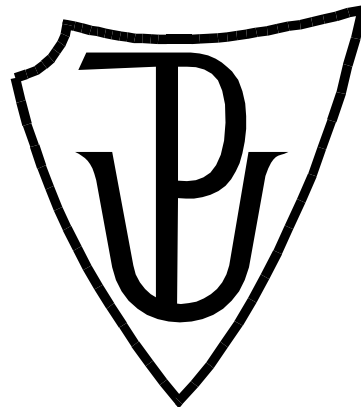


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Cílená lipidomická analýza plasem myší
s deficitem glutamátcarboxypeptidasy II**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Hanáková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Tímto bych chtěla velmi poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Radaně Karlíkové Ph.D. jak za odborné vedení, pomoc a rady, ale také za vstřícný přístup a velké množství času, které mi po celou dobu věnovala, a tím pomohla k vypracování teoretické i experimentální části. Díky také patří celému kolektivu z Ústavu molekulární a translační biomedicíny za spolupráci a 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy, v jejíž spolupráci byly získány vzorky plasem myší. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Tereze Jedelské Ph.D. za pomoc při gramatické kontrole práce a velkou podporu.

Nakonec mé poděkování patří také rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu ve studiu podporovali.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Hanáková
Název práce	Cílená lipidomická analýza plasem myši s deficitem glutamátkarboxypeptidasy II
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení klinické biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Radana Karlíková Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII, EC 3.4.17.21), transmembránový glykoprotein II. typu, jehož polypeptidový řetězec se skládá ze 750 aminokyselin patří do enzymové rodiny M28 metalopeptidas. K její expresi u člověka dochází zejména v mozku, prostatě a tenkém střevě. V mozku GCPII hydrolyzuje neurotransmitter N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát na N-acetyl-L-aspartát a volný glutamát, jehož kumulace působí neurotoxicky. V tomto ohledu je inhibice GCPII považována za neuroprotektivní. V tenkém střevě hraje GCPII zásadní roli při metabolismu folátů, v prostatě je její biologická aktivita zatím neznámá, nicméně slouží jako marker rakoviny prostaty.

V praktické části byly vzorky plasem myši podrobeny cílené lipidomické analýze za využití kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Cílem práce bylo hledat změny v lipidovém profilu myši s delecí v genu pro GCPII oproti zdravým kontrolám. Změny v lipidovém profilu byly však pozorovány zejména v souvislosti s věkem a pohlavím. Inaktivace GCPII nemá dle našich výsledků výrazný vliv na lipidový profil plasmy.

Klíčová slova	Glutamátkarboxypeptidasa II, lipidy, lipidomika, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Hanáková
Title	Targeted lipidomic analysis of mice plasma with the glutamate carboxypeptidase II deficiency
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Clinical Biochemistry
Supervisor	Mgr. Radana Karlíková Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Glutamate carboxypeptidase II (GCPII, EC 3.4.17.21) is a type of II transmembrane glycoprotein consisted of 750 amino acids residues. GCPII belongs to the family M28 of metallopeptidases. The enzyme is mainly expressed in human brain, prostate and small intestine. GCPII in human brain hydrolyses the neurotransmitter N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate to N-acetyl-L-aspartate and free glutamate which cumulation is neurotoxic. Here, the inhibition of GCPII is considered to be neuroprotective. GCPII in small intestine has a crucial role in folate metabolism, however, there isn't known biological activity of GCPII in prostate. It serves as a marker of prostate cancer.

In the experimental part, the mice plasma samples were put through targeted lipidomic analysis using the liquid chromatography in connection with tandem mass spectrometry. The aim of this study was looking for the changes in the lipid profile of mice with deletion of GCPII gene in contrast to the healthy controles. According to the results, inactivation of GCPII has no substantial effect on the lipid profile. The changes in lipid profile were only found between different gender and age.

Keywords	Glutamate carboxypeptidase II, lipids, lipidomics, mass spectrometry
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	GLUTAMÁTKARBOXYPETIDASA II	8
1.1	Úvodní informace	8
1.2	Struktura GCPII.....	8
1.3	Substrátová specifita.....	10
1.4	Inhibitory	10
1.5	Fyziologické funkce	11
1.5.1	Hydrolýza NAAG	11
1.5.2	Hydrolýza polyglutamylovaných folátů.....	12
1.6	Deficit GCPII u myší.....	13
1.7	Terapeutický cíl.....	13
2	LIPIDY	14
2.1	Obecná definice a rozdělení	14
2.1.1	Mastné kyseliny	14
2.1.2	Triacylglyceroly a vosky.....	16
2.1.3	Polární lipidy.....	18
2.1.4	Isoprenoidy.....	21
2.2	Biologická funkce lipidů	22
3	LIPIDOMIKA.....	25
4	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	26
4.1	Instrumentace	27
4.1.1	Iontový zdroj.....	27
4.1.1.1	Elektronová ionizace.....	27
4.1.1.2	Elektrosprej.....	28
4.1.1.3	MALDI	29
4.2	Hmotnostní analyzátor	29
4.2.1	Kvadrupól.....	30
4.3	Detektor	31
5	MATERIÁL.....	32
5.1	Chemikálie a roztoky.....	32
5.2	Přístroje	32
5.3	Biologický materiál	32
5.4	Příprava vzorků	37
6	METODY	37
6.1	Cílená lipidomická analýza	37

6.2	Statistická analýza	38
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	39
7.1	Cílená lipidomická analýza	39
7.2	Statistická analýza	40
8	ZÁVĚR	52
9	LITERATURA	53
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	60

TEORETICKÁ ČÁST

1 GLUTAMÁTKARBOXYPEPTIDASA II

1.1 Úvodní informace

Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII, EC 3.4.17.21) je transmembránová metalopeptidasa. V 80. letech 20. století byla zkoumaná třemi různými vědními obory, díky nimž byl enzym několikrát nezávisle pojmenován.

Prvním názvem enzymu byla foláthydrolasa nacházející se v tenkém střevě, kterou se zabývali odborníci v oblasti dietologie (Cheng a Prusoff, 1973). V neurologii byl enzym popsán v mozku, kde hydrolyzoval neurotransmitter N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG). Z tohoto důvodu byl pojmenován jako NAALA dipeptidasa, později NAALADasa, z angl. N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase (Robinson *et al.*, 1987).

Dalším vědním oborem byla onkologie. Výzkumy se týkaly monoklonální protilátky 7E11, která specificky interagovala s antigenem na buňkách lidské prostaty. Vědci tento antigen nazvali PSMA z angl. prostate-specific membrane antigen (Horoszewicz *et al.*, 1987).

