používaným detergentem je deoxycholát sodný (DOC), který je v porovnání s SDS levnější, pokrytí sekvence po štěpení trypsinem je vyšší, stejně jako počet identifikací hydrofobních peptidů (Zhou J., et al., 2006). Odstraněn může být srážením organickými rozpouštědly nebo fázovým transferem (Masuda T., et al., 2008).

Dalšími detergenty jsou například močovina, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propanulfonát (CHAPS), Triton X-100, Tween, Igepal CA-630, a další. Denaturace proteinu může být provedena také zahřátím, ale při tomto postupu dochází ke ztrátě části vzorku srážením, protože mnoho proteinů podléhá po vystavení teplu agregaci (Strader M. B., et al., 2006).

2.3.5 Redukce

Efektivita štěpení proteinů je výrazně zvýšena rozrušením terciální struktury proteinů, která je stabilizována především disulfidickými vazbami (Wedemeyer W. J., et al., 2000). Pro zvýšení efektivity štěpení je tedy nutné redukovat disulfidické vazby v proteinech.

Dříve byl pro redukci používán β -merkapt ethanol. Ten byl později nahrazen dithiothreitem (DTT), který dnes patří mezi běžná redukční činidla. Obě zmíněné látky patří mezi thioly, jejichž mechanismus redukce je založen na výměně thiolového aniontu (XS^-) (Getz E. B., et al., 1999). DTT je díky svému nízkému redoxnímu potenciálu (-0,33 V v pH 7) schopný udržovat monothiol zcela v redukovaném stavu a redukovat tak disulfidy proteinu (Cleland W. W., 1964). Jednou z velkých nevýhod DTT je, že reaguje s alkylačními činidly. Řešením tohoto problému může být redukce pomocí tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP), který umožňuje provedení redukce a alkylace v jednom kroku (Andrews P. C., et al., 1987). TCEP je oproti DTT dobrým reduktantem v širším rozmezí pH (1,5 – 8,5) a je stabilnější i při pH hodnotách nad 7,5 (Getz E. B., et al., 1999).

2.3.6 Alkylace

Volné sulfhydrylové skupiny (-SH) vzniklé redukcí disulfidických vazeb jsou silně reaktivní a spontánně oxidují s jinými sulfhydrylovými skupinami za vzniku nových disulfidových můstků (S-S). Aby tomu bylo zabráněno, tak je nutné tyto volné -SH skupiny alkylovat (Herbert B., et al., 2011). Toho dosahujeme použitím alkylačního činidla jako je například kyselina iodoctová (IAA) nebo iodacetamid (IAM) (Crestfield A. M., et al., 1963). Tato činidla podléhají rozkladu na světlo, a proto musí reakce probíhat ve tmě. Nejvhodnějším pH pro průběh reakce je 8-9, protože při vyšších hodnotách hrozí modifikace aminoskupin, zatímco při pH nižším než 8 dochází k oxidaci methioninu (Plowman J. E., et al., 2003). Dalšími alkylačními činidly jsou například akrylamid (Mineki R., et al., 2002) či N-ethylmaleimid (NEM), které ale nejsou využívány v tak hojné míře jako IAA a IAM.

2.3.7 Štěpení proteinů

Nejběžnější strategií pro identifikaci proteinů je jejich štěpení na peptidy, které jsou poté podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru. Od tohoto požadavku se odvíjí vhodný výběr typu štěpení (v gelu, v roztoku) (Havliš J., et al., 2005).

Štěpení peptidů může proběhnout chemicky či enzymaticky, avšak metody chemické jsou používány spíše doplňkově a převážně tehdy, kdy není možné použití enzymů (Westermeier R., et al., 2002). Naproti tomu enzymatické štěpení proteinů je již rutinní záležitostí proteomických experimentů. Jeho velkou výhodou je především dobrá účinnost štěpení, vysoká specifita a minimalizované vedlejší reakce. Komerčně je dostupná celá řada enzymů, které lze volit na základě kladených požadavků. Nejčastěji používanou proteázou je trypsin, který štěpí proteiny za lysinem a argininem, pokud nejsou následovány prolinem. Délka peptidů po štěpení trypsinem je průměrně 6-11 aminokyselin, což je délka vhodná pro MS analýzu (tzn. mezi 6-20 aminokyselinami). Při štěpení v gelu i roztoku může být trypsin nahrazen či doplněn chymotrypsinem (Marshall J., et al., 2004; Kinter M., et al., 2000). Dalšími striktně specifickými proteásami vhodnými pro peptidové mapování jsou Arg-C a Lys-C. Jiné enzymy nejsou běžně používány pro peptidové mapování, ale spíše pro analýzu specifických vlastností proteinů – elastáza (např. lokalizace fosforylačních míst) Glu-C a Asp-N (studium glykosylace), Lys-C (analýza peptidů s disulfidovými vazbami) a další (Kinter M., et al., 2000; Havliš J., et al., 2005).

Pokud je třeba pre-separovat proteiny před jejich štěpením pomocí jedno- nebo dvoudimenzionální gelové elektroforézy, jsou poté proteiny štěpeny přímo v gelu. Výhodou identifikace proteinů z polyakrylamidovém gelu v porovnání s přístupy štěpení v roztoku je především to, že jsou MS analýze podrobeny proteinové pásy o konkrétní molekulové hmotnosti odděleně, což zvyšuje hloubku analýzy (počet identifikovaných proteinů a detekci posttranslačních modifikací). Gelovou elektroforézou jsou navíc odstraněny nízkomolekulární nečistoty včetně detergentů, které jsou často škodlivé pro MS analýzu (Shevchenko A., et al., 2006).

Pokud není nutné proteiny před štěpením předseparovat, je výhodnější použít metodu štěpení proteinů v roztoku, kde jsou štěpeny všechny proteiny přítomné ve vzorku najednou. Výhodou je vynechání kroku separace a extrakce peptidů z gelu, ve kterém je vysoká pravděpodobnost zadržení proteinů v gelu a ztráty proteinů zastoupených v malém množství (Link A. J. et al., 1999; Ru Q. C., et al., 2006). Skupina N. Nagaraje srovnala ve

svých experimentech metodu štěpení v gelu a v roztoku, konkrétně efektivitu identifikace membránových proteinů a pokrytí sekvence identifikovaných proteinů. Výsledky ukazují, že štěpení v roztoku poskytlo asi dvakrát více identifikací než štěpení v gelu (přibližně 700 proteinů v roztoku a 320 proteinů v gelu). Pokrytí sekvence při štěpení proteinů v roztoku bylo asi o 5 % vyšší než při štěpení v gelu (Nagaraj N., et al., 2008). Nevýhodou štěpení proteinů přímo v roztoku je, že použítá aditiva zůstávají v roztoku po celou dobu štěpení. Nelze proto v této metodě použít aditiva, která se štěpením kolidují (Yu Y. Q., et al., 2003).

Nedávno představená metoda štěpení proteinů na centrifugačním filtru (*Filter Aided Sample Preparation*, FASP) kombinuje výhody kompletního rozpuštění pomocí SDS či jiných aditiv s výhodami štěpení v roztoku (Wiśniewski et al., 2009a; Maurer M., et al., 2013). Výhodou oproti štěpení přímo v roztoku je možnost výměny roztoků a odstranění detergentů a dalších nízkomolekulárních látek – tyto látky projdou při centrifugaci membránou, zatímco proteiny jsou membránou zadrženy. Proteiny jsou poté přímo na membráně štěpeny a vzniklé peptidy jsou eluovány do sběrné zkumavky (Wiśniewski J. R., 2011). Díky tomu je při metodě FASP možné použít aditiva, která vadí štěpení, protože jsou před samotným štěpením vymyty a vyměněny za vhodný pufr. Metoda FASP však není vhodná pro vzorky s nízkou koncentrací proteinů (< 100 ng), protože při takto nízkých koncentracích jsou ztráty způsobené navázáním proteinů a peptidů na centrifugační filtr více znatelné než při vyšších koncentracích vzorku (Liebler D. C., et al., 2009; Wiśniewski J. R., et al., 2009b). Těmto ztrátám je možné se alespoň částečně vyhnout přístupem zvaným multienzymové štěpení (*Multi-Enzyme Digestion*, MED), kdy je po štěpení na centrifugačním filtru aplikován druhý (a poté případně třetí) enzym, což výrazně zvýší počet identifikovaných proteinů a pokrytí jejich sekvence (Wiśniewski J. R., et al., 2012).

2.3.8 Frakcionace peptidů a jejich přečištění

Velmi komplexní peptidové směsi, které vznikají například po štěpení proteinů v roztoku, je často nutné prefrakcionovat. K tomuto účelu se nejběžněji využívá reverzní fáze (např. C18), ze které jsou peptidy eluovány podle jejich hydrofobicity zvyšující se koncentrací nepolárního rozpouštědla (např. ACN). Jedním z nejjednodušších způsobů použití jsou tzv. Stage Tips – špičky s uvnitř vloženým chromatografickým materiálem. Jinou možností prefrakcionace peptidů je například kationt-měničová chromatografie (SCX), kde jsou

peptidy adsorbovány s afinitou, která je úměrná celkovému počtu kladných nábojů (např. ionizované atomy dusíku) na každý peptid a poté jsou z kolony eluovány gradientem soli (Kupiec T., 2004; Rappsilber J., et al., 2007).

Před hmotnostní analýzou je nutné peptidovou směs přechistit a zakoncentrovat. K tomu je nejčastěji využíván chromatografický materiál C18 (Rappsilber J., et al., 2007).

3 Experimentální část

3.1 Materiál a chemikálie

Hepes/NaOH (Sigma-Aldrich, Německo), Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, Německo), sodium deoxycholát (DOC) (Fluka, Německo) dodecylsírán sodný (SDS) (Serva, Německo), dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Německo), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, Německo), Roche inhibitor cocktail complete, EDTA free (Roche, Švýcarsko), Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich, Německo), NaF (Fluka, Německo), dvojsodná sůl β -glycerofosfátu (Sigma-Aldrich, Německo), Na_2MoO_4 (Sigma-Aldrich, Německo), vinan sodný (Fluka, Německo), butyrát sodný (Sigma-Aldrich, Německo), benzoáza (Novagen, USA), aceton (Sigma-Aldrich, Německo), tekutý dusík, jodacetamid (IAM) (Sigma-Aldrich, Německo), močovina (NH_2CONH_2) (Sigma-Aldrich, Německo), thiomočovina (NH_2CSNH_2) (Fluka, Německo), ProteaseMax (Promega, USA), Tris (Serva, Německo), HCl (Lach-ner, ČR), tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) (Sigma-Aldrich, Německo), trypsin (MP Biomedical, Francie), $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ (Fluka, Německo), triethylamonný hydrogenuhličitanový pufr (TEAB) (Fluka, Německo), ethylacetát (Sigma-Aldrich, Německo), kyselina mravenčí (FA) (Riedel-de Haën, Německo), methanol (MeOH) (Lach-ner, ČR), trifluoroctová kyselina (TFA) (Sigma-Aldrich, Německo), isopropanol (iPrOH) (Merck millipore, Německo), extrakční disk C18 Empore (3M Center, USA), centrifugační filtry Amicon Ultra, 0,5 ml, membrána 30 K (Milipore, Irsko).

3.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko),
míchačka Vortex mixer SA8 (Stuart, Velká Británie),
centrifuga minispin (Eppendorf, Německo),
pH metr MultiCal pH 526 (WTW, Německo),
pipety (Eppendorf, Německo),
ultrazvuková lázeň Elmasonic S10 (Elma, Německo),
spektrofotometr Synergy H4 Hybrid Reader (BioTek, USA),
třepačka KS 130 control (IKA, Německo),
laminární flowbox biohazard (Ferrara, Itálie),

centrifuga CL 31R Multispeed (Thermo elektron corporation, USA)
rotační vakuová odparka Concentrato plus (Eppendorf, Německo),
Systém nLC nanoEASY (Proxeon, Nizozemí, Bruker Daltonics, Německo) s tandemovou hmotností detekcí Q-TOF vybavenou elektrospray ionizací (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo).

3.3 Použité roztoky

Extrakce proteinů:

Modifikovaný RIPA pufr Hepes/NaOH (25mM), NaCl (150mM), 1% IGEPAL CA-630 (v/v), 0,1% DOC (w/v), 0,1% SDS (w/v), DTT (1 mM), PMSF (1 mM), směs inhibitorů proteáz cOmplete EDTA free, Na₃VO₄ (1 mM), NaF (10 mM), dvojsodná sůl β-glycerofosfátu (5 mM), Na₂MoO₄ (1 mM), vinan sodný (4 mM), butyrát sodný (10 mM), pH 7,5.

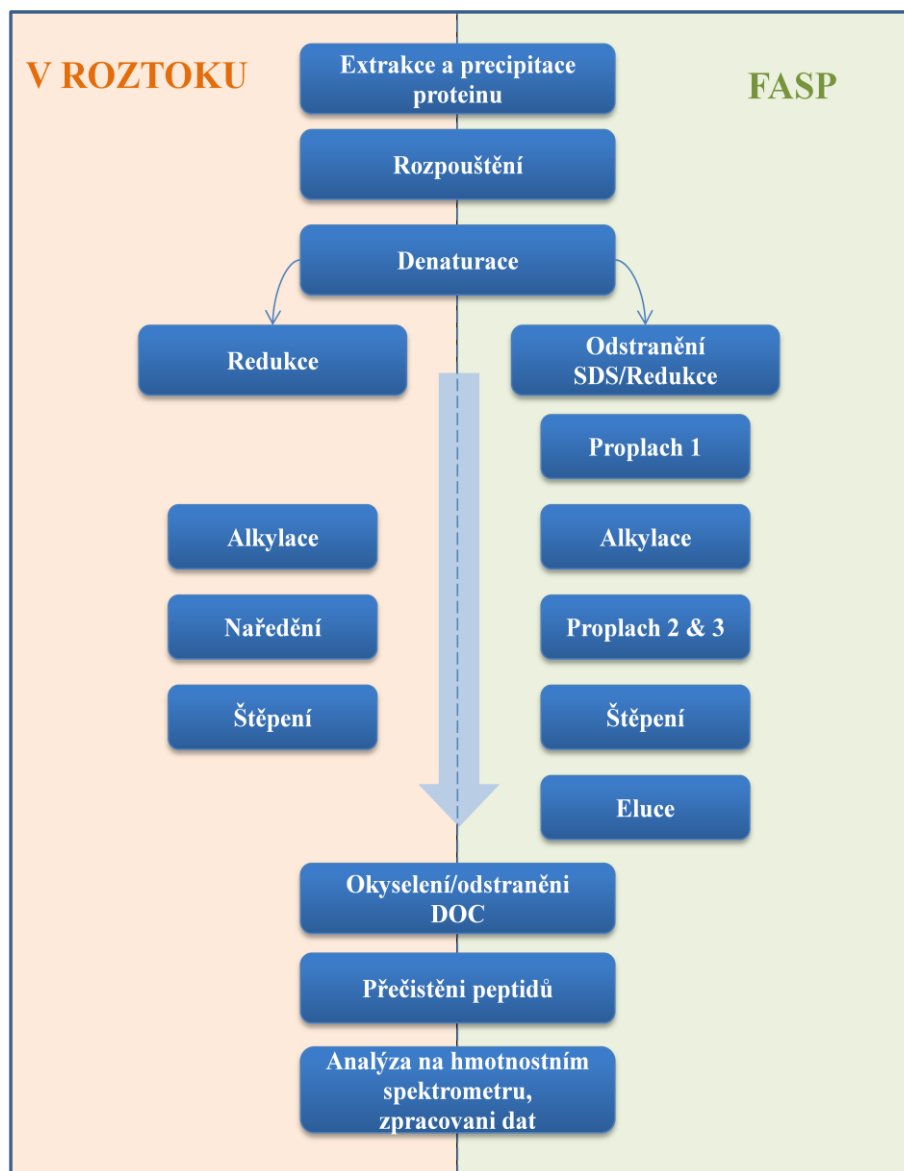
Štěpení v roztoku:

25mM triethylamonný hydrogenuhličitanový pufr (**TEAB pufr**) s příslušnými aditivy (tab. 2)

Tris/Cl pufr pH 8,5 s příslušnými aditivy (tab. 3) - 100mM Tris, HCl pro úpravu pH

3.4 Metody

Byly srovnány dvě metody štěpení proteinů v roztoku – v prvním případě byly proteiny štěpeny v mikrozkuhavce (Yu Y. Q., et al., 2003; Zhou J., et al., 2006; Lin Y., et al., 2008; Nagaraj N., et al., 2008; Saveliev S., et al., 2008; Rietschel B., et al., 2009; Proc J. L., et al., 2010), v případě druhém na centrifugačním filtru (FASP) (Manza L. L., et al., 2005; Masuda T., et al., 2008; Wiśniewski J.R., et al., 2009b; Bereman M. S., et al., 2011; Maurer M., et al., 2013; Erde J, et al., 2014). Každá z metod byla provedena ve více variantách, které se lišily přidáním aditiv a každá z variant byla provedena v triplicátu. Obecné schéma (obr. 7) zobrazuje postup experimentu a rozdíly mezi použitými metodami. Jednotlivé kroky jsou popsány v příslušných podkapitolách.