Později se však ukázalo, že PSMA, foláthydrolasa a NAALADasa jsou strukturně totožné enzymy. Proto došlo, díky názvoslovné komisi IUBMB, ke sjednocení názvu na oficiální a současně používaný GCPII (Barret, 1997).

1.2 Struktura GCPII

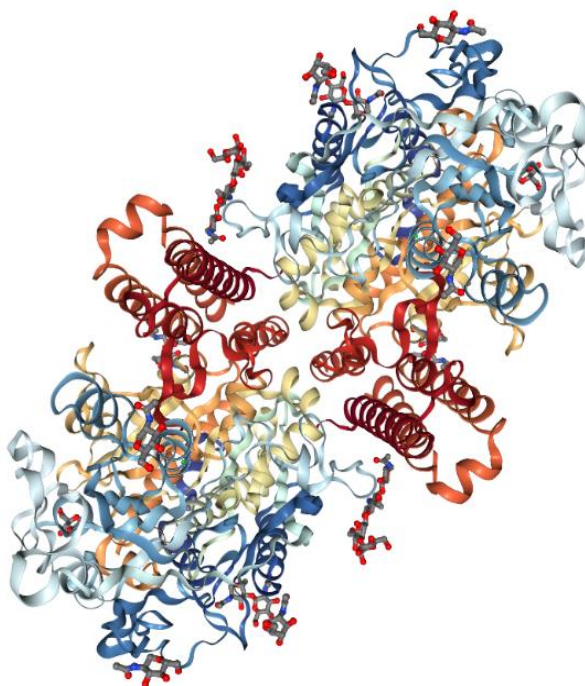
GCPII (Obr. 1) je transmembránový glykoprotein II. typu, jehož polypeptidový řetězec se skládá ze 750 aminokyselin (AMK) a má přibližnou molekulovou hmotnost 94-100 kDa (Israeli *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1995). GCPII vytváří homodimer (Schulke *et al.*, 2003).

a je složen ze tří hlavních částí: krátký cytoplasmatický amino-konec, transmembránová struktura a velká extracelulární část (Su *et al.*, 1995). Extracelulární část se dále skládá ze tří domén: proteasové, apikální a C-koncové domény (Schulke *et al.*, 2003).

Enzym může být glykosylován na deseti N-glykosylačních místech, což je důležité pro jeho aktivitu, stejně jako dva zinečnaté kationty v aktivním místě (Speno *et al.*, 1999; Bařinka *et al.*, 2002; Man *et al.*, 2004). V aktivním místě se dále nachází vápenatý kationt, chloridový aniont zodpovědný za stabilizaci a neutralizaci

v S1 vazebném místě a katalytický Glu424 (Speno *et al.*, 1999; Bařinka *et al.*, 2008). Myří GCPII sdílí 91% podobnost v AMK složení a také NAALADasovou a foláthydrolasovou aktivitu. Na rozdíl od člověka se vřak myří GCPII nenachází v prostatě, nicméně k expresi velkého množství enzymu dochází například v ledvinách (Bacich *et al.*, 2001).

Gen, který kóduje lidskou GCPII, byl označen jako *FOHL1*. Nachází se na 11. chromosomu, konkrétně na pozici 11p11-p12 (Maraj *et al.*, 1998; O'Keefe *et al.*, 1998). Je složen z 19 exonů a 18 intronů a 62 035 párů bází (O'Keefe *et al.*, 1998). U myří je gen pro GCPII lokalizován na 7 chromosomu v pozici 7D1-D2 a nese název *Folh1* (Bacich *et al.*, 2001).



Obr. 1 Struktura lidské glutamátcarboxypeptidasy II bez přítomnosti ligandu. PDB kód: 2OOT, převzato z: <https://www.rcsb.org/structure/2OOT>.

1.3 Substrátová specifita

Aktivní místo je složeno ze dvou částí, S1' a S1 vazebného místa (Speno *et al.*, 1999; Klusák *et al.*, 2009). AMK zbytky, které jsou součástí těchto vazebných míst, určují preferenci k substrátu na základě jeho fyzikálně-chemických vlastností (Bařinka *et al.*, 2007). S1' preferuje substráty s C-koncovým glutamátem (který je součástí NAAG a poly- γ -glutamylovaných folátů). Proto je mnoho inhibitorů odvozeno od struktury NAAG (Mesters *et al.*, 2011). Substráty jsou v S1' vazebném místě stabilizovány díky polárním a van der Waalsovým silám (Bařinka *et al.*, 2007).

S1 vazebné místo je stejně specifické pro substráty s glutamátovým i aspartátovým zbytkem nesoucím negativní náboj. Důvodem je přítomnost kladně nabitých AMK zbytků (Arg534, Arg 536 a Arg463) v S1 (Bařinka *et al.*, 2008). Pro vazbu se substrátem je také důležitý chloridový anion, který je rovněž součástí aktivního místa (Mesters *et al.*, 2011).

1.4 Inhibitory

V minulosti bylo zjištěno, že polyvalentní anionty fosfátu a sulfátu působí jako inhibitory enzymové aktivity GCPII. Jejich aktivita byla posílena využitím chelatačních činidel dvojmocných kovů, jako jsou například soli kyseliny ethylendiamintetraoctové, kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová a o-fenantrolin (Robinson *et al.*, 1987).

Později bylo zjištěno, že účinný inhibitor musí mimo chelatačního činidla obsahovat také glutamátový zbytek, který je důležitý pro navázání inhibitoru k vazebnému místu GCPII (Bařinka *et al.*, 2012). Tato zjištění vedla k vývoji různých skupin selektivních či potencionálních inhibitorů GCPII. Mezi ně patří zejména kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová (2-PMPA), ta obsahuje jak C-koncový glutamát (afinitní k aktivnímu místu), tak fosfonátovou skupinu, která působí jako chelatační činidlo zinečnatých kationů (Jackson *et al.*, 1996; Tsukamoto *et al.*, 2007).