Obr. 7: Obecné schéma experimentu

3.4.1 Extrakce proteinů

Lýze HeLa S3 buněk proběhla v modifikovaném RIPA pufru. Peletky byly poskytnuty zamražené ve 3 mikroskopických, bylo k nim přidáno 250-300 μ l modifikovaného RIPA pufru podle jejich velikosti a poté byly rozsuspendovány pomocí Hamiltonovy stříkačky. Následně byly vzorky inkubovány 15 minut na ledu. Po těchto 15 minutách bylo přidáno 8 μ l benzoasy a vzorky stály na ledu dalších 15 minut. Mikroskopické byly vyváženy a stočeny na maximum. Supernatanty byly následně odpipetovány a spojeny.

3.4.2 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla měřena kitem Coomasie Plus (Bradford) Assay. Nejprve byla připravena koncentrační řada standardů albuminu (BSA) o výsledné koncentraci 0, 2,5, 5, 10, 15, 20 a 25 $\mu\text{g/ml}$. Coomasie Plus Reagencie byla promíchána opakovaným opatrným převrácením a bylo odebráno potřebné množství, které bylo před použitím ekvilibrováno na laboratorní teplotu. Do příslušných jamek 96-jamkové desky byly po 10 μl napipetovány standardy (ve třech opakováních) a vzorky (ve čtyřech opakováních). Koncentrace byla měřena u neředěného, a u 2x, 4x a 8x ředěného supernatantu. Jako blank byl vždy použit příslušně ředěný modifikovaný RIPA pufr také ve čtyřech opakováních. Do všech jamek bylo přidáno 300 μl Coomasie Plus Reagent, obsah jamek byl promíchán na míchačce po dobu 30 sekund a poté inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Po 10 minutách byla měřena absorbance při 595 nm. Od jednotlivých standardů a vzorků byl odečten průměr absorbancí příslušných blanků. Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] byla odečtena z křivky lineární regrese vytvořené ze standardů BSA.

3.4.3 Srážení proteinů

Supernatant byl rozpipetován do mikrozkuvek po 50 μg a byl k němu přidán vychlazený aceton o objemu 4x větším než supernatantův objem. Po důkladném promíchání byly alikvoty inkubovány přes noc v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Další den byly zkuvky stočeny 15 minut při maximálních otáčkách, poté byla odpipetována většina roztoku a zbytek objemu byl opatrně odpařen tak, aby nedošlo k přesušení peletky.

3.4.4 Štěpení proteinů v mikrozkuvce

Peletka byla rozpuštěna ve 20 μl 25 mM TEAB pufru pH 8,0 s příslušným aditivem (tab. 2), inkubována 15 minut na třepačce při laboratorní teplotě za maximálního třepání a poté 5 minut sonikována. Vzorky (kromě vzorků s močovinou) byly stočeny a inkubovány 5 minut při 95°C a následně zchlazeny a stočeny. Močovina nesmí být vystavena teplu, protože by se rozložila za vzniku isokyanátu, který by způsobil karbamylaci proteinů. Poté bylo do mikrozkuvek přidáno 5 μl zásobního roztoku redukčního činidla TCEP (výsledná koncentrace TCEP v roztoku je 5 mM) a vzorky byly inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. Po redukci bylo ke vzorkům přidáno 5 μl 330mM alkylačního činidla

IAM (výsledná koncentrace IAM je 55 mM) a inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Vzorky byly poté naředěny 170 μ l TEAB pufrům (25 mM) a bylo zkontrolováno pH kápnutím 1 μ l vzorku na kalibrovaný pH papírek. Pokud pH nebylo mezi 7,5-8,5, bylo upraveno přidáním 1 μ l koncentrovaného (1M) TEAB pufru. Poté bylo přidáno 0,5 μ l trypsinu (2,5 μ g) a vzorky byly inkubovány 16 hodin při 37°C. Následně byly odebrány 40 μ l alikvoty, které odpovídaly 10 μ g proteinů, a zbytek vzorků byl zamražen. Vzorky 1, 2, 3 a 4 (A, B, C) byly okyseleny 2 μ l koncentrované FA na konečnou koncentraci FA 5 % a poté bylo možné vzorky přímo přechistit přes C18 reverzní fázi. U vzorků 5 (A, B, C) a 6 (A, B, C) musel být nejprve odstraněn DOC.

U vzorků 5 (A, B, C) byl 0,5% DOC obsažený ve vzorcích sražen přidávkem 0,2 μ l koncentrované TFA (konečná koncentrace TFA 0,5 %) a vzorky byly centrifugovány 15 minut při 15700 G (Masuda T., et al., 2008). DOC zůstal ve sraženině, a supernatant byl odpipetován do nové mikrokumavky.

0,5% DOC ve vzorcích 6 (A, B, C) byl odstraněn fázovým transferem (Masuda T., et al., 2008). Ke každému vzorku byl přidán stejný objem ethylacetátu (40 μ l) jako bylo přítomno v mikrokumavce (40 μ l) a vzorky byly dále okyseleny 0,4 μ l koncentrované TFA na její konečnou koncentraci 0,15 %. Následné 1minutové vortexování a 5minutová centrifugace při 14500 G měla za následek rozdělení vzorku na vodnou (dolní) a organickou fázi (horní), přičemž DOC zůstal v organické fázi, která byla opatrně odpipetována a případný zbytek byl (4 minuty) odpařen.

Proteiny	50 µg (Hela lyzát; 3 replikáty)					
Vzorek	1 (A, B, C)	2 (A, B, C)	3 (A, B, C)	4 (A, B, C)	5 (A, B, C)	6 (A, B, C)
Rozpouštění	25 mM Teab pufr pH 8.0	8 M močovina, 25 mM Teab pufr pH 8.0	6 M močovina, 3 M thiomčovina, 25 mM Teab pufr pH 8.0	0.5% (w/v) ProteaseMax, 25 mM Teab pufr pH 8,0	5% (w/v) DOC, 25 mM Teab pufr pH 8.0	5% (w/v) DOC, 25 mM Teab pufr 8.0
Denaturace	95°C, 5 min			95°C, 5 min		
Redukce	5 mM TCEP, 30 min, RT					
Alkylace	55 mM iodoacetamid, 30 min, RT, tma					
Naředění	10 x (25 mM Teab pufr pH 8.0)					
Štěpení	2.5 µg trypsinu (poměr 1:20)					
Štěpení (podmínky)	25 mM Teab pufr pH 8.0	0.8 M močovina, 25 mM Teab pufr pH 8.0	0.6 M močovina, 0,2 M thiomčovina, 25 mM Teab pufr pH 8.0	0.05 % (w/v) ProteaseMax, 25 mM Teab pufr pH 8.0	0.5% (w/v) DOC, 25 mM Teab pufr pH 8.0	0.5% (w/v) DOC, 25 mM Teab pufr pH 8.0

Tab. 2: Postup štěpení proteinů v mikrozkuhavce

3.4.5 Štěpení proteinů na centrifugačním filtru

Peletky byly rozpuštěny ve 30 µl Tris/Cl pufru pH 8,5 (100 mM) s příslušnými aditivy (tab. 3) a inkubovány 15 min za maximálního třepání s následnou 5 minutovou sonikací. Vzorky byly inkubovány 5 minut při 95°C, zchlazeny, stočeny a přepipetovány do centrifugačních filtrů. Následně bylo přidáno 200 µl Tris/Cl pufru pH 8,5 (100 mM) s močovinou (8 M) a příslušným redukčním činidlem, vše bylo promícháno pipetováním a inkubováno 30 min při laboratorní teplotě (u vzorku 3 pouze inkubace). Všechny vzorky byly centrifugovány 15 minut při 14000 G a při laboratorní teplotě.

K všem vzorkům bylo následně přidáno 200 µl Tris/Cl pufru pH 8,5 (100 mM) s příslušnými aditivy (tab. 3 - proplach 1) a obsah byl promíchán pipetováním. Vzorky byly centrifugovány 15 minut při 14000 G a při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 100 µl Tris/Cl pufru pH 8,5 (100 mM) s IAM (50 mM) a příslušnými aditivy a opět

promícháno pipetováním. Vzorky byly poté inkubovány 20 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po těchto 20 minutách inkubace byly vzorky centrifugovány 15 minut při 14000 G, při laboratorní teplotě.

Ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l Tris/Cl pufru pH 8,5 (100 mM) s příslušným aditivem (tab. 3 - proplach 2) a promícháno pipetováním. Následně byly vzorky centrifugovány při laboratorní teplotě a při 14000 G po dobu 15ti minut. Tento proplach 2 byl opakován ještě 2x.

Po posledním proplachu bylo ke vzorkům 1 (A, B, C) a 2 (A, B, C) přidáno 100 μ l NH_4HCO_3 (50 mM), zatímco u vzorků 3 (A, B, C) byl kromě NH_4HCO_3 přidán i 0,5% (w/v) DOC (tab. 3 – proplach 3). Všechny vzorky byly promíchány pipetováním a následně centrifugovány 10 minut při laboratorní teplotě a 14000 G. Tento proplach 3 byl opakován ještě 2x. Po celou dobu práce byl kontrolován objem tekutiny ve sběrné mikrozkušavce, aby se tekutina nedotkla centrifugačního filtru. V případě potřeby byla tekutina vylita.

Po posledním proplachu bylo na centrifugační filtry napipetováno 40 μ l příslušného pufru s trypsinem (2,5 μ g, poměr 1:20, koncentrace 0,0625 μ g/ μ l), promícháno pipetováním a inkubováno 16 hodin při 37°C.

Další den byly centrifugační filtry přemístěny do nových sběrných mikrozkušavek a centrifugovány 10 minut při 14000 G a laboratorní teplotě. Poté bylo na centrifugační filtry vzorků 1 (A, B, C) a 2 (A, B, C) aplikováno 40 μ l NH_4HCO_3 (50 mM). U vzorků 3 (A, B, C) obsahovalo NH_4HCO_3 (50 mM) také 0,5% DOC (w/v). Všechny vzorky byly promíchány pipetováním a centrifugovány 10 minut při 14000 G a laboratorní teplotě. Pipetováním byl změřen objem filtrátu u všech vzorků, který by měl teoreticky být 80 μ l. Byly odebrány alikvoty odpovídající 10 μ g proteinů/peptidů a zbytek vzorků byl zamražen.

Vzorky 1 a 2 (A, B, C) byly okyseleny pomocí 1 μ l koncentrované FA (konečná koncentrace 5 % v/v) a k vzorkům byla přidána FA (5 % v/v) na celkový objem vzorku 50 μ l. Takto připravené vzorky lze přímo přečistit přes C18 reverzní fázi.

U vzorků 3 (A, B, C) byl odstraněn DOC pomocí mezifázového transferu (Masuda T., et al., 2008). K vzorkům bylo přidáno 18 μ l ethylacetátu (poměr vzorek:organická fáze je 1:1) a byly okyseleny 0,16 μ l koncentrované TFA (konečná koncentrace TFA je 0,5 %). Vzorky byly 1 minutu vortexovány a následně 5 minut centrifugovány při 14500 G. Po centrifugaci bylo pozorováno rozdělení vzorku na vodnou a organickou fázi. Organická

fáze byla odpipetována a zbytek byl opatrně odpařen. Objem byl doplněn 5% (v/v) FA na 50 μ l.

Proteiny	50 μ g (Hela lyzát; 3 replikáty)		
Vzorek	1 (A, B, C)	2 (A, B, C)	3 (A, B, C)
Rozpouštění	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 4% (w/v) SDS, 100 mM DTT	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 4% (w/v) SDS, 5 mM TCEP	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 5% (w/v) DOC, 100 mM DTT
Denaturace	95°C, 5 min	95°C, 5 min	95°C, 5 min
Odstranění SDS/Redukce	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 8 M močovina, 100 mM DTT	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 8 M močovina, 5 mM TCEP, 50 mM IAM*	/
Proplach 1	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 8 M močovina	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 8 M močovina, 5 mM TCEP, 50 mM IAM*	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 5% (w/v) DOC
Alkylace	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 8 M močovina, 50 mM IAM	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 8 M močovina, 5 mM TCEP, 50 mM IAM*	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 5% (w/v) DOC, 50 mM IAM
Proplach 2	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 8 M močovina	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 8 M močovina	100 mM Tris/Cl pufr pH 8.5, 5% (w/v) DOC
Proplach 3	50 mM NH ₄ HCO ₃	50 mM NH ₄ HCO ₃	50 mM NH ₄ HCO ₃ , 0.5% (w/v) DOC
Štěpení	Trypsin o konc. 0.0625 μ g/ μ l, 50 mM NH ₄ HCO ₃ (poměr 1:20; 2.5 μ g celkově)	Trypsin o konc. 0.0625 μ g/ μ l, 50 mM NH ₄ HCO ₃ (poměr 1:20; 2.5 μ g celkově)	Trypsin o konc. 0.0625 μ g/ μ l, 50 mM NH ₄ HCO ₃ , 0.5% (w/v) DOC (poměr 1:20; 2.5 μ g celkově)

*jedná se o odstranění SDS, s redukcí i alkylací v jednom kroku

Tab. 3: Postup štěpení proteinů na centrifugačním filtru

3.4.6 Přečištění peptidů přes C18 reverzní fázi

Přečištění peptidů bylo provedeno přes ručně dělané špičky (Rappsilber J., et al., 2007). Každá špička obsahovala 2 disky C18 reverzní fáze a byla upevněna do víčka sběrné mikrozkušavky. C18 materiál byl aktivován aplikováním 50 μ l isopropanolu a následnou centrifugací 2,5 minuty při 4000 G. Tento postup byl opakován ještě jednou a bylo zkontrolováno, zda všechny špičky správně protékají. Pro ekvilibraci C18 disků bylo do špiček napipetováno 50 μ l 5% FA a mikrozkušavky se špičkami byly centrifugovány 2,5 minuty při 4000 G. Poté co byly tyto špičky přesunuty do nových popsaných mikrozkušavek, byly do nich přepipetovány vzorky, a byly centrifugovány 10 minut při 900 G (v případě neprotečení celého objemu špičkou, byly tyto vzorky centrifugovány ještě 2 minuty při 2000 G). Poté byla C18 2x promyta 50 μ l 5% FA a vždy centrifugována 3 minuty při 2000 G. Po druhém promytí byly špičky přendány do nových popsaných mikrozkušavek a peptidy byly eluovány přidáním 50 μ l 50% MeOH, 2,5% FA a následnou centrifugací při 900 G po dobu 10 minut (v případě neprotečení celého objemu špičkou, byly tyto vzorky centrifugovány ještě 2 minuty při 2000 G). Eluát byl opatrně přepipetován do skleněných vialek a odpařen ve vakuové odparce.

3.4.7 Analýza vzorků na nano LS-ESI-MS a MS/MS

Vzorky byly měřeny pomocí systému nanokapilární chromatografie (nLC) (nanoEASY, Proxeon, Nizozemí, Bruker Daltonics, Německo) s tandemovou hmotnostní detekcí Q-TOF vybavenou nano ESI ionizací (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo). Připravené vzorky byly rozpuštěny v 60 μ l 5% FA a ultrazvukovány (5 min) a vloženy do autosampleru. Byl proveden nástřik 7 μ l vzorku (obsahující cca 400 ng peptidů) a obsažené peptidy byly zachyceny na předkoloně (75 μ m \times 3 cm, IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) a izokraticky promyty pomocí 10 μ l 2% FA. Uvolnění a dělení zachycených peptidů bylo provedeno pomocí gradientové eluce (tab. 4) na analytické nanokapilární koloně (50 μ m \times 20 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněnou reverzní fází (Reprosil GOLD C18, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) při průtoku 120 nl·min⁻¹. Složení mobilních fází bylo následující: pufr A: 0,4% FA ve vodě, pufr B: 0,4% FA v 80% acetonitrilu.

Čas (min)	%A	%B
0	90	10
38	85	15
58	76	24
68	72	28
74	55	45
76	5	95
81	5	95
84	95	5
97	95	5

Tab. 4: Nastavení nLC 100 minutového gradientu pro eluci peptidů z reverzní nanokapilární kolony. Flow rate: 120 nL/min. Inj.: 2 µl

Rozdělené peptidy eluované z analytické kolony byly ionizovány pomocí elektropray ionizace a detekovány metodou tandemové hmotnostní analýzy „data-dependent analysis (DDA) s kolizí indukovanou fragmentací peptidů v kolizní cele. Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: Zdroj (Source; capillary voltage 1700 V; Dry gas: 2,5 l·min⁻¹; Dry temperature: 100 °C); Tune Page nastavení (Iont funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole iont energy 5 eV; collision energy 8 eV; Collision RF 1200 Vpp; Iont cooler RF 350 Vpp; transfer time 85 µs; pre-puls storage 12 µs); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; 4 precursor ions; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 7000 cts; active exclusion po 4 spektrech po dobu následujících 18 s; excluded mass rozsah prekurzorů 50-350 Da and 1500-2200 Da). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 50-2200 m/z s dobou sběru (acquisition time) 300 ms pro MS a 200-400 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekurzoru.