Fosfonátová skupina má však vysokou polaritu a způsobuje tak špatnou orální dostupnost. To byl také důvod, proč musela být fosfonátová skupina nahrazena (Hecker a Erion, 2008). Nakonec došlo k výměně za skupinu thiolovou, a vzniku kyseliny 2-(3-merkaptopropyl)pentandiové (2-MPPA) (Majer *et al.*, 2003). Tento inhibitor byl v klinické studii testován i na lidech. Přestože 2-MPPA neměla žádné nežádoucí účinky na CNS, nebyly prováděny další studie vzhledem k nízké účinnosti inhibice

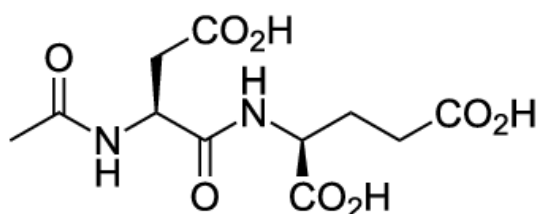
(van der Post *et al.*, 2005). Na základě struktury 2-MPPA byly vyvinuty i další účinnější inhibitory GCPII založené na přítomnosti thiolové a benzenové skupiny (Majer *et al.*, 2006).

Další silné inhibitory GCPII jsou odvozeny od močoviny, ta obsahuje karbamoylovou skupinu vážící zinek (Kozikowski *et al.*, 2001). Tato skupina je analogem NAAG, kdy dvě aminokyselinová residua jsou vazebně spojena s močovinou a váží se na aspartátový i glutarátový zbytek GCPII. Do této skupiny inhibitorů patří například ZJ-43 (Olszewski *et al.*, 2004).

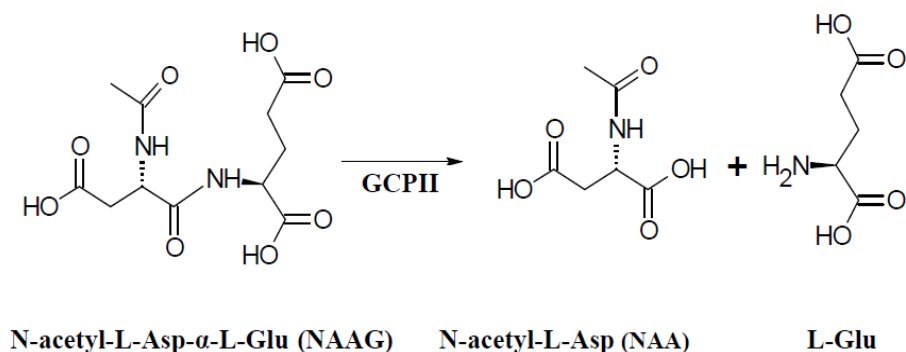
1.5 Fyziologické funkce

1.5.1 Hydrolýza NAAG

Jednou ze známých fyziologických funkcí je tzv. NAALADaseová aktivita zodpovědná za štěpení peptidického neurotransmiteru NAAG (Obr. 2), který se vyskytuje v milimolárních koncentracích v lidském mozku (Neale, Bzdega a Wroblewska, 2000). Při této reakci dochází k uvolnění L-glutamátu a N-acetyl-L-aspartátu (Obr. 3) (Robinson *et al.*, 1987; Slusher *et al.*, 1990). Kumulace volného glutamátu má neurotoxické účinky, proto je inhibice enzymové aktivity GCPII považována za neuroprotektivní (Slusher *et al.*, 1999).



Obr. 2 Struktura N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu, převzato z: (Limpert *et al.*, 2013).

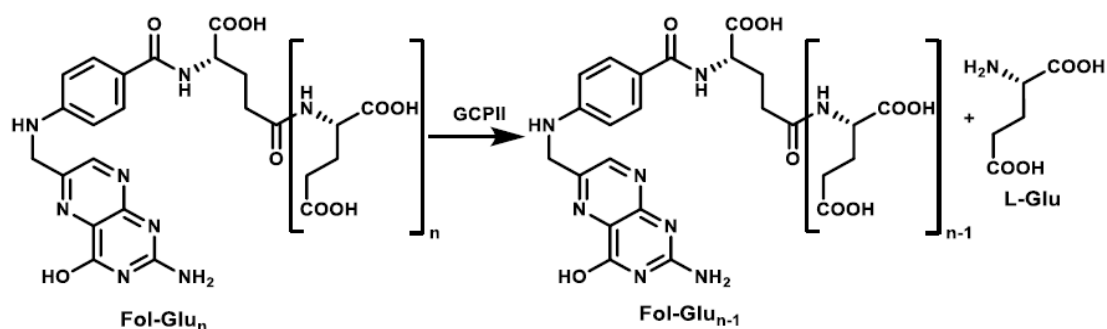


Obr. 3 Hydrolýza N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu na N-acetyl-L-aspartát a L-glutamát převzato a upraveno z: (Adedoyin, 2010).

1.5.2 Hydrolýza polyglutamylovaných folátů

Folát-hydrolasová aktivita GCPII hraje zásadní roli v metabolismu folátu (kyseliny listové) (Halsted *et al.*, 1998). Foláty, které jsou obsaženy v potravinách jsou směsí poly- γ -glutamylovaných folátů, nicméně přes střevní stěnu do krevního řečiště jsou aktivně transportovány pouze mono-glutamylované sloučeniny (Zhao *et al.*, 2009). V tenkém střevě tedy dochází pomocí GCPII k postupnému odštěpení glutamátů za vzniku volného folátu (Obr. 4), který je přes střevní stěnu transportován do buněk, kde je využíván pro jejich vlastní metabolismus (Halsted, 1991; Pinto *et al.*, 1996).

Fyziologická funkce GCPII v prostatě není zatím zcela známá. Hladina tohoto enzymu se však využívá jako marker rakoviny prostaty a jejího vývoje (Bařinka *et al.*, 2012).



Obr. 4 Štěpení poly-gamma-glutamylovaného folátu na volný glutamát katalyzované glutamátcarboxypeptidasou II, převzato z: (Knedlík, 2017).

1.6 Deficit GCPII u myši

Testování GCPII inhibitorů na zvířecích modelech s různým neurologickým poškozením (např. cévní mozková příhoda, traumatické poranění mozku, periferní neuropatie a schizofrenie) vedlo k prokazatelnému zlepšení jejich stavu (snížení excitotoxického poškození mozkové tkáně) (Neale *et al.*, 2011). Potvrdilo se tak, že inhibice funkce GCPII má neuroprotektivní účinky a začalo se uvažovat o inaktivaci *Folh1* genu zodpovědného za expresi GCPII (Bacich *et al.*, 2002; Neale *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2015).

Bacich a kol. ve svých výzkumech popsali mutantní GCPII homozygotní myší modely. U těchto zvířat byly do sekvencí exonů 1 a 2 v genu pro GCPII vloženy stop kodony. Exprese genu *Folh1* byla následně ověřována pomocí metod RT-PCR či Western blot, avšak nebyla prokázána. Při neurologickém testování nebyla pozorována žádná odlišnost v porovnání s wild-type myšimi modely (Bacich *et al.*, 2002, 2005). Bylo však popsáno, že exprese GCPII je důležitá pro embryogenesi. Inaktivace *Folh1* vedla ke ztrátě fenotypu a embryonální letalitě (Tsai *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2015).

V roce 2015 byl publikován další výzkum týkající se inaktivace genu pro GCPII. Mutace byla provedena vystřížením exonů 3-5 v sekvenci *Folh1*. Vývoj myši byl v porovnání s wild-type modely stejný. Inaktivace genu pro GCPII vedla ke snížení doby prostorového učení, a také zlepšila nervovou motoriku u modelů, které prodělaly středně závažné traumatické poranění mozku (Gao *et al.*, 2015).

1.7 Terapeutický cíl

Enzym GCPII je přítomný v prostatické tkáni. Bylo pozorováno, že vývojem karcinomu prostaty se jeho exprese znatelně zvyšuje (Silver *et al.*, 1997). Tento nárůst je také pozorován při rozvoji karcinomu z benigní formy na maligní (Wright *et al.*, 1995) Vzhledem k těmto poznatkům a membránové lokalizaci GCPII se zdá, že je ideálním cílem pro diagnostiku nádorových onemocnění, určování velikosti nádoru a jeho lokalizace, a v neposlední řadě také pro terapii (Bařinka *et al.*, 2012).

Zobrazovací techniky jako je například pozitronová emisní tomografie, magnetická resonance, výpočetní tomografie a fluorescenční zobrazování umožňují neinvazivní detekci a vizualizaci buněčných procesů v živém organismu (Fass, 2008; Weissleder a Pittet, 2008). V těchto metodách jsou využívány látky specifické pro

GCPII, které se dělí do dvou hlavních skupin: GCPII ligandy a anti-GCPII protilátky (ve spojení s radionuklidy). Nevýhodou je, že doposud jediným schváleným zobrazovacím prostředkem U.S. Food and Drug Administration pro rakovinu prostaty je monoklonální protilátka 7E11 (Kahn *et al.*, 1994; Haseman, Reed a Rosenthal, 1996).

Dalším terapeutickým cílem je mozková tkáň (viz. podkapitola 1.5.1). Cílem je vyvinout inhibitory GCPII, které budou biologicky a orálně dostupné.

2 LIPIDY

2.1 Obecná definice a rozdělení

Lipidy jsou velmi různorodou skupinou organických sloučenin, které zahrnují oleje, tuky, hormony a membránové komponenty. Patří zde například mastné kyseliny (MK), cholesterol, estery vyšších MK a alkoholů, jejich deriváty s mastnými kyselinami a další. Jsou nerozpustné nebo omezeně rozpustné ve vodě a velmi dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, např. chloroformu, etheru a benzenu, do kterých mohou být extrahovány z biologického materiálu (Kodíček *et al.*, 2015), (Vodrážka, 2002).

Lipidy obecně dělíme na jednoduché, kam patří MK, acylglyceroly, vosky, isoprenoidy a složené, mezi které jsou zařazeny například fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny (Kodíček *et al.*, 2015).

2.1.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (Obr. 5) jsou primární složkou molekul lipidů. Jedná se o alifatické monokarboxylové kyseliny, které lze získat kyselou hydrolýzou triacylglycerolů (TAG). Pokud MK obsahují více než 10 uhlíkových (C) atomů, označují se jako vyšší MK. MK syntetizované živočichy a rostlinami mají převážně sudý počet C atomů, mohou být nasycené i nenasycené a jejich řetězce bývají nejčastěji nerozvětvené (Kodíček *et al.*, 2015). V přírodě se vyskytují zejména v esterifikované podobě jako hlavní složky lipidů (Voet a Voetová, 1995). Nerozvětvené MK označujeme dvojčísly ($m:n$), kde m je celkový počet C atomů a n označuje počet dvojných vazeb. U nenasycených MK jsou dvojně vazby obvykle v *cis* konfiguraci. Je-li v jednom řetězci MK obsaženo více dvojných vazeb, jsou vždy odděleny jednou CH₂ skupinou (Kodíček *et al.*, 2015). U vyšších rostlin a živočichů převažuje výskyt zbytků MK s 16 a 18 C atomy, a to ve formě vázané, ve volné formě se vyskytují velmi vzácně (Voet a Voetová, 1995).

Do skupiny nejčtetnějších nasycených MK patří kyselina máselná (4:0), kyselina kapronová (6:0), kyselina laurová (12:0), kyselina myristová (14:0), kyselina palmitová (16:0) a kyselina stearová (18:0). Mezi nejvíce zastoupené nenasycené MK řadíme kyselinu olejovou (18:1), kyselinu linolovou (18:2), kyselinu linolenovou (18:3) a kyselinu arachidonovou (20:4). Kyselina olejová (18:1) je složkou většiny acylglycerolů, které jsou obsaženy v přírodních olejích a tucích. Používá se při výrobě mýdel a v kosmetickém průmyslu, jejímž základem je adice dvou vodíkových atomů na dvojnou vazbu kyseliny olejové za vzniku kyseliny stearové, což je proces podstatný pro ztužování kapalných olejů na pevné tuky (Kodíček *et al.*, 2015).

Eikosanoidy (nebo také ikosanoidy) jsou deriváty arachidonové kyseliny, které stejně jako tato kyselina obsahují 20 C atomů. Biologicky významnými skupinami eikosanoidů jsou prostaglandiny, thromboxany a leukotrieny. Jde o tkáňové hormony, z nichž jsou některé zapojeny v alergické reakci (např. leukotrien D₄), dále se podílí na rozvoji zánětu (např. prostaglandiny, tromboxany). Také mohou ovlivňovat vasomotoriku, činnost nervového systému a procesy krevního srážení (Kodíček *et al.*, 2015).