3.4.8 Bioinformatická analýza získaných výsledků

Naměřená surová data byla zpracována programem DataAnalysis v. 4.2 (Bruker Daltonics, Německo), fragmentační spektra a měrné hmotnosti prekurzorů byly uloženy ve formátu xml a mgf. Tyto soubory byly importovány do programu ProteinScape v2.4 a využity k identifikaci peptidů a proteinů pomocí databázového prohledávání pomocí Mascot algoritmu (in-house mascot server, Matrix Science, England, UK) proti databázi UniProt human ver. 20140416 (88708 sekvencí, UniProtKB; www.UniProt.org). Následující nastavení bylo použito při identifikaci: štěpící proteáza: trypsin; maximální povolený počet vynechaných štěpných míst (missed cleavage) 2; povolené modifikace peptidů:

karbamidomethylace cysteinů jako pevná (fixed), acetylace N-konců proteinů, oxidace methioninu deamidace glutaminu a asparaginu byly nastaveny jako variabilní; povolené odchylky pro MS prekurzorů: 100 ppm a pro MS/MS fragmentace peptidů 0,1 Da; minimální skóre pro identifikaci peptidů 10, pro identifikaci proteinu minimální skóre 1 peptidu 30; minimální skóre pro identifikaci proteinů 30. Výsledky prohledávání a identifikace peptidů byly exportovány do formátu XLS a vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Excel, Protein Cutter (<http://bit.ly/1Fl6v85>) a Statistika 12 (StatSoft).

4 Výsledky a diskuse

Jak již bylo zmíněno v podkapitole 2.3.7. Štěpení proteinů, štěpení proteinů v roztoku s sebou nese výhody oproti štěpení v gelu, jako jsou menší ztráty vzorku a také nižší pravděpodobnost kontaminace vzorku. Cílem práce proto bylo srovnat relativně „mladé“ metody štěpení v roztoku, a to na centrifugačním filtru a v mikrozkuhavce. Pro každou metodu štěpení bylo vyzkoušeno několik variant lišících se přidáním aditiv či metodou jejich odstranění. Pro srovnání byla vybrána aditiva, která autoři vědeckých článků považují za dobrá – např. DOC, jehož výhodou je relativně jednoduché odstranění (León I. R., et al, 2013), SDS jako detergent schopný kompletního rozpuštění proteinů (León I. R., et al, 2013), močovina usnadňující rozpouštění hydrofobních proteinů (Bennion B. J., 2003), MS-kompatibilní detergenty (Chen E. I., et al, 2007) a další.

První kroky experimentu – od extrakce až po precipitaci proteinů acetonem proběhly pro všechny varianty štěpení totožně a u všech variant se vycházelo ze stejného množství proteinů. Vzorky byly analyzovány pomocí nano LC-ESI-MS/MS a získaná data byla zpracována programem Microsoft Excel, Protein Cutter (<http://bit.ly/1F16v85>) a Statistika 12 (StatSoft). Každá varianta experimentu proběhla v triplicátu, a proto je většina výsledků vyjádřena jako jejich průměr se směrodatnými odchylkami. Pro získání informace o celkovém počtu identifikací proteinů/peptidů v každé variantě byly počty proteinů/peptidů jednotlivých triplicátů dané varianty sloučeny. Pro hodnocení vlastností peptidů, konkrétně délky, GRAVY (*The Grand Average of Hydrophobicity*) hodnoty a izoelektrických bodů, byly použity grafy procentuálního zastoupení peptidů v jednotlivých intervalech hodnot. Tyto grafy zobrazují průměrné hodnoty ze tří replikátů s jejich směrodatnými odchylkami. Dále byly tyto vlastnosti prezentovány pomocí krabicových grafů, které zobrazují sjednocené množiny peptidů příslušných tří replikátů. Pro hodnocení reprodukovatelnosti byly v rámci každé varianty porovnány triplicáty mezi sebou a reprodukovatelnost varianty byla vyjádřena jako procentuální zastoupení společných proteinů/peptidů. Hodnocení opakovatelnosti proběhlo stejným způsobem, avšak porovnány byly dva nástřiky daného triplicátu. Důležitá data, včetně grafů vlastností peptidů znázorňující počty identifikací, jsou uložena na přiloženém kompaktním disku.

4.1 Štěpení proteinů na centrifugačním filtru

Pro metodu FASP byly vybrány 3 varianty rozpouštění. První dvě varianty byly založeny na použití SDS a lišily se pouze v použitém redukčním činidle - rozpouštění proteinů u první metody proběhlo za přítomnosti DTT, zatímco u metody druhé bylo DTT nahrazeno za TCEP. Výhodou TCEP oproti DTT je, že je stabilní při větším rozmezí pH, efektivněji redukuje proteiny a nereaguje s IAM. Díky tomu mohlo v metodě s TCEP proběhnout odstranění SDS, redukce a alkylace v jednom kroku. SDS bylo odstraněno pomocí močoviny, která je za SDS na centrifugačním filtru vyměněna. Močovina je podle skupiny autorů Wiśniewski J. R., et al. nejlepší látkou pro tento účel a navíc pomáhá rozpouštění membránových proteinů, udrží proteiny denaturované a může být ve vzorku přítomna i při štěpení (Wiśniewski J. R., et al., 2009a; Wiśniewski J. R., et al., 2011; León I. R., et al., 2013).

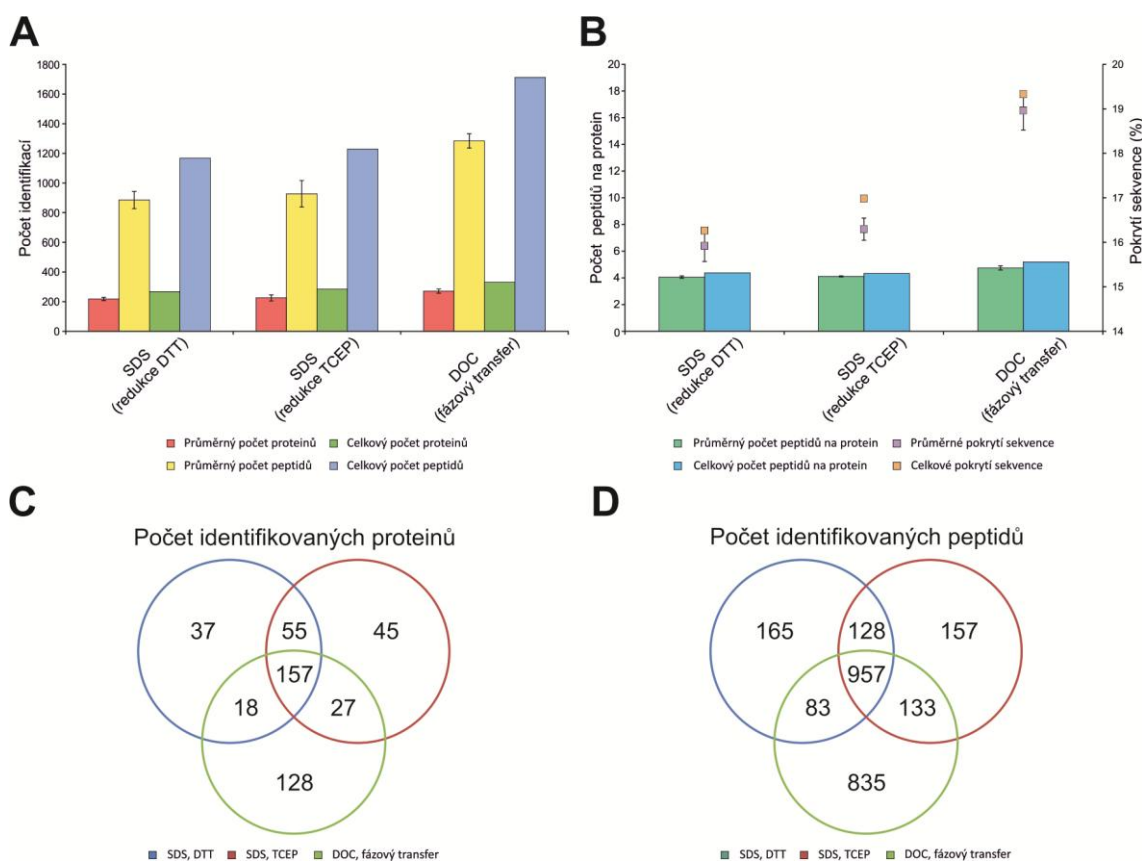
Ve třetí variantě byl použit DOC místo SDS, protože v publikované literatuře bylo prokázáno zlepšení efektivity štěpení a pokrytí sekvence už při koncentraci 0,1% (w/v) DOC (Zhou J., et al., 2006). DOC je ale také nutné, stejně jako SDS, před MS analýzou odstranit, a to okyselením nebo fázovým transferem, který byl proveden v této variantě (Masuda T., et al., 2008; Erde J, et al., 2014).

4.1.1 Počty identifikací a pokrytí sekvence

Největší celkový počet proteinů i peptidů byl identifikován ve variantě, ve které byl pro rozpouštění proteinů použit DOC a následně byl odstraněn fázovým transferem. U této varianty bylo identifikováno přibližně o 50 proteinů a 300 peptidů (celkových i průměrných) více než v metodách, u nichž byl použit SDS s DTT či TCEP (graf 1A). Obě varianty obsahující SDS pak dosáhly srovnatelných výsledků. Tyto výsledky se shodují s výsledky autorů Zhou J., et al., které ukazují, že při použití DOC místo SDS při přípravě vzorku je identifikováno výrazně více peptidů a hydrofobních membránových proteinů (Zhou J., et al., 2006).

Ve variantě DOC/fázový transfer bylo identifikováno průměrně 5 peptidů na protein, zatímco varianty s SDS byly naprosto srovnatelné a na peptid zde připadly 4 peptidy (graf 1B). U varianty, ve které bylo identifikováno více peptidů na protein, se dá očekávat vyšší pokrytí sekvence. Tento předpoklad byl našimi výsledky potvrzen, jelikož pokrytí sekvence u varianty s DOC bylo přibližně o 3 % vyšší než u variant s SDS (graf

1B). Dalším možným důvodem vyššího pokrytí sekvence by mohlo být i vyšší procentuální zastoupení delších peptidů (viz. níže).



Graf 1: Počty identifikací a pokrytí sekvence daných variant metody FASP

A: Průměrné a celkové počty identifikovaných proteinů a peptidů; B: Průměrný a celkový počet identifikovaných peptidů na protein a pokrytí sekvence; C: Počty proteinů v jednotlivých variantách; D: Počty peptidů v jednotlivých variantách; U průměrných hodnot jsou znázorněny směrodatné odchylky pomocí chybových úseček.

Počty proteinů a peptidů v jednotlivých metodách jsou znázorněny ve Vénových diagramech (graf 1C, 1D). Z celkového počtu identifikací proteinů z variant s SDS, DTT a SDS, TCEP bylo 63 % proteinů společných pro obě metody. Na druhé straně, varianta DOC/fázový transfer měla s variantou SDS, DTT společných pouze 41 % proteinů a s SDS, TCEP 43% proteinů. Na peptidové úrovni byly výsledky podobné. Z toho vyplývá, že varianty s SDS si byly podobné, což je logické, protože se lišily pouze redukčním činidlem. Ve třetí variantě bylo použito jiné rozpouštědlo (DOC), které pomohlo rozpustit rozdílné proteiny, a proto jsou překryvy s ostatními variantami menší. Největší počet unikátních proteinů a peptidů byl ve variantě DOC/fázový transfer. V této variantě bylo

identifikováno přibližně o 80 unikátních proteinů a o 670 unikátních peptidů více než ve variantách s SDS.

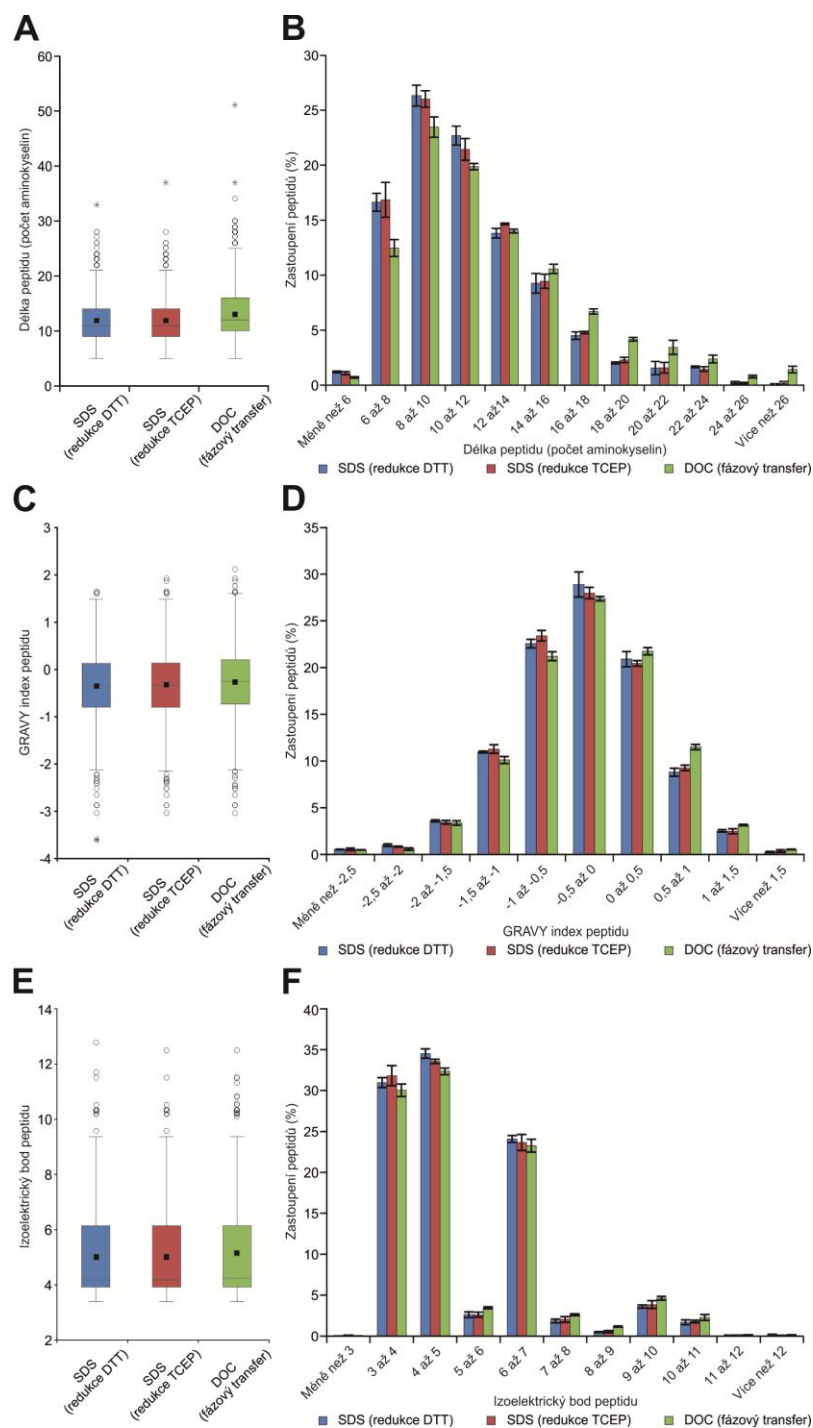
4.1.2 Vlastnosti peptidů

Dalšími porovnávanými charakteristikami získaných peptidů byla jejich délka, GRAVY hodnota a izoelektrické body, což jsou nejdůležitější vlastnosti peptidů.

Z grafů 2A a 2B je evidentní, že z hlediska délky peptidů byly obě varianty s SDS srovnatelné, protože procentuální zastoupení ve všech rozmezích bylo podobné. Ve variantách SDS bylo mírně vyšší procentuální zastoupení kratších peptidů. Naproti tomu varianta DOC/fázový transfer produkovala více delších peptidů (14 a více aminokyselin).