Nenasycené MK jsou zodpovědné za tzv. fluiditu neboli tekutost membrán, která se zvyšuje se zvyšujícím se obsahem nenasycených MK v lipidech. Výrazně tak ovlivňují vlastnosti membrán (Voet a Voetová, 1995).

název kyseliny	počet C : počet dvojných vazeb	poloha dvojných vazeb	hydrofilní hlavička	kyselina kapronová	hydrofobní ocas
mravenčí	1 : 0		HOOC	CH ₂	
octová	2 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₃
propionová	3 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₃
máslná	4 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₃
valerová	5 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
kapronová	6 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
kaprylová	8 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
kaprinová	10 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
laurová	12 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
myristová	14 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
palmitová	16 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
stearová	18 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
olejová	18 : 1; 9		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH=CH CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
linolová	18 : 2; 9,12		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH=CH CH ₂ CH ₂ CH=CH CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
linolenová	18 : 3; 9,12,15		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH=CH CH ₂ CH ₂ CH=CH CH ₂ CH=CH CH ₂ CH ₂ CH ₃
arachidová	20 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
arachidonová	20 : 4; 5, 8, 11, 14		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH=CH CH ₂ CH=CH CH ₂ CH=CH CH ₂ CH=CH CH ₂ CH ₂ CH ₃
behenová	22 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
eruková	22 : 1; 13		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH=CH CH ₂ CH ₂ CH ₃
lignocerová	24 : 0		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
nervonová	24 : 1; 15		HOOC	CH ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH=CH CH ₂ CH ₂ CH ₃

Obr. 5 Příklady přirozeně se vyskytujících mastných kyselin (Koolman a Roehm, 2012).

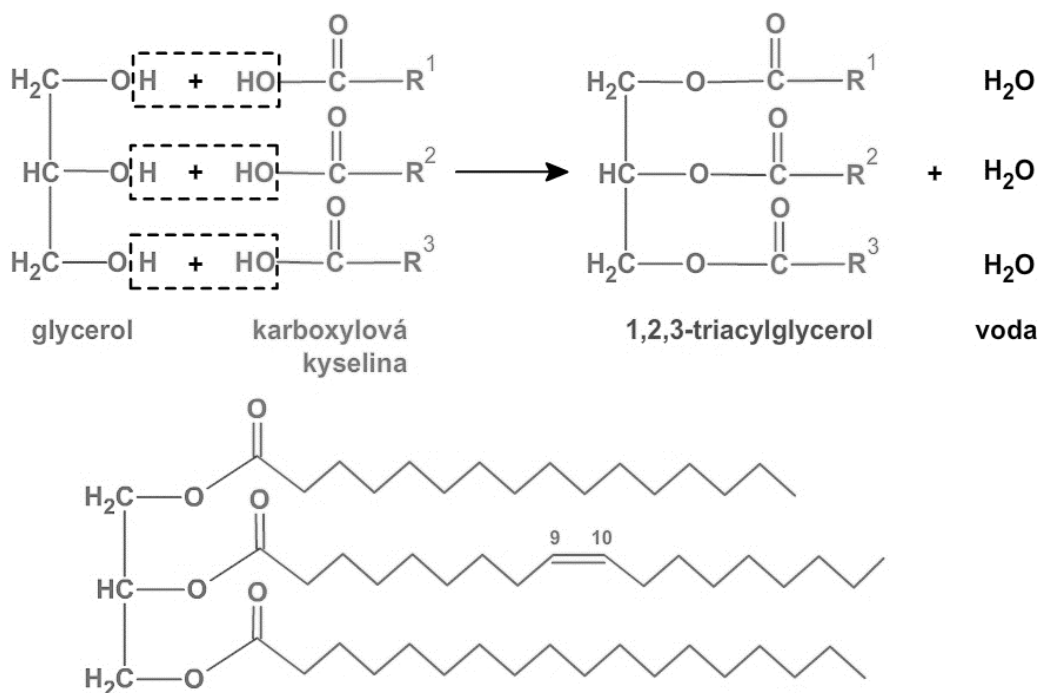
2.1.2 Triacylglyceroly a vosky

Triacylglyceroly, rovněž označovány jako triglyceridy nebo neutrální tuky, jsou ve vodě nerozpustné estery glycerolu a MK (Obr. 6), které jsou až na výjimky nevětvené se sudým počtem C atomů. TAG jsou skladovány v adipocytech. U živočichů jsou důležitou zásobárnou energie a jejich odbourávání a syntéza jsou hormonálně regulovány. Mnoho rostlin ve svých semenech také obsahuje zásobu TAG, a to ve formě rostlinných olejů (Kodíček *et al.*, 2015).

Jednoduché TAG obsahují pouze jeden typ MK, po kterém je daný TAG pojmenován. Příkladem může být například tzv. tristearin, který obsahuje tři zbytky kyseliny stearové. Opakem jednoduchých TAG jsou triglyceridy složené. Vyskytují se častěji a obsahují dva nebo tři různé zbytky MK. Pojmenovány jsou poté podle umístění zbytků MK na glycerolové části (Voet a Voetová, 1995).

Tuky a oleje, lišící se skupenstvím při pokojové teplotě, jsou složitou směsí jednoduchých a složených TAG, jejichž rozdílem je biologický původ. Je známo, že rostlinné oleje obsahují větší množství nenasycených zbytků MK než živočišné (Voet a Voetová, 1995).

Vosky jsou ve vodě nerozpustné, pro živočichy nestravitelné, tuhé estery vyšších MK a vyšších jednosytných primárních alkoholů. Jsou pro ně typické mastné kyseliny s delším C řetězcem (obvykle 16–30 atomů C). Vosky mají ochrannou funkci, slouží jako ochrana před vysycháním a průnikem různých patogenů. Na povrchu rostlin mohou vosky vytvářet ochrannou vrstvu zvanou kutikulu. Hmyz produkuje vosky zejména pro stavbu svého obydlí, například včelí vosk (Kodíček *et al.*, 2015).



Obr. 6 Reakce glycerolu s MK za vzniku triacylglycerolu (Teplá, 20.9.2018).

2.1.3 Polární lipidy

Polární lipidy jsou důležitou skupinou lipidů, které mají amfifilní neboli amfipatický charakter. Ve struktuře je obsažena hydrofobní část, často tvořena dvěma acylovými zbytky, a také hydrofilní složka (Vodrážka, 2002).

Polární lipidy mají vlastnosti tenzidů (snižují povrchové napětí vody). Také mohou vytvářet různé typy micel. S ohledem na chemickou strukturu rozlišujeme polární lipidy dle několika kritérií:

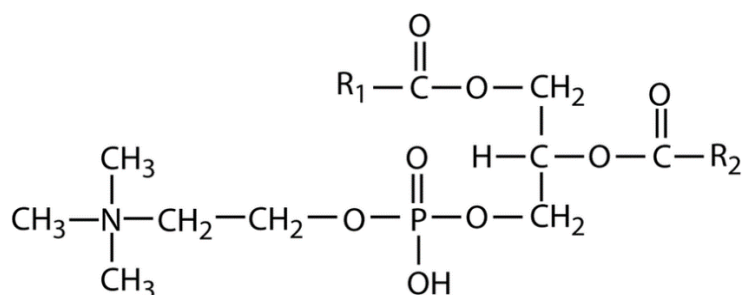
- a) podle alkoholu tvořící základ struktury polárního lipidu – deriváty glycerolu (zejména fosfatidáty), deriváty sfingosinu (sfingolipidy)
- b) zda je součástí molekuly zbytek kyseliny fosforečné (fosfolipidy)
- c) je-li součástí molekuly cukerná složka (glykolipidy)
- d) cholesterol a jeho deriváty (jsou často řazeny mezi polární lipidy díky tomu, že obsahují hydroxylovou skupinu, častěji se však setkáme se zařazením mezi isoprenoidy) (Kodíček *et al.*, 2015).

Polární lipidy, zejména estery kyseliny fosforečné, tvoří základ biologických membrán. Nejčtenější jsou fosfatidylcholin (Obr. 7), fosfatidylserin (Obr. 8), fosfatidylethanolamin (Obr. 9) (Kodíček *et al.*, 2015).

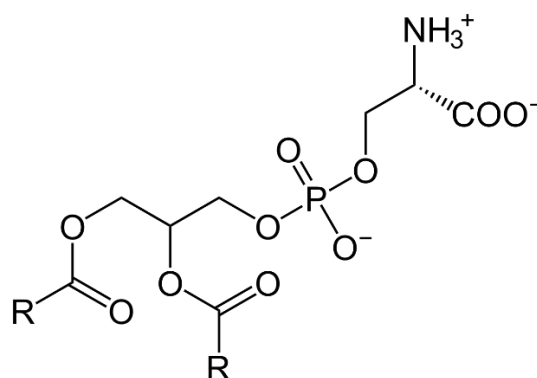
Sfingolipidy jsou hlavní složkou některých membrán, například u mozkových buněk, v míše, ledvinách a vaječném žloutku. Jde o deriváty C₁₈ aminoalkoholů sfingosinu (Obr. 10), dihydrosfingosinu a jejich C₁₆, C₁₇, C₁₉, a C₂₀ homologů. Zbytek vyšší mastné kyseliny může být navázán na C₂ atomu sfingosinu, vzniklý amid se nazývá ceramid (Obr. 11). Na C₁ polohu sfingosinu/ceramidu je připojena hydroxylová skupina, na kterou se mohou napojit polární skupiny - například 1-fosfocholin se váže fosfodiesterovou vazbou za vzniku sfingomyelinu (Obr. 12). Pokud se pomocí glykosidové vazby naváže na hydroxylovou skupinu sacharid, jde o cerebrosidy nebo gangliosidy – zástupci skupiny glykolipidů (Kodíček *et al.*, 2015), (Voet a Voetová, 1995).

Glykolipidy obsahují jeden nebo více monosacharidových jednotek jako polární (hydrofilní) složku, ty jsou na lipidovou část (tvořenou mono- nebo diacylglycerolem, sfingosinem, či ceramidem) připojeny pomocí glykosidové vazby. Mezi nejznámější glykolipidy patří zejména deriváty sfingosinu, neobsahující zbytek kyseliny fosforečné. Podle charakteru cukerné složky se glykolipidy rozdělují dále buď na cerebrosidy nebo na glykosfingolipidy (Vodrážka, 2002).

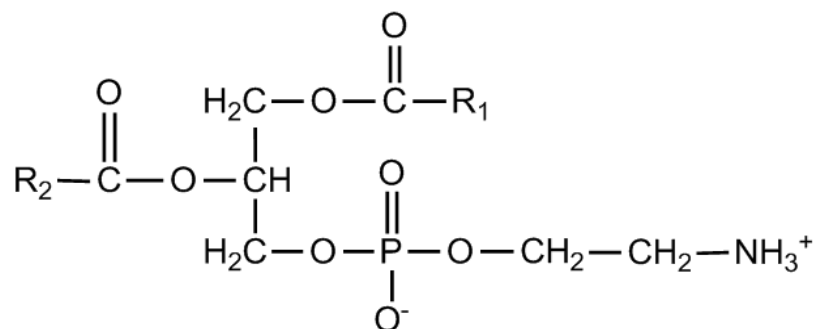
Cerebrosidy obsahují ceramid s MK, či hydroxymastnou kyselinou a jako polární (hydrofilní) část obsahují zbytek monosacharidu vázaný β -glykosidovou vazbou na C₁ ceramidu. Mezi známé cerebrosidy patří galaktocerebrosidy a glukocerebrosidy. Cerebrosidy tvoří z 11 % suchou hmotu mozku, jsou také přítomny v nervové tkáni, kde převládají zejména galaktocerebrosidy. Také je nalezneme v brzlíku, játrech, ledvinách, nadledvinách, plicích a vaječných žlutcích, kde jsou však hojněji zastoupeny glukocerebrosidy. Glykosfingolipidy jsou složitější deriváty ceramidu, které jsou složené z primární alkoholové skupiny sfingosinu, na který se glykosidově váže lineární nebo větvený řetězec oligosacharidu. Ten se nejčastěji skládá z kombinace zbytků glukosy, galaktosy a jejich N-acetylaminoderivátů. Pokud molekula obsahuje jeden nebo více zbytků sialových kyselin získává tak záporný náboj a nazývá se gangliosid. Tento název je odvozen od místa jejich výskytu, což jsou ganglie nervových buněk (Vodrážka, 2002).



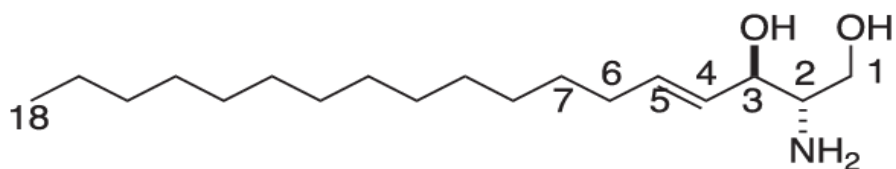
Obr. 7 Struktura fosfatidylcholinu, kde R₁ a R₂ jsou zbytky MK převzato z: (Cansev *et al.*, 2008).



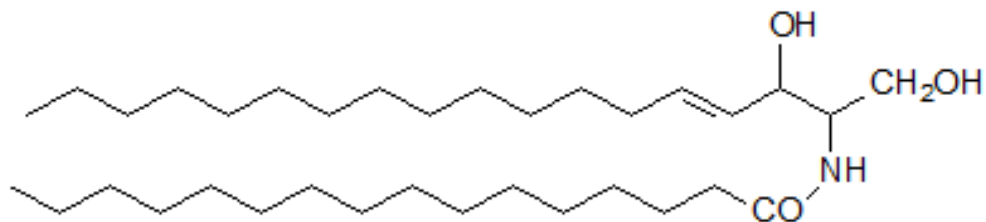
Obr. 8 Struktura fosfatidylserinu, kde R jsou zbytky MK, převzato z: <https://www.pr-inside.com/global-phosphatidylserine-market-professional-surv-r4667918.htm> (15. 12. 2018).