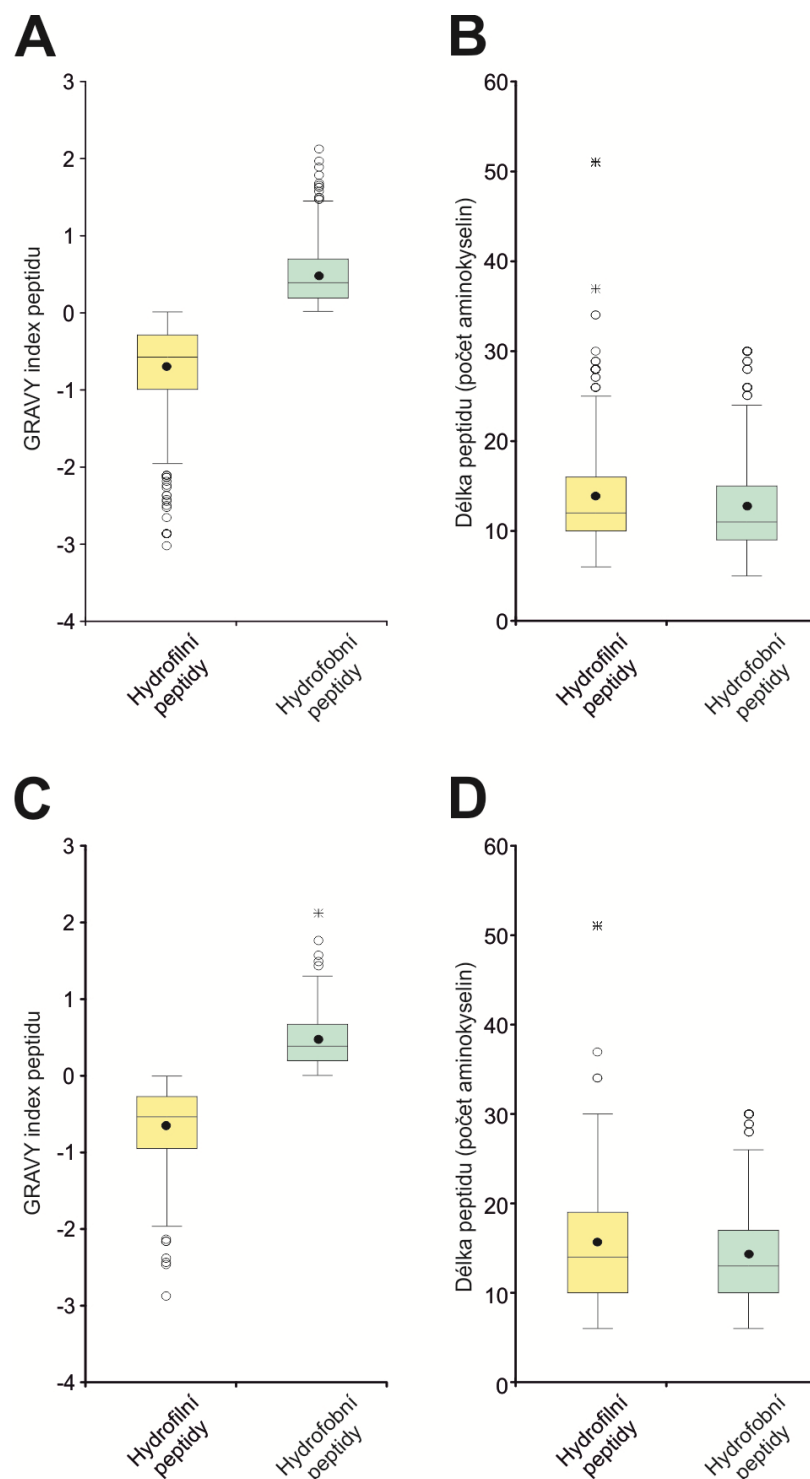
Hodnoty GRAVY určují hydrofobicitu/hydrofilitu peptidu. V případě, že je hodnota nižší než 0, tak se jedná o hydrofilní peptid. V opačném případě, pokud je hodnota GRAVY vyšší než 0, tak je peptid hydrofobní. Ve variantách s SDS bylo identifikováno vyšší procentuální zastoupení hydrofilních peptidů, zatímco ve variantě s DOC více hydrofobních peptidů (graf 2C, 2D). Hydrofobicita peptidu může souviset s jeho délkou – čím je peptid delší, tím je větší pravděpodobnost, že bude obsahovat více hydrofobních aminokyselin a tím bude peptid hydrofobnější. Tento trend nebyl pozorován v našich výsledcích, protože po srovnání množin hydrofobních a hydrofilních peptidů varianty bylo zjištěno, že peptidy obou skupin jsou přibližně stejných délek (graf 3A, 3B). Stejný trend byl pozorován také u unikátních peptidů (graf 3C, 3D).

Hodnoty izoelektrických bodů identifikovaných peptidů ve velké míře závisí na způsobu štěpení konkrétního enzymu. Trend pozorovaný v grafech 2E, 2F je typický pro štěpení trypsinem. Nejvyšší procento identifikací bylo v izoelektrických bodech 3-5 a 6-7 u všech tří variant experimentu.



Graf 2: Hodnocení vlastností peptidů daných variant metody FASP

A: Rozložení délek všech peptidů; B: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích délek peptidů (počtů aminokyselin); C: Rozložení GRAVY hodnot všech peptidů; D: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích hodnot GRAVY. Hydrofilní peptidy mají GRAVY hodnoty od $-x$ do 0, hydrofobní peptidy od 0 do $+x$; E: Rozložení izoelektrických bodů (pI) všech peptidů; F: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích pI; Směrodatné odchylky (B, D, F) jsou znázorněny chybovými úsečkami. Černé kroužky u krabicových grafů (A, C, E) znázorňují odlehle hodnoty, černé hvězdičky extrémně odlehle hodnoty, černý bod průměr, "krabicová" část diagramu je shora ohraničena 3. kvantilem, zespodu 1. kvantilem a mezi nimi je linie vymezující medián. Horizontální úsečka vyjadřuje variabilitu dat.



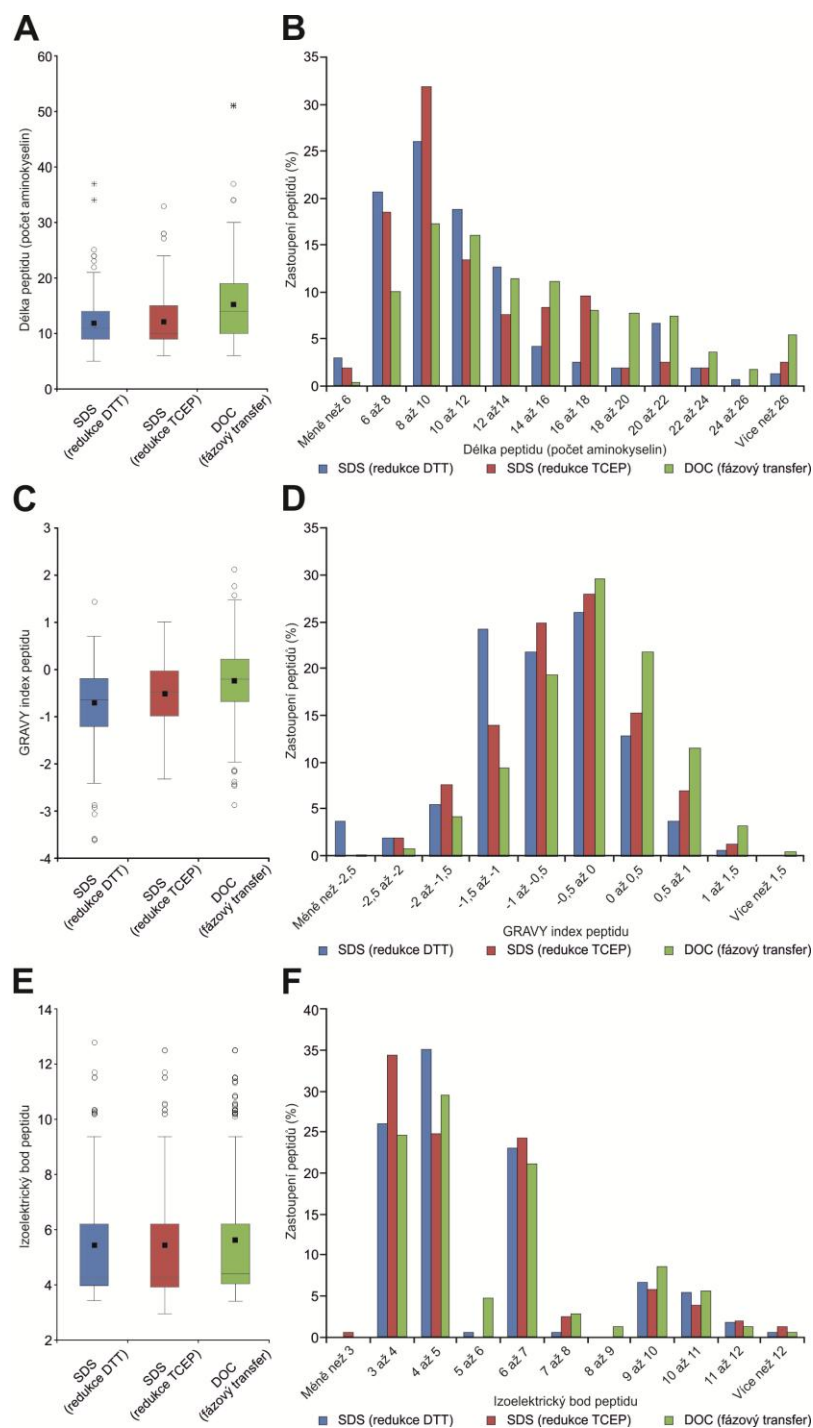
Graf 3: Hodnocení GRAVY hodnot a délek hydrofilních a hydrofobních peptidů varianty DOC/fázový transfer.

A: Rozložení GRAVY hodnot u hydrofilních a hydrofobních peptidů; B: Rozložení délek u hydrofilních a hydrofobních peptidů; C: Rozložení GRAVY hodnot hydrofilních a hydrofobních všech unikátních peptidů; D: Rozložení délek hydrofilních a hydrofobních všech unikátních peptidů; Černé kroužky znazornují odlehlé hodnoty, černé hvězdičky extrémně odlehlé hodnoty, černý bod průměr, "krabicová" část diagramu je shora ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem a mezi nimi je linie vymezující medián. Horizontální úsečka vyjadřuje variabilitu dat.

4.1.3 Vlastnosti unikátních peptidů

V předchozí kapitole bylo na globální úrovni pozorováno, že varianta DOC/fázový transfer produkovala vyšší procentuální zastoupení dlouhých a hydrofobních peptidů. Jelikož jsme chtěli zjistit, zda měly peptidy unikátní pro jednotlivé varianty stejný trend, tak byly jejich vlastnosti také srovnány.

Trendy vlastnosti peptidů unikátních pro jednotlivé varianty (graf 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F) kopírovaly trendy vlastností peptidů jednotlivých variant (graf 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F). Opět bylo vyšší procento kratších a hydrofilnějších peptidů pozorováno ve variantách s SDS, zatímco vyšší procento delších a hydrofobnějších peptidů produkovala varianta DOC/fázový transfer. Nejvyšší procentuální zastoupení izoelektrických bodů unikátních peptidů bylo opět v rozmezích 3-5 a 6-7. Celkově se dá říct, že trendy unikátních peptidů však byly mnohem výraznější.



Graf 4: Hodnocení vlastností unikátních peptidů daných variant metody FASP

A: Rozložení délek unik. peptidů; B: Procentuální zastoupení unik. peptidů v jednotlivých rozmezích délek peptidů (počtu aminokyselin); C: Rozložení GRAVY hodnot unik. peptidů; D: Procentuální zastoupení unik. peptidů v jednotlivých rozmezích hodnot GRAVY. Hydrofilní peptidy mají GRAVY hodnoty od $-x$ do 0, hydrofobní peptidy od 0 do $+x$; E: Rozložení izoelektrických bodů (pI) unik. peptidů; F: Procentuální zastoupení unik. peptidů v jednotlivých rozmezích pI; Černé kroužky u krabicových grafů (A, C, E) znazornují odlehle hodnoty, černé hvězdičky extrémy, černý bod průměr, "krabicová" část diagramu je shora ohraničena 3. kvartilem, zespu 1. kvartilem a mezi nimi je linie vymezující medián. Horizontální úsečka vyjadřuje variabilitu dat.

4.1.4 Karbamidomethylace cysteinů

Jak již bylo komentováno výše, varianty FASP za použití SDS byly provedeny se dvěma různými redukčními činidly. Jedním z nich bylo TCEP, které nereaguje s IAM, a díky tomu by mělo být možné provedení redukce a alkylace v jednom kroku. Proto jsme chtěli zjistit, nemá-li provedení redukce a alkylace v jednom kroku vliv na efektivitu karbamidomethylace cysteinů. Účinnost karbamidomethylace cysteinů byla srovnána pouze u těchto dvou variant, protože třetí varianta obsahovala rozdílné rozpouštědlo (DOC), což by mohlo ovlivnit výsledky.

Jak je vidět z tabulky 5, celkové počty karbamidomethylovaných peptidů a peptidů obsahujících cystein byly u obou variant podobné. Celková účinnost varianty s DTT byla 98 % a ve variantě s TCEP 97 %. Tyto výsledky dokazují, že při použití TCEP je možná redukce a alkylace v jednom kroku se stejnou efektivitou jako ve variantě SDS, DTT (redukce a alkylace odděleně).

	SDS, DTT	SDS, TCEP
Celkový počet peptidů	1170	1243
Celkový počet karbamidomethylovaných peptidů	122	124
Celkový počet peptidů obsahujících cystein	124	128
Účinnost karbamidomethylace [%]	98	97

Tab. 5: Porovnání účinnosti karbamidomethylace cysteinů

4.1.5 Opakovatelnost a reprodukovatelnost

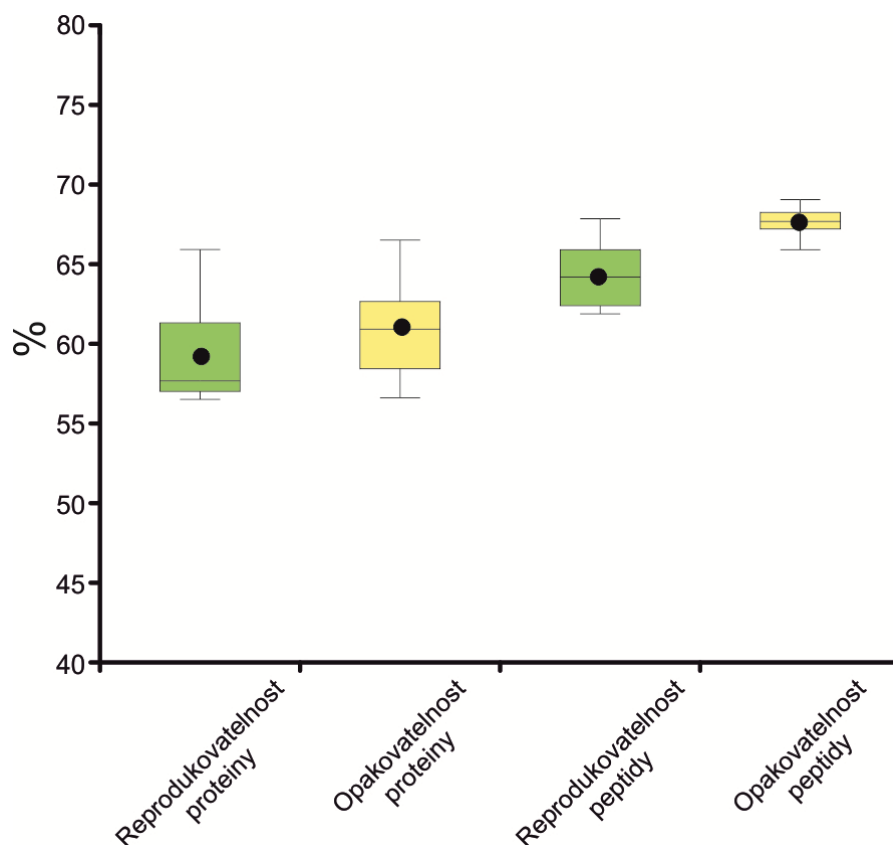
Z hlediska kontroly robustnosti testovaných variant FASP byla hodnocena reprodukovatelnost a opakovatelnost.

Reprodukovatelnost metody může být popsána jako rozdílnost ve výsledcích např. při analýze téhož vzorku na jiných přístrojích, při analýze téhož vzorku jiným pracovníkem, apod (Tabb D.L., et al., 2010). V našem případě šlo o práci se třemi nezávislými replikáty štěpení pro každou variantu, přičemž všechny ostatní proměnné zůstaly stejné. Pro všechny použité varianty štěpení proteinů na centrifugačním filtru byla

hodnocena reprodukovatelnost na úrovni proteinů i peptidů. Tyto reprodukovatelnosti byly srovnatelné (příloha tab. 1, 2, 3, 4), a proto je zde prezentována pouze celková reprodukovatelnost metody, která byla v průměru 59 % na úrovni proteinů a 64 % na úrovni peptidů (graf 5).

Opakovatelnost metody představuje rozdílnost ve výsledcích v opakované analýze stejným pracovníkem, na stejném vzorku a za použití stejných přístrojů (Bland J. M., et al., 1986). V našem případě byl vzorek měřen dvakrát, tzn. dvěma nástřiky stejného vzorku do přístroje. Opakovatelnost jednotlivých variant FASP byla na proteinové i peptidové úrovni srovnatelná. Celková opakovatelnost metody činila průměrně 61 % na úrovni proteinů a 67 % na úrovni peptidů (graf 5). Tyto výsledky jsou velice dobré, jelikož opakovatelnost na úrovni peptidů jen zřídka dosahuje 60 % (Tabb D.L., et al., 2010). Důvodem je použití DDA analýzy (*Data Dependent Acquisition*) (Wu C. C., et al, 2002), při které jsou vybrány pouze nejzastoupenější peptidové ionty ze vzorku, a ty jsou poté podrobeny MS/MS. Kolik přesně jich je vybráno pak záleží na výkonnosti stroje, tzn. kolik jich je schopen podrobit MS/MS za určitý čas. Výběr nejintenzivnější iontů silně závisí na prostředí a je to tedy do určité míry náhodný proces (Neilson K. A., et al, 2011).

Při srovnání opakovatelnosti a reprodukovatelnosti metody na úrovni proteinů i peptidů, celková reprodukovatelnost v obou případech téměř dosahovala opakovatelnosti, což ukazuje na práci s vysokou efektivností a přesností.



Graf 5: Reprodukovatelnost a opakovatelnost metody FASP

Krabicové grafy znázorňují celkovou opakovatelnost a reprodukovatelnost na úrovni proteinů a peptidů – metoda štěpení proteinů FASP. Střední “krabicová” část diagramu je shora ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem a mezi nimi se nachází linie vymezující medián. Úsečka vycházející ze střední části diagramu kolmo nahoru a dolů vyjadřující variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem (horní – maximum, dolní – minimum). Černý bod znázorňuje průměr.