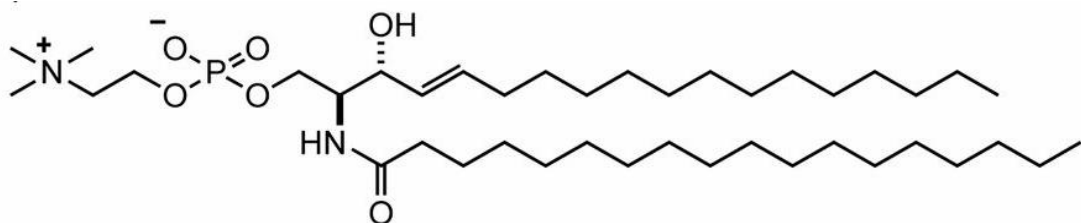
Obr. 9 Struktura fosfatidylethanolaminu, kde R1 a R2 jsou zbytky MK, převzato z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f8/Phosphatidylethanolamine.png> (15. 12. 2018).



Obr. 10 Struktura sfingosinu, převzato z: (Sasaki *et al.*, 2009).



Obr. 11 Struktura ceramidu, převzato z: <http://www.lipidhome.co.uk/lipids/sphingo/ceramide/index.htm> (15. 12. 2018).



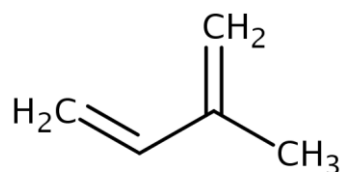
Obr. 12 Struktura sfingomyelinu, převzato z: (Ando *et al.*, 2015).

2.1.4 Isoprenoidy

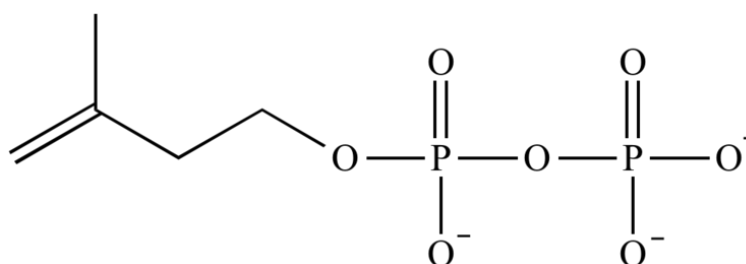
Jedná se o rozsáhlou skupinu biomolekul, kterou řadíme mezi lipidy, které jsou strukturně odvozeny od isoprenu (Obr. 13). Isoprenoidy se vyskytují ve všech typech buněk a v přírodě je jich známo přes 5000. Jsou rozděleny na terpeny a steroidy. Prekursorem biosyntézy těchto molekul je isopentenylidifosfát (Obr. 14). Ten sám vzniká několikasupňovou syntézou z výchozího acetyl-CoA. Isoprenoidy obsahují n -násobek pěti C atomů. Podle n -násobku dělíme isoprenoidy na hemiterpeny, kdy $n=1$ (aktivní isopren), dále monoterpeny ($n=2$; příkladem může být kafr), seskviterpeny ($n=3$), diterpeny ($n=4$), sesterterpeny ($n=5$), triterpeny ($n=6$, například steroidy a cholesterol), tetraterpeny ($n=8$, například karotenoidy) a nakonec polyterpeny, kdy $n = 10$ až 10 000, příkladem může být přírodní kaučuk. Isoprenoidní biomolekuly mohou být součástí větších biologicky aktivních molekul (chlorofyl, ubichinon, vitamín E a K atd.) (Kodíček *et al.*, 2015).

Z biochemického hlediska je u živočichů nejvýznamnější cholesterol (Obr. 15), který řadíme mezi steroidy díky jeho cyklickému skeletu, odpovídající uhlovodíku steranu. Díky tomu, že obsahuje -OH skupinu jej řadíme také mezi steroly a polární lipidy. Je také prekursorem biosyntézy steroidních hormonů. Cholesterol je u člověka syntetizován skoro ve všech tkáních (nejvíce v játrech). Je obsažen v buněčných membránách a krevních lipoproteinech. Vyskytuje se jak volný, tak ve formě esterů. Díky své struktuře má cholesterol větší pevnost než jiné membránové lipidy, snižuje fluiditu membrán a jejich propustnost pro malé molekuly a je tedy látkou určující vlastnosti membrán. Cholesterol je hojně zastoupen také v lipoproteinech krevní plasmy, kde je ze 70 % esterifikován mastnými kyselinami za vzniku cholesterol-esterů (Voet a Voetová, 1995), (Kodíček *et al.*, 2015).

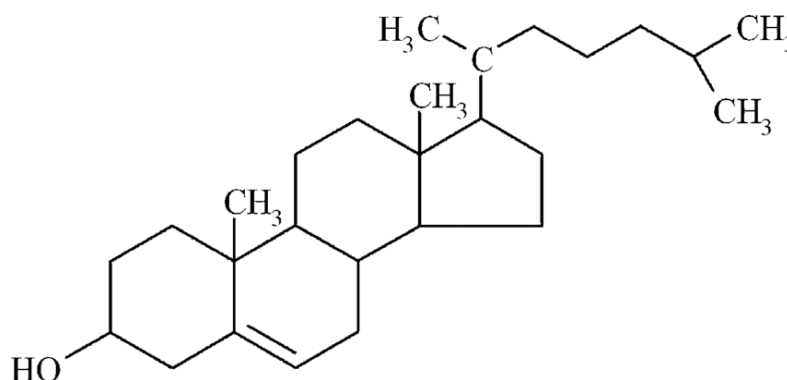
Biodegradace cholesterolu probíhá v játrech za vzniku žlučových kyselin, které poté žlučí putují do dvanáctníku, kde napomáhají při trávení jako emulgátory lipidů. Na druhé straně se cholesterol může účastnit řady patologických procesů, např. vzniku aterosklerózy, tvorby žlučových kamenů aj. (Kodíček *et al.*, 2015).



Obr. 13 Struktura isoprenu, převzato z: <https://www.sielc.com/isoprene.html> (15. 12. 2018.)



Obr. 14 Struktura isopentenyldifosfátu, převzato z: <https://alchetron.com/Isopentenyl-pyrophosphate> (15. 12. 2018).