4.2 Štěpení proteinů v mikrozkuhavce

Pro metodu štěpení proteinů v mikrozkuhavce bylo vyzkoušeno 6 variant lišících se přidáním aditiv či metodou jejich odstranění. V prvním případě nebylo k extrakčnímu pufru (25 mM TEAB pufr, pH 8) přidáno žádné aditivum a bylo předpokládáno, že se bude jednat o negativní kontrolu. Ve druhé variantě byla k extrakčnímu pufru přidána močovina, což je velice často používané chaotropní činidlo (jak již bylo komentováno na několika místech výše). Ve třetí metodě byla k extrakčnímu pufru přidána kromě močoviny také thiomočovina, která usnadňuje rozpouštění hydrofobních proteinů. Ve čtvrté variantě byl použit komerční detergent ProteaseMax, který se rozkládá s teplotou a okyselením, tudíž nemusí být před MS analýzou odstraněn (Saveliev S., et al., 2008). V posledních dvou variantách byl použit DOC, což je detergent, který zlepšuje rozpouštění hydrofobních

proteinů. V jedné z variant byl odstraněn okyselením s následnou centrifugací a ve druhé fázovým transferem (Masuda T., et al., 2008).

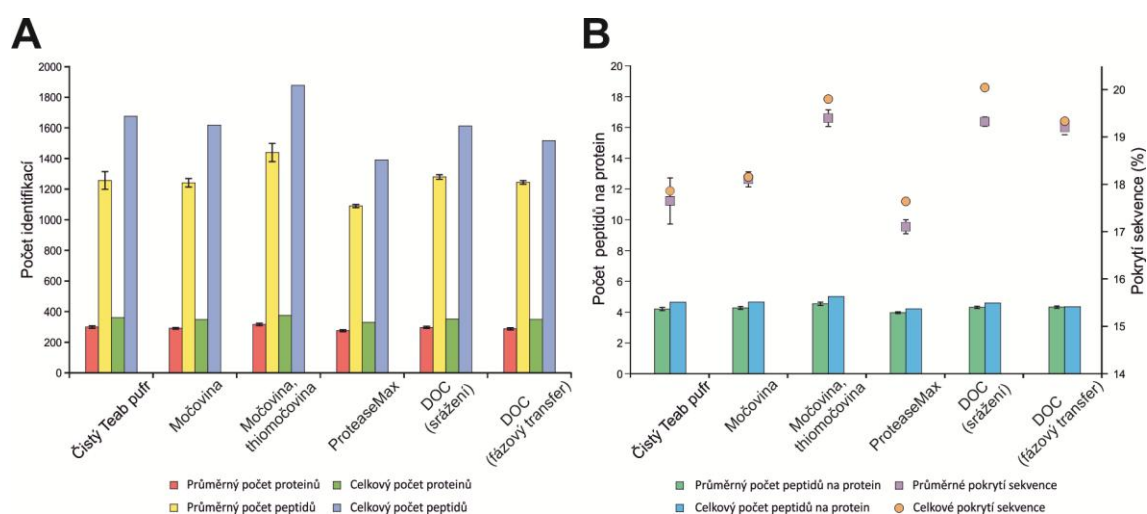
4.2.1 Počty identifikací a pokrytí sekvence

Nejvyšší počet identifikací byl zjištěn u varianty s močovinou a thiomčovinou s celkovým počtem 375 proteinů a 1878 peptidů (graf 6A). Nejnižší počty identifikací proteinů i peptidů byly pozorovány ve variantě s komerčním detergentem ProteaseMaxem, ve které bylo celkově identifikováno o 45 proteinů a 486 peptidů méně než ve variantě s močovinou a thiomčovinou. Naše výsledky se v tomto ohledu neshodují s výsledky autorů Chen E. I., et al., ze kterých vyplývá, že modifikací protokolů přidáním detergentů kompatibilních s MS jsou výrazně zvyšovány počty identifikovaných proteinů a peptidů (Chen E. I., et al., 2007). Důvodem by mohlo být špatné rozpuštění proteinů, přítomnost ProteaseMax při štěpení, nebo jeho přítomnost při MS analýze. Jelikož byly proteiny patrně dobře rozpuštěny i ve variantě bez jakéhokoli detergentu (graf 6A), tak by měla varianta rozpouštění s ProteaseMax rozpustit přinejmenším stejný počet proteinů. Přítomnost ProteaseMax pak nebyla na hmotnostním spektru prokázána. Z toho vyplývá, že důvodem nízkých počtů identifikací pravděpodobně tedy byla jeho přítomnost při štěpení, jelikož nemusel být v průběhu štěpení úplně rozložen teplem a tím pádem mohl negativně ovlivnit aktivitu trypsinu. Překvapivé výsledky byly pozorovány ve variantě bez jakéhokoli přidaného aditiva, jelikož se lišila pouze o 14 proteinů a 201 peptidů od metody s nejvyšším počtem identifikací. Tento jev mohl být způsoben tím, že sražení acetonem dostatečně zdenaturovalo proteiny, které zůstaly zdenaturované i po rozpuštění, což následně umožnilo jejich dobré naštěpení.

Nejvyšší pokrytí sekvence bylo pozorováno ve variantě obsahující močovinu a thiomčovinu a u obou variant s DOC, které bylo okolo 19 % (graf 6B). Nejhorší pokrytí sekvence, které činilo okolo 17 %, bylo zjištěno u varianty s ProteaseMax. Nižší pokrytí sekvence mohlo být způsobeno nižším počtem peptidů na protein a také tím, že tato varianta produkovala spíše krátké peptidy (viz. níže).

Dále nás zajímaly počty proteinů a peptidů unikátních pro jednotlivé varianty a překryvy mezi variantami. Nejvíce identifikovaných unikátních proteinů i peptidů bylo ve variantě s močovinou a thiomčovinou, kde bylo získáno průměrně o 30 proteinů a 200 peptidů více než u ostatních variant (tab 6). Tento výsledek byl očekávatelný, jelikož tato varianta produkovala celkově nejvíce proteinů a peptidů. Počty proteinů a peptidů

jednotlivých variant jsou vyjádřeny v tabulce (ne Vénovy diagramy jako u metody FASP) kvůli velkému množství kombinací. Při srovnání proteinových identifikací z obou variant s DOC bylo celkem 62 % proteinů společných pro obě varianty. Takto velký překryv ukazuje na podobnost variant, která byla dána použitím stejného aditiva. Na druhé straně, mnohem menší překryv byl pozorován u variant s ProteaseMax a močovinou a thiomčovinou. Tyto varianty měly společných pouze 50 % proteinů. Na peptidové úrovni byly výsledky podobné.



Graf 6: Počty identifikací a pokrytí sekvence daných variant metody štěpení v mikrozkumavce.

A: Průměrné a celkové počty identifikovaných proteinů a peptidů; B: Průměrný a celkový počet identifikovaných peptidů na protein a pokrytí sekvence; U průměrných hodnot jsou znázorněny směrodatné odchylky pomocí chybových úseček.

Metoda	Počet proteinů	Počet peptidů	Metoda	Počet proteinů	Počet peptidů	Metoda	Počet proteinů	Počet peptidů
1	32	282	2+3+5	2	7	1+2+4+6	4	3
2	34	240	1+2+3+5	2	5	3+4+6	1	11
1+2	20	171	4+5	3	9	1+3+4+6	2	11
3	72	481	1+4+5	2	8	2+3+4+6	3	4
3+1	3	44	2+4+5	0	3	1+2+3+4+6	14	28
3+2	9	85	1+2+4+5	2	9	5+6	21	137
1+2+3	8	132	3+4+5	3	10	1+5+6	2	10
4	24	107	1+3+4+5	3	9	2+5+6	8	14
1+4	12	38	2+3+4+5	0	3	1+2+5+6	2	9
2+4	2	4	1+2+3+4+5	8	27	3+5+6	9	56
1+2+4	5	12	6	31	99	1+3+5+6	1	8
3+4	6	28	1+6	3	6	2+3+5+6	2	55
1+3+4	8	20	2+6	1	7	1+2+3+5+6	16	45
2+3+4	1	3	1+2+6	6	6	4+5+6	4	16
1+2+3+4	12	25	3+6	5	14	1+4+5+6	3	26
5	38	182	1+3+6	1	5	2+4+5+6	4	5
1+5	6	19	2+3+6	1	9	1+2+4+5+6	21	40
2+5	4	2	1+2+3+6	1	5	3+4+5+6	12	39
1+2+5	3	1	4+6	4	8	1+3+4+5+6	11	26
3+5	6	24	1+4+6	3	9	2+3+4+5+6	8	31
1+3+5	1	4	2+4+6	1	4	1+2+3+4+5+6	144	937

Tab. 6: Tabulka znázorňující počty unikátních proteinů a peptidů v jednotlivých variantách a společné proteiny a peptidy v různých kombinacích. 1 – čistý TEAB pufr, 2 – močovina, 3 – močovina a thiomčovina, 4 – ProteaseMax, 5 – DOC/srážení, 6 – DOC/fázový transfer.

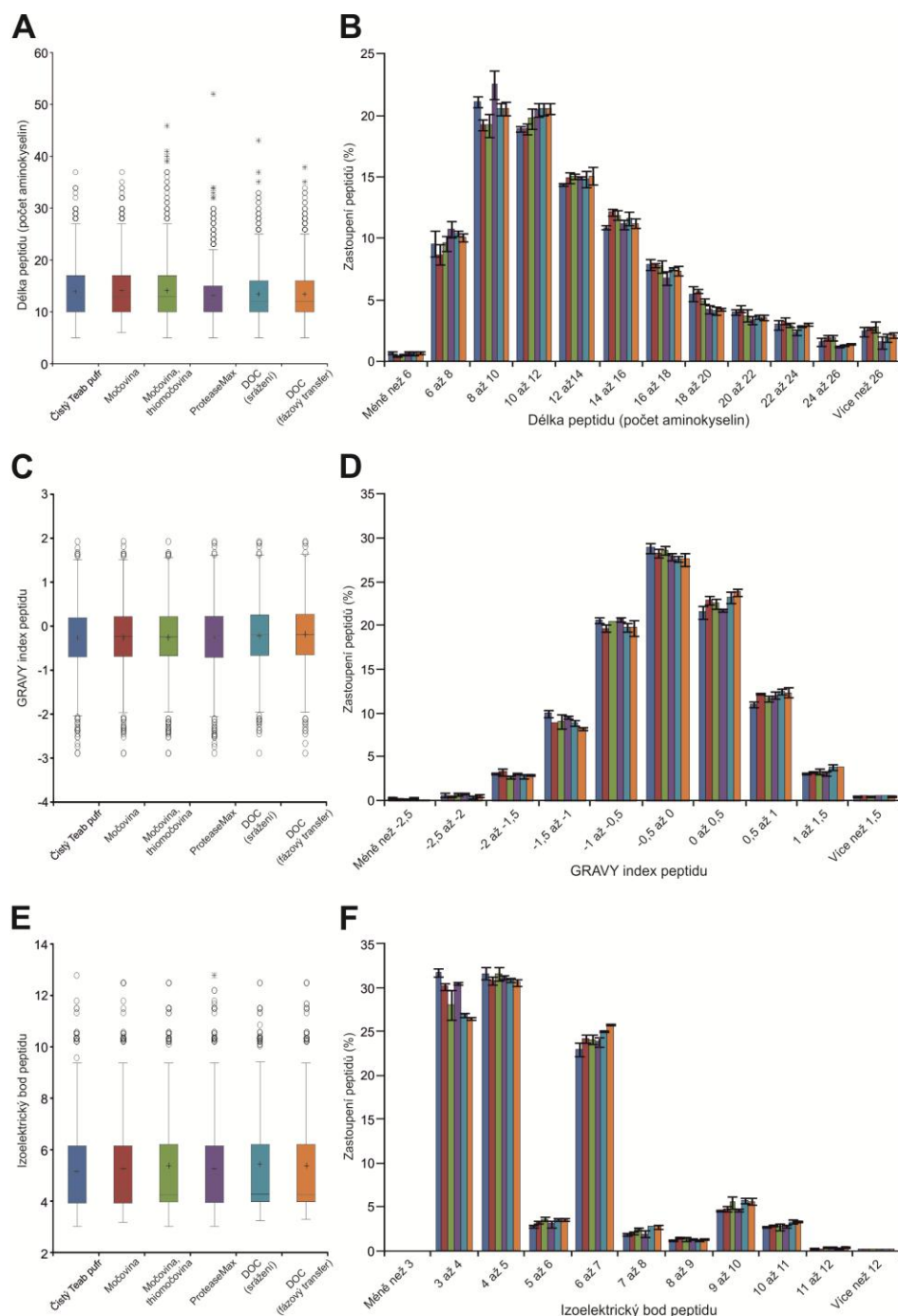
4.2.2 Vlastnosti peptidů

Stejně jako u FASP byla porovnávána délka, GRAVY hodnota a izoelektrické body získaných peptidů.

Ve variantě s močovinou a thiomčovinou, ve které bylo identifikováno největší množství proteinů i peptidů, bylo zjištěno nejvyšší procento peptidů v délkách 8-14 aminokyselin (graf 7A, 7B). Stejně tomu bylo i u všech ostatních variant. Důvodem je, že trypsin použitý pro štěpení proteinů produkuje peptidy dlouhé průměrně 9-11 aminokyselin. Varianta s močovinou a thiomčovinou, spolu s variantami obsahující DOC, produkovaly vyšší procento peptidů dlouhých 22 a více aminokyselin než ostatní varianty (graf 7A, 7B). Ke stejným výsledkům dospěli autoři León I. R., et al., podle jejichž studie produkovala varianta s močovinou a s DOC spíše dlouhé peptidy (León I. R., et al, 2013).

Nejvyšší procento hydrofobních peptidů bylo identifikováno u varianty s močovinou a thiomočovinou a u obou variant s DOC (graf 7C, 7D), což je podobným výsledkem jako v metodě FASP, ve které měla varianta s DOC také nejvyšší procento hydrofobních peptidů. Varianta s komerčním rozpouštědlem ProteaseMax, která dopadla v hodnocení počtů nejhůře, produkovala spíše kratší peptidy. Dalším pozorovaným jevem bylo, že ve variantě s TEAB pufrům bylo také vyšší procento krátkých (graf 7A, 7B) a hydrofilních peptidů (graf 7C, 7D). Důvodem mohlo být, že nebylo použito žádné aditivum, které by pomohlo udržet hydrofobní peptidy v roztoku.

Rozmezí izoelektrických bodů, ve kterých byla pozorována nejvyšší procenta identifikací, byly stejné (3-5 a 6-7) jako při štěpení na centrifugačním filtru (FASP), protože byl pro štěpení použit také trypsin (graf 7E, 7F).

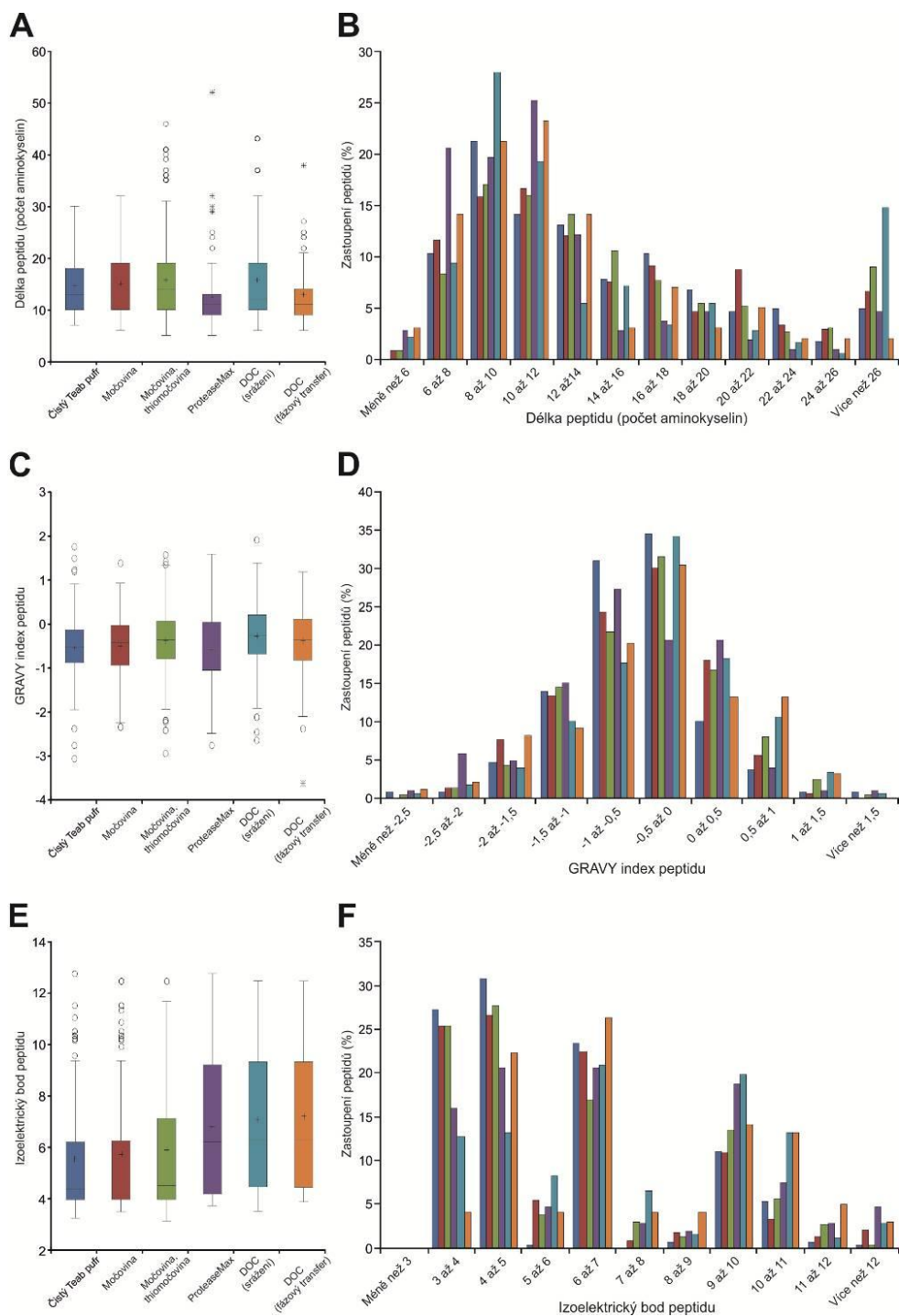


Graf 7: Hodnocení vlastností peptidů daných variant metody štěpení v mikrozkuumavce.

A: Rozložení délek všech peptidů; B: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích délek peptidů (počtů aminokyselin); C: Rozložení GRAVY hodnot všech peptidů; D: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích hodnot GRAVY. Hydrofilní peptidy mají GRAVY hodnoty od $-x$ do 0, hydrofobní peptidy od 0 do $+x$; E: Rozložení izoelektrických bodů (pI) všech peptidů; F: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích pI ; Směrodatné odchytky (B, D, F) jsou znázorněny chybovými úsečkami. Černé kroužky u krabicových grafů (A, C, E) znazornují odlehlé hodnoty, černé hvězdičky extrémně odlehlé hodnoty, černý bod průměr, "krabicová" část diagramu je shora ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem a mezi nimi je linie vymezující medián. Horizontální úsečka vyjadřuje variabilitu dat.

4.2.3 Vlastnosti unikátních peptidů

Trendy vlastností unikátních peptidů, až na hodnoty izoelektrických bodů (graf 8A, 8B, 8C, 8D, 8E, 8F), byly velice podobné trendům všech peptidů jednotlivých variant (graf 7A, 7B, 7C, 7D, 7E, 7F). Přes 70 % unikátních peptidů produkovaných variantou s ProteaseMax bylo kratších délek (do 18 aminokyselin) a identifikované peptidy byly spíše hydrofilní. Naproti tomu ve variantách s DOC a s močovinou a thiomčovinou bylo identifikováno vyšší procentuální zastoupení dlouhých a hydrofobních peptidů. Nejvyšší procento unikátních peptidů bylo opět v rozmezí izoelektrických bodů 3-5 a 6-7, avšak varianta s ProteaseMax a obě varianty s DOC produkovaly vyšší procento bazických unikátních peptidů než ostatní varianty.



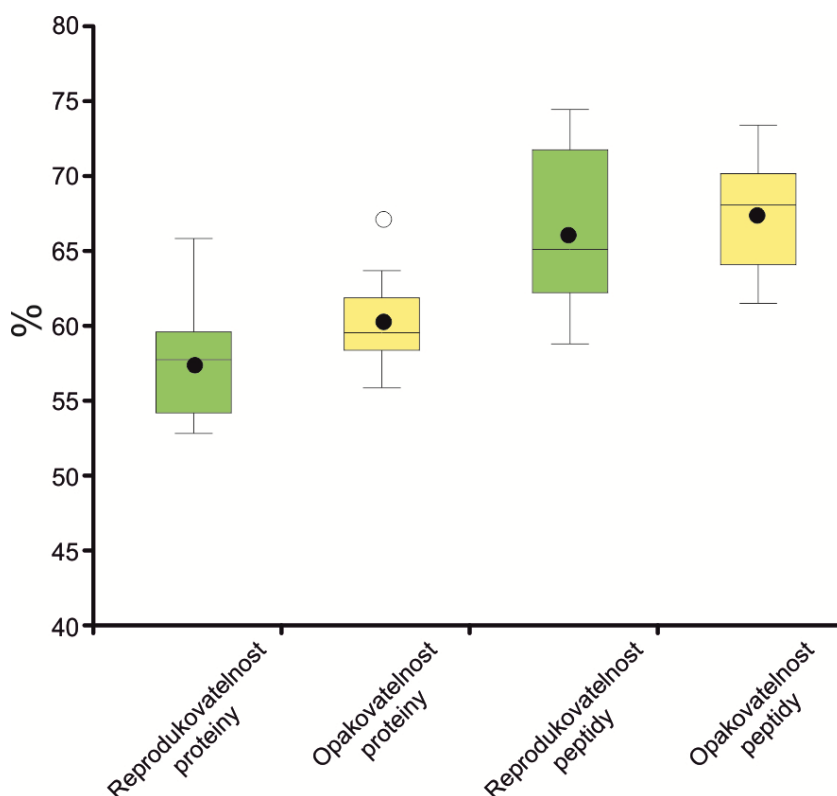
Graf 8: Hodnocení vlastností unikátních peptidů daných variant metody štěpení v mikrozkumavce.

A: Rozložení délek všech unik. peptidů; B: Procentuální zastoupení unik. peptidů v jednotlivých rozmezích délek peptidů (počtu aminokyselin); C: Rozložení GRAVY hodnot všech unik. peptidů; D: Procentuální zastoupení unik. peptidů v jednotlivých rozmezích hodnot GRAVY. Hydrofilní peptidy mají GRAVY hodnoty od $-x$ do 0, hydrofobní peptidy od 0 do $+x$; E: Rozložení izoelektrických bodů (pI) všech unik. peptidů; F: Procentuální zastoupení unik. peptidů v jednotlivých rozmezích pI; Černé kroužky u krabicových grafů (A, C, E) znázorňují odlehle hodnoty, černé hvězdičky extrémy, černý bod průměr, "krabicová" část diagramu je shora ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem a mezi nimi je linie vymezující medián. Horizontální úsečka vyjadřuje variabilitu dat.

4.2.4 Opakovatelnost a reprodukovatelnost

Pro jednotlivé varianty štěpení v mikrozkumavce byla hodnocena jejich opakovatelnost a reprodukovatelnost. Zjištěné hodnoty byly srovnatelné (příloha tab. 5, 6, 7, 8), což ukazuje na robustnost všech variant, a dále byla prezentována pouze celková opakovatelnost a reprodukovatelnost. Jak již bylo zmíněno u metody FASP, reprodukovatelnost by se měla co nejvíce blížit opakovatelnosti. Celková opakovatelnost proteinů při metodě štěpení v mikrozkumavce byla průměrně 60 % a u peptidů 67 % (graf 9). Vedle toho celková reprodukovatelnost na úrovni proteinů činila 57 %, zatímco u peptidů to bylo 66 %.

Z výsledků můžeme vyvodit, že i při štěpení proteinů v mikrozkumavce jsme pracovali s vysokou efektivností a přesností.



Graf 9: Reprdukovatelnost a opakovatelnost metody štěpení v mikrozkumavce.

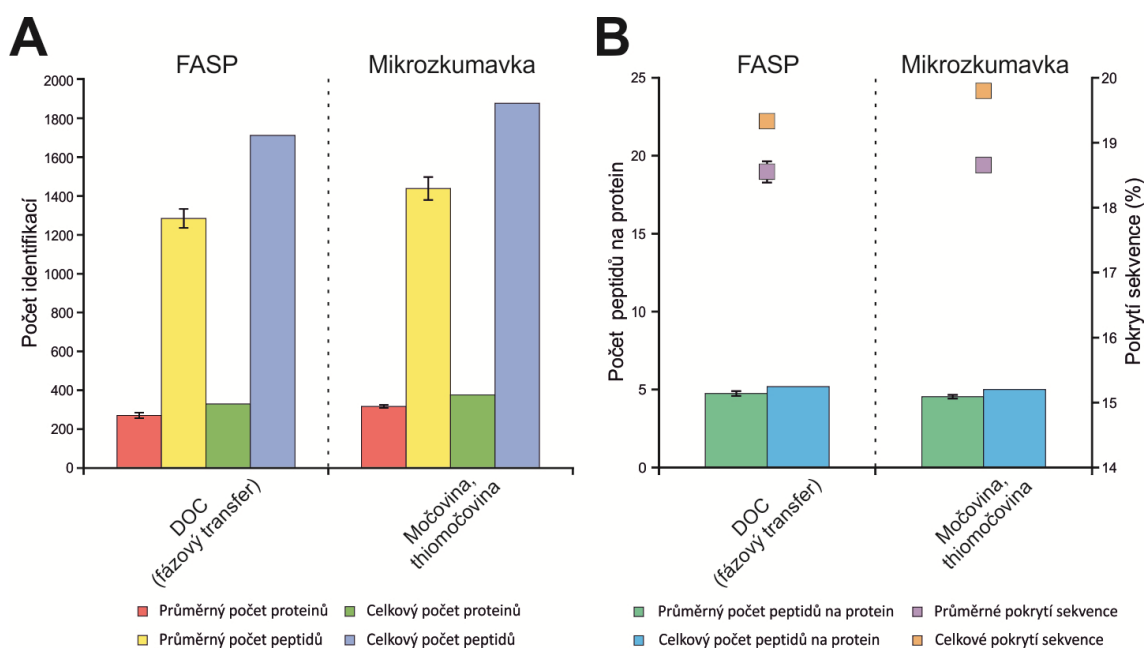
Krabicové grafy znázorňují celkovou opakovatelnost a reprodukovatelnost na úrovni proteinů a peptidů – metoda štěpení v mikrozkumavce. Střední “krabicová“ část diagramu je shora ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem a mezi nimi se nachází linie vymežující medián. Linie vycházející ze střední části diagramu kolmo nahoru a dolů vyjadřující variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem (horní – maximum, dolní – minimum). Černá tečka znázorňuje průměr. Černý kroužek zobrazuje odlehlost.

4.3 Porovnání nejlepších variant ze štěpení proteinů v mikrozkumavce a FASP

Pro porovnání byly vybrány varianty s největším počtem identifikací z obou metod. Pro metodu FASP to byla varianta s DOC, který byl následně odstraněn fázovým transferem, jehož počty identifikací byly výrazně vyšší než u srovnávaných variant s SDS. Z metody štěpení proteinů v mikrozkumavce byla vybrána varianta s močovinou a thiomčovinou, která měla taktéž signifikantně nejvíce identifikovaných proteinů i peptidů.

4.3.1 Počty identifikací a pokrytí sekvence

Metoda FASP s DOC/fázový transfer měla o 45 proteinových a 166 peptidových identifikací méně než u štěpení v roztoku s močovinou a thiomčovinou (graf 10A).



Graf 10: Porovnání metod FASP (DOC/fázový transfer) a štěpení v mikrozkumavce (moč., thiomč.).

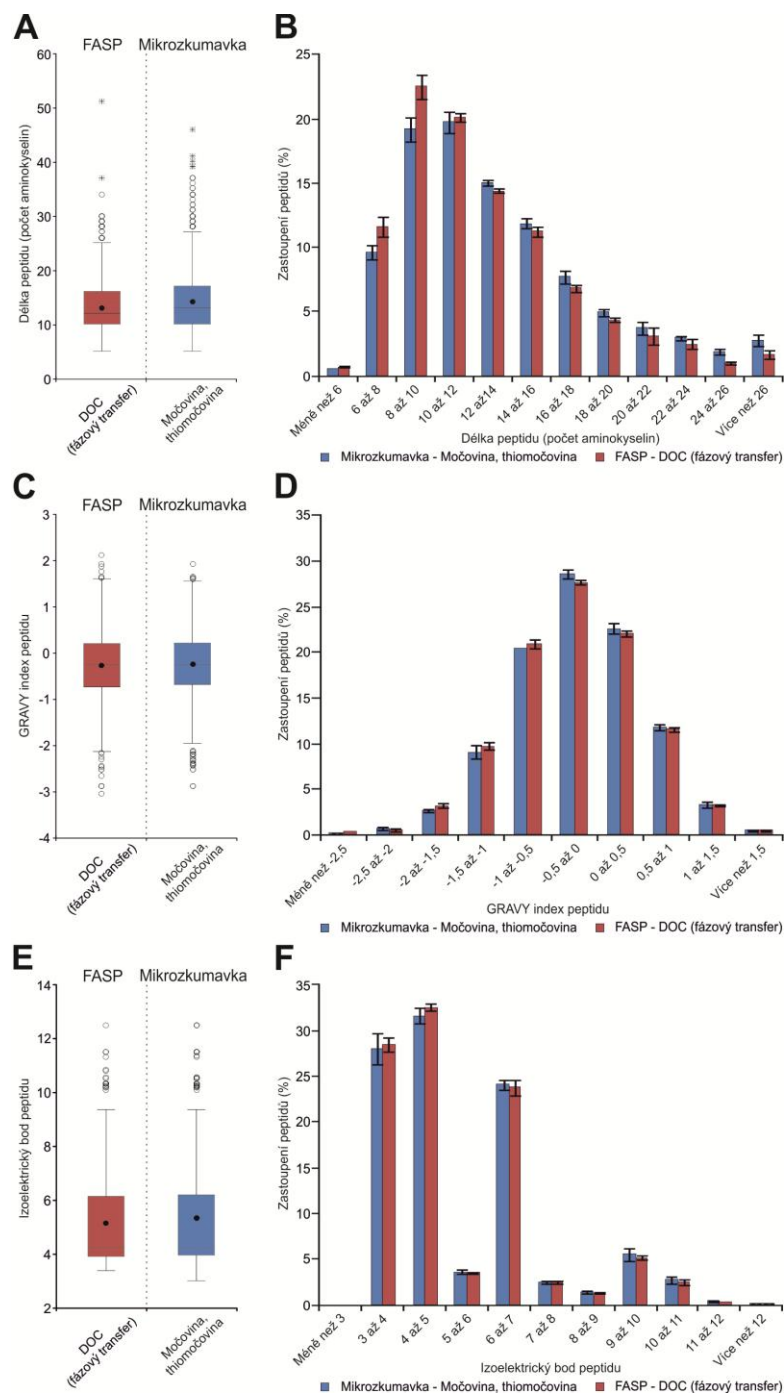
A: Průměrné a celkové počty identifikovaných proteinů a peptidů; B: Průměrný a celkový počet identifikovaných peptidů na protein a pokrytí sekvence; U průměrných hodnot jsou znázorněny směrodatné odchylky pomocí chybových úseček.

Pokrytí sekvence bylo téměř srovnatelné, kdy varianta štěpení v mikrozkumavce měla o 1 % lepší pokrytí sekvence (graf 10B). Naše výsledky se tedy neshodují s výsledky studie autorů León I. R., et al., podle které je varianta DOC/fázový transfer celkově

nejlepší (León I. R., et al., 2013). Z našich výsledků je patrné, že FASP byl celkově v průměru horší v počtu identifikací. To mohlo být způsobeno tím, že byl použit jiný typ filtru, než je doporučováno autory této metody.

4.3.2 Vlastnosti peptidů

Byly srovnány vlastnosti peptidů (délka, hydrofobicita, pI) obou variant. Ve vzájemném srovnání produkovala metoda FASP vyšší procento krátkých peptidů (do 12 aminokyselin), zatímco u metody štěpení v mikrozkumavce s močovinou a thiomčovinou bylo identifikováno vyšší procento dlouhých peptidů (nad 12 aminokyselin) (11A, 11B). Procentuální zastoupení v rozmezích GRAVY hodnot bylo v obou variantách srovnatelné (11C, 1D). Nejvyšší procentuální zastoupení peptidů bylo opět v rozmezích izoelektrických bodů 3-5 a 6-7 (11E, 11F).



Graf 11: Srovnání vlastností peptidů metod FASP (DOC/fázový transfer) a štěpení v mikrozkumavce (moč., thiohoč.).

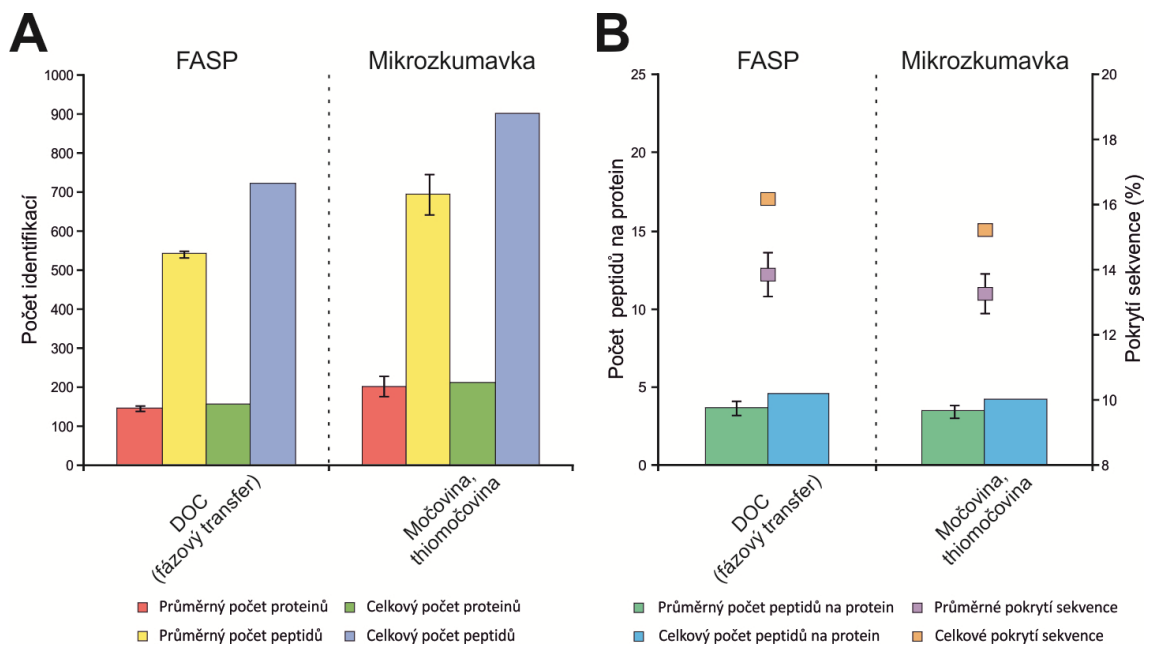
A: Rozložení délek všech peptidů; B: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezech délek peptidů (počtů aminokyselin); C: Rozložení GRAVY hodnot všech peptidů; D: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezech hodnot GRAVY. Hydrofilní peptidy mají GRAVY hodnoty od $-x$ do 0, hydrofobní peptidy od 0 do $+x$; E: Rozložení izoelektrických bodů (pI) všech peptidů; F: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezech pI; Směrodatné odchytky (B, D, F) jsou znázorněny chybovými úsečkami. Černé kroužky u krabicových grafů (A, C, E) znazornují odlehlé hodnoty, černé hvězdičky extrémně odlehlé hodnoty, černý bod průměr, "krabicová" část diagramu je shora ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem a mezi nimi je linie vymezující medián. Horizontální úsečka vyjadřuje variabilitu dat.

4.4 Aplikace nejefektivnějších metod při analýze vzorku mikrosomální frakce *Arabidopsis thaliana*

Pro ověření námi získaných výsledků byl experiment zopakován na mikrosomální frakci získané ze suspenzní kultury *Arabidopsis thaliana* (*Landsberg Erecta*). Pro zopakování byly vybrány obě nejlepší testované varianty. Výsledky tohoto experimentu se shodovaly s daty získanými štěpením proteinů buněk HeLa S3 (viz. 4.3 Porovnání nejlepších variant ze štěpení proteinů v mikrozkuhavce a FASP).

Vyšší průměrný a celkový počet peptidů (přibližně o 160 více) i proteinů (přibližně o 55 více) byl zjištěn v metodě štěpení v mikrozkuhavce s močovinou a thiomčovinou (graf 12A). Pokrytí sekvence bylo v obou metodách absolutně srovnatelné, kdy metoda FASP (DOC/fázový transfer) měla o 0,5 % vyšší pokrytí sekvence než metoda štěpení přímo v roztoku (moč., thiomoč.) (graf 12B).

Procentuální zastoupení peptidů bylo v rozmezích délek, GRAVY hodnot a izoelektrických hodnot peptidů srovnatelné (příloha graf 1, 2, 3).



Graf 12: Porovnání účinnosti metod FASP (DOC/fázový transfer) a štěpení v mikrozkuhavce (moč., thiomoč.) na vzorku mikrosomální frakce *Arabidopsis thaliana*.

A: Průměrné a celkové počty identifikovaných proteinů a peptidů; B: Průměrný a celkový počet identifikovaných peptidů na protein a pokrytí sekvence; U průměrných hodnot jsou znázorněny směrodatné odchylky pomocí chybových úseček.

5 Závěr

Proteomika je vědní disciplína studující proteiny, což jsou hlavní efekторы buněčných funkcí. Jejich studium je tedy nezbytné pro pochopení vitálních biologických pochodů v buňce. Poznatky proteomiky jsou zásadní v mnoha oblastech výzkumu, od zkoumání příčin nemocí včetně navrnutí jejich terapie až po objasnění regulačních drah např. v rostlinách. Pro získání komplexního pohledu na daný biologický jev z hlediska proteomiky je kladen důraz na získání co nejvyššího počtu proteinových a peptidových identifikací. Z tohoto důvodu jsou výzkumnými skupinami stále publikovány články, týkající se přípravy vzorku před MS, optimalizací protokolů a vlivu různých aditiv na MS analýzu.

Tato bakalářská práce se zabývala přípravou vzorku pro MS analýzu, konkrétně srovnáním metod štěpení proteinů v roztoku s různými aditivami. Na základě nedávno publikované literatury byla vybrána 2 různá uspořádání štěpení proteinů v roztoku, a to na centrifugačním filtru (FASP) a v mikrozkuhavce. Pro každou metodu štěpení bylo vyzkoušeno několik variant lišících se přidáním aditiv či metodou jejich odstranění. Dohromady bylo testováno 9 různých variant – z toho 3 pro FASP a 6 pro štěpení v mikrozkuhavce. Všechny varianty byly provedeny v triplikátu, což dohromady činilo 27 laboratorních experimentů a každý triplikát byl dvakrát nezávisle změřen. Celkem tedy bylo provedeno 54 MS analýz. Ze zpracovaných experimentálních dat je patrné, že při štěpení proteinů na centrifugačním filtru bylo nejvíce proteinů i peptidů identifikovaných ve variantě s deoxycholátem sodným (DOC) následně odstraněným fázovým transferem. Navíc bylo při použití DOC identifikováno vyšší procento hydrofobních peptidů než ve variantách s dodecylsíránem sodným (SDS). V metodě štěpení proteinů v mikrozkuhavce bylo dosaženo nejlepších výsledků ve variantě s močovinou a thiomočovinou, taktéž s nejvíce identifikacemi a nejvyšším procentuálním zastoupením hydrofobních peptidů. Experiment byl zopakován s nejlepšími variantami obou uspořádání na mikrozomální frakci *Arabidopsis thaliana* (suspenzní kultura *Landsberg Erecta*). Nejlepších výsledků bylo dosaženo metodou štěpení v mikrozkuhavce s močovinou a thiomočovinou, kde bylo identifikováno více proteinů i peptidů. Ze získaných výsledků vyplývá, že tato varianta je celkově nejvhodnějším postupem přípravy vzorku před MS. Metoda FASP dosáhla celkově v průměru nižšího počtu identifikací, což mohlo být způsobeno použitím jiného typu filtru, než byl doporučen v literatuře.

Na oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná v současné době probíhá několik screeningových projektů, jejichž hlavním cílem je zmapovat co největší množství proteinů v daném vzorku a případné změny v jejich hladinách. Příkladem může být mapování jaderného proteomu ječmene, či studium změn proteinového složení leukocytů po působení různých miRNA. Poznatky této bakalářské práce tak mnohou být s výhodou uplatněny v těchto screeningových projektech, ale také v mnohých dalších proteomických studiích.

6 Seznam použité literatury

Andersson C-O.; Mass Spectrometric Studies on Amino Acid and Peptide Derivatives; 1958; Acta. Chem. Scand.; 12; 1353-1353

Andrews P. C., Dixon J. E.; A procedure for in situ alkylation of cysteine residues on glass fiber prior to protein microsequence analysis; 1987; Anal. Biochem.; 161(2):524-528

Aston F. W.; The Mass-Spectra of Chemical elements; 1919; Phil. Mag.; 371:707

Azarkan M., Huet J., Baeyens-Volant D., Looze Y., Vandebussche G.; Affinity chromatography: a useful tool in proteomics studies; 2007; J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.; 849(1-2):81-90

Beck M., Schmidt A., Malmstroem J., Claassen M., Ori A., Szymborska A., Herzog F., Rinner O., Ellenberg J., Aebersold R.; The quantitative proteome of a human cell line; 2011; Mol. Syst. Biol.; 7:549

Beers M. F., Bates S. R., Fisher A. B.; Differential extraction for the rapid purification of bovine surfactant protein B; 1992; Am J Physiol.; 262(6Pt1):L773-8

Bennion B. J., Daggett V.; The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea; 2003; Proc Natl Acad Sci U S A.; 100(9):5142–5147

Bereman M. S., Egertson J. D., MacCoss M. J.; Comparison between procedures using SDS for shotgun proteomic analyses of complex samples; 2011; Proteomics; 11(14):2931-2935

Berggård T., Linse S., James P.; Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions; 2007; Proteomics; 7(16):2833-42

Biemann K., Seibl J., Gapp F.; Mass spectrometric identification of amino acids; 1959; Biochem. Biophys. Res. Commun.; 1(6): 307–311

Bland J. M., Altman D. G.; Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement; 1986; Lancet; 1(8476):307-10

Boháč M., Ingendoh A., Fuchser J., Witt M., FTICR a její využití jako nejflexibilnější hmotnostně spektrometrické metody v proteomice; 2005; Chemické listy; 99:943 – 951

Botelho D., Wall M. J., Vieira D. B., Fitzsimmons S., Liu F., Doucette A.; Top-down and bottom-up proteomics of SDS-containing solutions following mass-based separation; 2010; J Proteome Res.; 9(6):2863-707

Brownridge P., Beynon R. J.; The importance of the digest: Proteolysis and absolute quantification in proteomics; 2011; Methods; 54(4):351-360

Cleland W. W.; Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups; 1964; Biochemistry; 3(4):480–482

Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H.; The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins; 1963; J Biol Chem.; 238:622-7

Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B.; Selective enzyme purification by affinity chromatography; 1968; Proc Natl Acad Sci U S A; 61(2): 636–643

Delaney B., Astwood J. D., Cunny H., Conn R. E., Herouet-Guicheney C., Macintosh S., Meyer L. S., Privalle L., Gao Y., Mattsson J., Levine M.; Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology; 2008; Food Chem Toxicol.; 46:71-97

Erde J., Loo R. R., Loo J. A.; Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments; 2014; J Proteome Res.; 13(4):1885-95

Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., and Whitehouse C. M.; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules; 1989; Science; 246(4926):64-71

Friedecký D., Lemr K.; Úvod do hmotnostní spektrometrie; 2012; Klin. Biochem. Metab., 20(41):152–157

Getz E. B., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R., Selvin P. R.; A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry; 1999; Anal Biochem.; 273(1):73-80

Graves P. R., Haystead T. A. J.; Molecular Biologist's Guide to Proteomics; 2002; Microbiol. Mol. Biol. Rev.; 66(1):39-63

Havliš J., Štosová T., Šebela M., Lenobl R.; Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku; 2005; Chemické listy, 99(12):896-905

Herbert B., Galvani M., Hamdan M., Olivieri E., MacCarthy J., Pedersen S., Righetti P. G.; Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: Why, when, and how?; 2001; 22(10): 2046–2057

Chen E. I., Cociorva D., Norris J. L., Yates J. R. 3rd.; Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics; 2007; J Proteome Res.; 6(7):2529-38

Karas M., Bahr U., Strupat K., Hillenkamp F., Tsarbopoulos A., Pramanik B. N.; Matrix Dependence of Metastable Fragmentation of Glycoproteins in MALDI TOF Mass Spectrometry; 1995; Anal. Chem., 67(3):675–679

Kim B., Fatayer H., Hanby A. M., Horgan K., Perry S. L., Valleley E. M., Verghese E. T., Williams B. J., Thorne J. L., Hughes T. A.; Neoadjuvant chemotherapy induces expression levels of breast cancer resistance protein that predict disease-free survival in breast cancer; 2013; PLoS One.; 8(5):e62766

Kinter M., Sherman N. E.; Protein Sequencing and identification using tandem mass spectrometry; 2000; Willey-interscience, str. 147-152

Kool J., Jonker N., Irth H., Niessen W. M.; Studying protein–protein affinity and immobilized ligand–protein affinity interactions using MS-based methods; 2011; *Anal Bioanal Chem.*; 401(4):1109-25

Krishna, R. G., and Wold F.; Post-translational modification of proteins; 1993; *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*; 67:265-298

Kupiec T.; Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography; 2004; *International Journal of Pharmaceutical Compounding*; 8(3):227-227

Laemmli U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; 1970; *Nature*; 227(5259):680-685

León I. R., Schwämmle V., Jensen O. N., Sprenger R. R.; Quantitative assessment of in-solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis; 2013; *Mol Cell Proteomics*; 12(10):2992-3005

Liebler D. C., Ham A. J.; Spin filter–based sample preparation for shotgun proteomics; 2009; *Nature Methods*; 6(11):785

Liebler D. C.; *Introduction to Proteomics, Tool for the New Biology*; 2002; Humana Press Inc.; str. 3-4, 31-76

Lin Y., Zhou J., Bi D., Chen P., Wang X., Liang S.; Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins; 2008; *Anal Biochem.*; 377(2):259-66

Link A. J., Eng J., Schieltz D. M., Carmack E., Mize G. J., Morris D. R., Garvik B. M., Yates J. R. III.; Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry; 1999; *Nat. Biotechnol.*, 17(7):676-82

Mallick P., Kuster B.; Proteomics: a pragmatic perspective; *Nature Biotechnology*; 2010; 28(7):695-709

Manza L. L., Stamer S. L., Ham A-J. L., Codreanu S. G., Liebler D. C.; Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters; 2005; *Proteomics*; 5(7):1742-5

Marshall J., Jankowski A., Furesz S., Kireeva I., Barker L., Dombrovsky M., Zhu W., Jacks K., Ingratta L., Bruin J., Kristensen E., Zhang R., Stanton E., Takahashi M., Jackowski G.; Human serum proteins pre-separated by electrophoresis or chromatography followed by tandem mass spectrometry; 2004; *J Proteome Res.*; 3(3):364-82

Masuda T., Tomita M., Ishihama Y.; Phase Transfer Surfactant-Aided Trypsin Digestion for Membrane Proteome Analysis; 2008; *J. Proteome Res.*; 7(2):731-40

Maurer M., Müllet A. C., Wagner Ch., Huber M. L., Rudashevskaya E. L., Wagner S. N., Bennett K. L.; Combining Filter-Aided Sample Preparation and Pseudoshotgun Technology To Profile the Proteome of a Low Number of Early Passage Human Melanoma Cells; 2013; *J. Proteome Res.*; 12, 1040-1048

McLafferty F. W.; Tandem mass spectrometry; 1981; *Science*; 214(4518):280-287

Mineki R., Taka H., Fujimura T., Kikkawa M., Shindo N., Murayama K.; In situ alkylation with acrylamide for identification of cysteinyl residues in proteins during one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; 2002; *Proteomics*; 2(12):1672-81

Nagaraj N., Lu A., Mann M., Wiśniewski J. R.; Detergent-based but gel-free method allows identification of several hundred membrane proteins in single LC-MS runs; 2008; *J Proteome Res.*; 7(11):5028-32

Neilson K. A., Ali N. A., Muralidharan S., Mirzaei M., Mariani M., Assadourian G., Lee A., van Sluyter S. C., Haynes P. A.; Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry; 2011; *Proteomics.*; 11(4):535-53

Niessen W. M. A.; *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, 3. vydání; 2006; CRP Press; str. 11

Plowman J. E., Flanagan L. M., Paton L. N., Fitzgerald A. C., Joyce N. I., Bryson W. G.; The effect of oxidation or alkylation on the separation of wool keratin proteins by two-dimensional gel electrophoresis; 2003; *Proteomics*; 3(6):942-50

Proc J. L., Kuzyk M. A., Hardie D. B., Yang J., Smith D. S., Jackson A. M., Parker C. E., Borchers C. H.; A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin; 2010; *J Proteome Res.*; 9(10):5422-37

Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y.; Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips; 2007; *Nat. Protoc.*; 2(8):1896-906

Raymond S., Nakamichi M., Aurell B.; Acrylamide gel as an electrophoresis medium; 1962; *Nature*; 195:697

Rehm H.; *Protein Biochemistry and Proteomics*; 2006; Elsevier Inc.; str. 83-86

Rietschel B., Bornemann S., Arrey T. N., Baeumlisberger D., Karas M., Meyer B.; Membrane protein analysis using an improved peptic in-solution digestion protocol; 2009; *Proteomics*; 9(24):5553-7

Ru Q. C., Zhu L. A., Katenhusen R. A., Silberman J., Brzeski H., Liebman M., Shriver C. D.; Exploring human plasma proteome strategies: high efficiency in-solution digestion protocol for multi-dimensional protein identification technology; 2006; *J Chromatogr A.*; 1111(2):175-91

Saveliev S., Simpson D., Daily W., Woodroffe C., Klaubert D., Sabat G., Bulliet R., Wood K. V.; Improve Protein Analysis with the New, Mass Spectrometry Compatible ProteasMAX™ Surfactant; 2008; *Promega Notes*; 99

Shapiro A. L., Viñuela E., Maizel J. V. Jr.; Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels; 1967; *Biochem Biophys Res Commun*; 28(5):815-820

Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J. V., Mann M.; In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes; 2006; *Nat Protoc.*; 1(6):2856-60

Strader M. B., Tabb D. L., Hervey W. J., Pan C., Hurst G. B.; Efficient and specific trypsin digestion of microgram to nanogram quantities of proteins in organic-aqueous solvent systems; 2006; *Anal Chem*; 78(1):125-34

Svensson H., Woldbye F., Lindahl T., Palmstierna H., Sjöberg B., Toft J.; Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients, I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solutions for simple cases; 1961; *Acta Chem Scand*; 15:325-341

Tabb D. L., Vega-Montoto L., Rudnick P. A., Variyath A. M., Ham A. J., Bunk D. M., Kilpatrick L. E., Billheimer D. D., Blackman R. K., Cardasis H. L., Carr S. A., Clauser K. R., Jaffe J. D., Kowalski K. A., Neubert T. A., Regnier F. E., Schilling B., Tegeler T. J., Wang M., Wang P., Whiteaker J. R., Zimmerman L. J., Fisher S. J., Gibson B. W., Kinsinger C. R., Mesri M., Rodriguez H., Stein S. E., Tempst P., Paulovich A. G., Liebler D. C., Spiegelman C.; Repeatability and reproducibility in proteomic identifications by liquid chromatography-tandem mass spectrometry; 2010; *J Proteome Res.*; 9(2):761-76

Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., T. Matsuo Sponsor Referee; Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry; 1988; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; 2(8):151

Thomson J. J.; Cathode Rays; 1897; *Phil. Mag.*; 44:293

Twyman R. M.; Principles of proteomics; 2004; Garland Science/BIOS Scientific Publishers; str. 4, 18, 34, 55, 165-167

Veenstra T. D., Yates J. R.; Proteomics for Biological Discovery; 2006; John Wiley & Sons, Inc.; str. 7-10, 119-128

Verberkmoes N. C., Hervey W. J., Shah M., Land M., Hauser L., Larimer F. W., Van Berkel G. J., Goeringer D. E.; Evaluation of "shotgun" proteomics for identification of biological threat agents in complex environmental matrixes: experimental simulations; 2005; Anal Chem.; 77(3):923-32

Vesterberg O.; Synthesis and isoelectric fractionation of Carrar ampholyted; 1969; Acta Chem Scand.; 23:2653

Washburn M. P., Wolters D., Yates J. R. 3rd; Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology; 2001; Nat. Biotechnol.; 19(3):242-7

Wedemeyer W. J., Welker E., Narayan M., Scheraga H. A.; Disulfide Bonds and Protein Folding; 2000; 39(15):4207–4216

Westermeier R., Naven T. Höpker H-R.; Proteomics in Practise: A Guide to Successful Experimental Design, 2. vydání; 2008; Wiley-VCH Verlag-GmbH Weinheim; str. 19-20, 141-149, 151

Wilkins M. R., Sanchez J. C., Gooley A. A., Appel R. D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D. F., Williams K. L.; Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it; 1995; Biotech Gen Eng Rev; 13:19-50

Wiśniewski J. R., Mann M.; Reply to “Spin filter–based sample preparation for shotgun proteomics”; 2009b; Nature Methods; 6(11):785 – 786

Wiśniewski J. R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M.; Universal sample preparation method for proteome analysis; 2009a; Nat. Methods; 6(5):359-62

Wiśniewski J. R., Mann M.; Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis; 2012; *Anal Chem.*; 84(6):2631-7

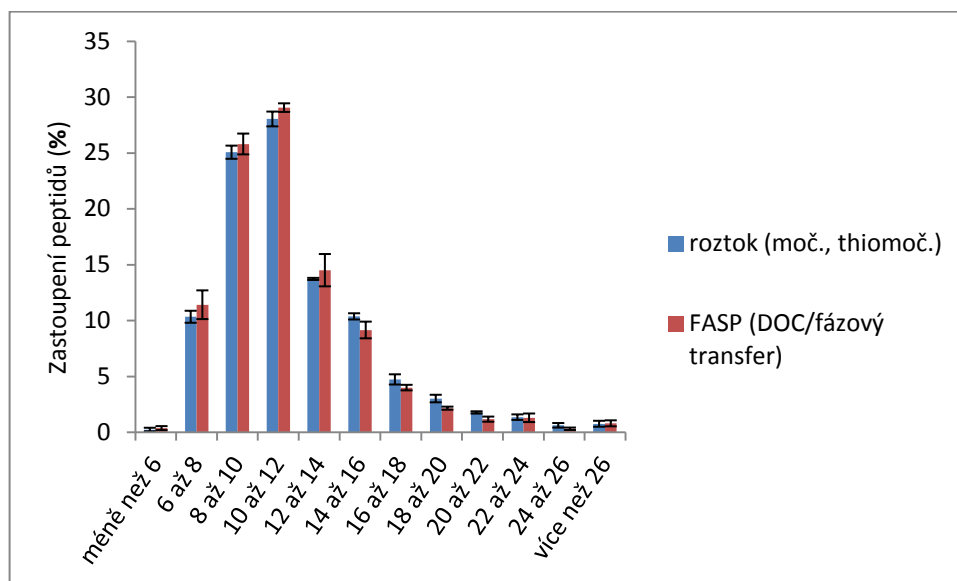
Wiśniewski J. R., Zielinska D. F., Mann M.; Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method; 2011; *Anal Biochem.*; 410(2):307-9

Wu C. C., MacCoss M. J.; Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems; 2002; *Curr Opin Mol Ther.*;4(3):242-50

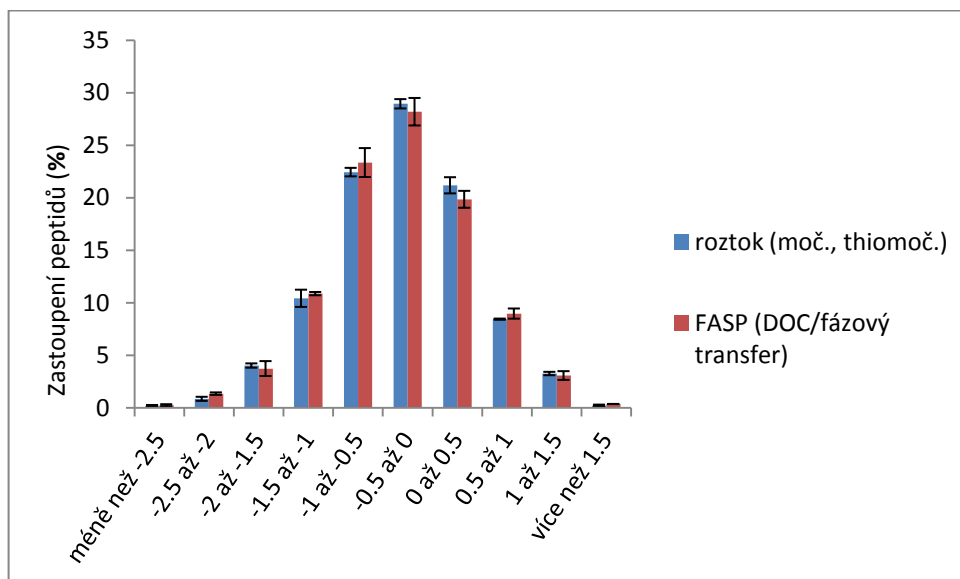
Yu Y. Q., Gilar M., Lee P. J., Bouvier E. S., Gebler J. C.; Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins; 2003; *Anal Chem.*; 75(21):6023-8

Zhou J., Zhou T., Cao R., Liu Z., Shen J., Chen P., Wang X., Liang S.; Evaluation of the application of sodium deoxycholate to proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane; 2006; *J Proteome Res.*; 5(10):2547-53

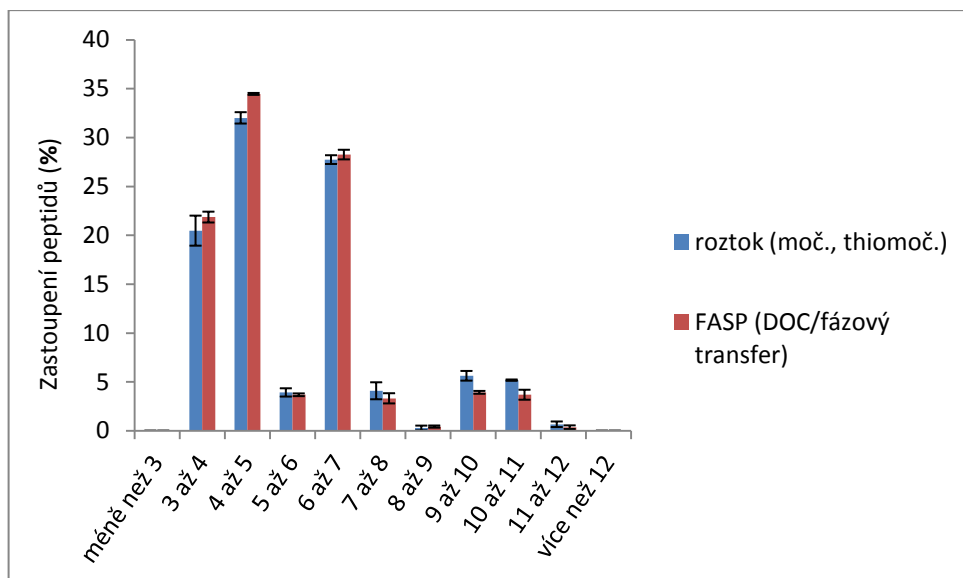
Přílohy



Graf 1: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích délek peptidů (počtu aminokyselin) – mikrozomální frakce získaná ze suspenzní kultury *Arabidopsis thaliana* (Landsberg Erecta) byla použita pro zopakování experimentu nejlepšími variantami (FASP – DOC/fázový transfer, v mikrozkumavce – moč., thiomoč.). Směrodatné odchylky jsou znázorněny chybovými úsečkami.



Graf 2: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích hodnot GRAVY z mikrozomální frakce získané ze suspenzní kultury *Arabidopsis thaliana* (Landsberg Erecta). Hydrofilní peptidy mají GRAVY od $-x$ do 0, zatímco peptidy hydrofobních vykazují GRAVY od 0 do $+x$. Směrodatné odchylky jsou znázorněny chybovými úsečkami.



Graf 3: Procentuální zastoupení peptidů v jednotlivých rozmezích izoelektrických bodů (pI) mikrozmální frakce získané ze suspenze kultury *Arabidopsis thaliana* (Landsberg Erecta) Směrodatné odchylky jsou znázorněny chybovými úsečkami.

Opakovatelnost na úrovni proteinů - FASP					
		Počet všech proteinů	Počet společných proteinů	Počet společných proteinů [%]	Unikátní proteiny
SDS, DTT	A/A	227	129	56.83	98
	B/B	248	154	62.10	94
	C/C	238	145	60.92	93
SDS, TCEP	A/A	227	151	66.52	76
	B/B	274	166	60.58	108
	C/C	225	141	62.67	84
DOC/fázový transfer	A/A	296	173	58.45	123
	B/B	307	202	65.80	105
	C/C	295	167	56.61	128

Tab. 1: Porovnání dvou nástřiků daného triplikátu v rámci jednotlivých variant FASP. Počty společných proteinů [%] ukazují danou opakovatelnost mezi nástřiky.

Reprodukovatelnost na úrovni proteinů - FASP					
		Počet všech proteinů	Počet společných proteinů	Počet společných proteinů [%]	Unikátní proteiny
SDS, DTT	A/B	276	156	56.52	120
	A/C	273	155	56.78	118
	B/C	270	178	65.93	92
SDS, TCEP	A/B	294	168	57.14	126
	A/C	262	165	62.98	97
	B/C	287	176	61.32	111
DOC/fázový transfer	A/B	351	203	57.83	148
	A/C	335	191	57.01	144
	B/C	345	199	57.68	146

Tab. 2: Porovnání triplikátů mezi sebou v rámci jednotlivých variant FASP. Počty společných proteinů [%] ukazují danou reprodukovatelnost mezi triplikáty.

Opakovatelnost na úrovni peptidů - FASP					
		Počet všech peptidů	Počet společných peptidů	Počet společných peptidů [%]	Unikátní peptidy
SDS, DTT	A/A	876	593	67.69	283
	B/B	1034	695	67.21	339
	C/C	970	651	67.11	319
SDS, TCEP	A/A	933	615	65.92	318
	B/B	1109	757	68.26	352
	C/C	919	633	68.88	286
DOC/fázový transfer	A/A	1397	940	67.29	457
	B/B	1477	1020	69.06	457
	C/C	1415	963	68.06	452

Tab. 3: Porovnání dvou nástríků daného triplikátu v rámci jednotlivých variant FASP. Počty společných peptidů [%] ukazují danou opakovatelnost mezi nástríky.

Reprodukovatelnost na úrovni peptidů - FASP					
		Počet všech peptidů	Počet společných peptidů	Počet společných peptidů [%]	Unikátní peptidy
SDS, DTT	A/B	1179	739	62.68	440
	A/C	1132	737	65.11	395
	B/C	1198	813	67.86	385
SDS, TCEP	A/B	1266	790	62.40	476
	A/C	1129	749	66.34	380
	B/C	1238	816	65.91	422
DOC/fázový transfer	A/B	1792	1112	62.05	680
	A/C	1750	1083	61.89	667
	B/C	1774	1139	64.21	635

Tab. 4: Porovnání triplikátů mezi sebou v rámci jednotlivých variant FASP. Počty společných proteinů [%] ukazují danou reprodukovatelnost mezi triplikáty.

Opakovatelnost na úrovni proteinů - v mikrozkumavce					
		Počet všech proteinů	Počet společných proteinů	Počet společných proteinů [%]	Unikátní proteiny
Teab pufr	A/A	370	220	59.46	150
	B/B	379	228	60.16	151
	C/C	380	219	57.63	161
Močovina	A/A	345	232	67.25	113
	B/B	366	214	58.47	152
	C/C	361	226	62.60	135
Moč., thiomoch.	A/A	398	242	60.80	156
	B/B	400	235	58.75	165
	C/C	401	224	55.86	177
ProteaseMax	A/A	341	202	59.24	139
	B/B	341	211	61.88	130
	C/C	344	211	61.34	133
DOC/srážení	A/A	358	228	63.69	130
	B/B	374	223	59.63	151
	C/C	368	231	62.77	137
DOC/fázový transfer	A/A	367	214	58.31	153
	B/B	358	209	58.38	149
	C/C	368	210	57.07	158

Tab. 5: Porovnání dvou nástřiků daného triplikátu v rámci jednotlivých variant štěpení v mikrozkumavce. Počty společných peptidů [%] ukazují danou opakovatelnost mezi nástřiky.

Reprodukovatelnost na úrovni proteinů – v mikrozkuhavce					
		Počet všech proteinů	Počet společných proteinů	Počet společných proteinů [%]	Unikátní proteiny
Teab pufr	A/B	337	178	52.82	159
	A/C	315	172	54.60	143
	B/C	340	186	54.71	154
Močovina	A/B	316	181	57.28	135
	A/C	320	172	53.75	148
	B/C	318	193	60.69	125
Moč., thiomoch.	A/B	363	209	57.58	154
	A/C	358	194	54.19	164
	B/C	345	201	58.26	144
ProteaseMax	A/B	297	177	59.60	120
	A/C	303	182	60.07	121
	B/C	310	192	61.94	118
DOC/srážení	A/B	322	191	59.32	131
	A/C	319	210	65.83	109
	B/C	333	196	58.86	137
DOC/fázový transfer	A/B	316	183	57.91	133
	A/C	328	176	53.66	152
	B/C	316	170	53.80	146

Tab. 6: Porovnání triplikátů mezi sebou v rámci jednotlivých variant štěpení v mikrozkuhavce. Počty společných proteinů [%] ukazují danou reprodukovatelnost mezi triplikáty.

Opakovatelnost na úrovni peptidů – v mikrozkumavce					
		Počet všech peptidů	Počet společných peptidů	Počet společných peptidů [%]	Unikátní peptidy
Teab pufr	A/A	1725	1061	61.51	664
	B/B	1775	1156	65.13	619
	C/C	1742	1073	61.60	669
Močovina	A/A	1643	1117	67.99	526
	B/B	1728	1093	63.25	635
	C/C	1707	1094	64.09	613
Moč., thiomoch.	A/A	1947	1299	66.72	648
	B/B	1944	1223	62.91	721
	C/C	1869	1206	64.53	663
ProteaseMax	A/A	1357	932	68.68	425
	B/B	1362	957	70.26	405
	C/C	1355	943	69.59	412
DOC/srážení	A/A	1568	1151	73.41	417
	B/B	1646	1122	68.17	524
	C/C	1621	1136	70.08	485
DOC/fázový transfer	A/A	1543	1100	71.29	443
	B/B	1542	1082	70.17	460
	C/C	1545	1120	72.49	425

Tab. 7: Porovnání dvou nástřiků daného triplikátu v rámci jednotlivých variant štěpení v mikrozkumavce. Počty společných peptidů [%] ukazují danou opakovatelnost mezi nástřiky.

Reprodukovatelnost na úrovni peptidů – v mikrozkuhavce					
		Počet všech peptidů	Počet společných peptidů	Počet společných peptidů [%]	Unikátní peptidy
Teab pufr	A/B	1449	852	58.80	597
	A/C	1309	804	61.42	505
	B/C	1468	871	59.33	597
Močovina	A/B	1385	871	62.89	514
	A/C	1364	873	64.00	491
	B/C	1423	894	62.83	529
Moč., thiomoch.	A/B	1654	1036	62.64	618
	A/C	1572	978	62.21	594
	B/C	1468	979	66.69	489
ProteaseMax	A/B	1152	763	66.23	389
	A/C	1133	813	71.76	320
	B/C	1165	850	72.96	315
DOC/srážení	A/B	1350	969	71.78	381
	A/C	1343	1000	74.46	343
	B/C	1392	953	68.46	439
DOC/fázový transfer	A/B	1294	934	72.18	360
	A/C	1332	946	71.02	386
	B/C	1315	809	61.52	506

Tab. 8: Porovnání triplikátů mezi sebou v rámci jednotlivých variant štěpení v mikrozkuhavce. Počty společných proteinů [%] ukazují danou reprodukovatelnost mezi triplikáty.