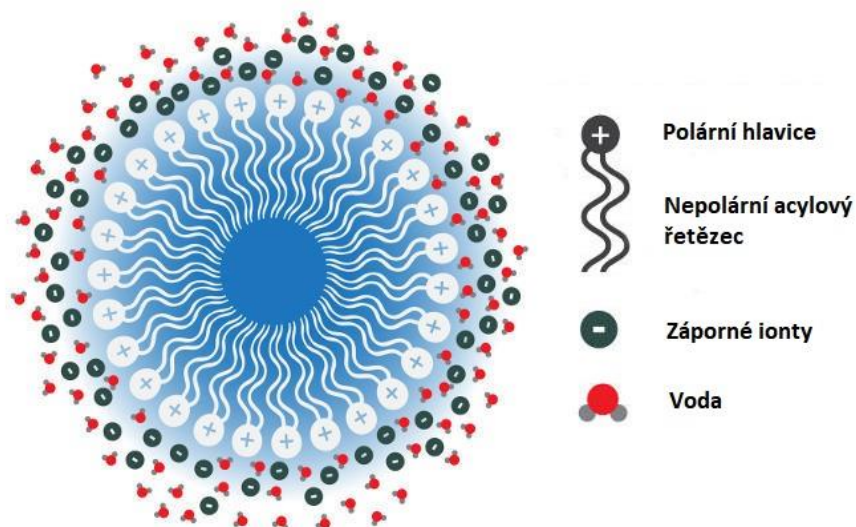
Obr. 15 Struktura cholesterolu, převzato z: (Raczyński *et al.*, 2006).

2.2 Biologická funkce lipidů

Lipidy plní v organismu několik důležitých funkcí. Jsou důležitou rezervou a bohatým zdrojem energie (u živočichů v podobě podkožního tuku, u rostlinných semen a plodů ve formě rostlinných olejů) a uhlíku pro syntézu buněčných komponent. Při odbourávání lipidů organismus získá mnohem více energie než v případě sacharidů či proteinů. Neméně důležitá je jejich strukturní funkce, kdy jsou složeny polární lipidy základem biologických membrán (viz níže). Také můžeme zmínit funkci ochrannou, kdy tuková tkáň tepelně a mechanicky izoluje organismus. U rostlin se vyskytuje

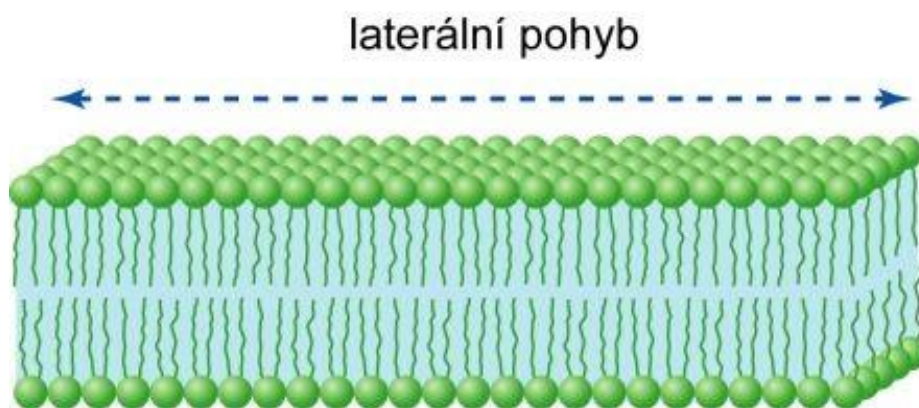
například vrstva vosku na povrchu listů, která zabraňuje nechtěné transpiraci a také průniku patogenů. Funkci regulační zprostředkovávají zejména steroidní hormony, eikosanoidy, vitaminy A, D, E a K, a další (Kodíček *et al.*, 2015).

Velká část biologicky významných lipidů se agreguje do makromolekulárních struktur, jako jsou například micely (Obr. 16) či biologické membrány. Je typické, že polární konec lipidové molekuly směřuje do vodného prostředí (hydrofilní část), zatímco nepolární acylové skupiny vytváří hydrofobní jádro. Takovéto agregáty mají tudíž specifické biofyzikální vlastnosti a povrchové chemické vlastnosti. Studium struktury a zároveň detailní charakterizace enzymové kinetiky lipas, lipidových kinas a lipidových fosfatů (většinou rozpustné enzymy) názorně ukazuje, jak jsou jejich často ve vodě nerozpustné substráty (lipidy) rozpoznávány a metabolizovány. Tzv. „mezifázová katalýza“ vyžaduje selektivní zacílení a navázání enzymu na povrch molekuly lipidu a efektivní rozeznání o jaký substrát se jedná. Takový povrch molekuly lipidu je chemicky v kontrastu s mechanismem enzymu, který reaguje s rozpustnými substráty a proto je třeba věnovat pozornost úsilí, které je zaměřené na farmakologické cílení lipidových enzymů (Wenk, 2005).



Obr. 16 Fosfolipidová micela převzato a upraveno podle: <https://stock.adobe.com/lv/images/cationic-micelle-infographics-layer-of-charged-monomers-counter-ions-and-water-molecules/125014150> (20. 1. 2019).

Jak je výše napsáno, některé lipidy (fosfolipidy) mají tendenci samovolně se organizovat a vytvářet dvojvrstvu (Obr. 17), to se děje díky jejich amfifilnímu charakteru. Polární skupiny interagují nekovalentně s molekulami vody (pomocí vodíkových můstků a elektrostatických interakcí). Hydrofobní řetězce naopak tvoří nepolární vrstvu. Dvojvrstva je dvojrozměrný útvar, který má tloušťku zhruba 6 až 10 nm a je základem všech biologických membrán oddělujících od sebe jednotlivé prostory tzv. kompartmenty (buňky od okolí, orgány od cytosolu a další). K lipidové dvojvrstvě patří také proteiny, které jsou různými způsoby k dvojvrstvě připojeny, a jež zajišťují specifické funkce těchto komplexních nadmolekulových struktur. Lipidovou dvojvrstvu lze brát jako dvojrozměrnou kapalinu, kdy za fyziologických teplot nemají lipidy pevné místo, nicméně se ve své vrstvě mohou volně pohybovat, tomuto se říká laterální pohyb. Lipid také není omezen v rotačním pohybu ani v přirozeném vlnivém pohybu dlouhých uhlovodíkových řetězců. Lipidové složení biologických membrán je velmi pestré. Významným znakem biomembrán je asymetrické složení obou vrstev (Kodíček *et al.*, 2015).

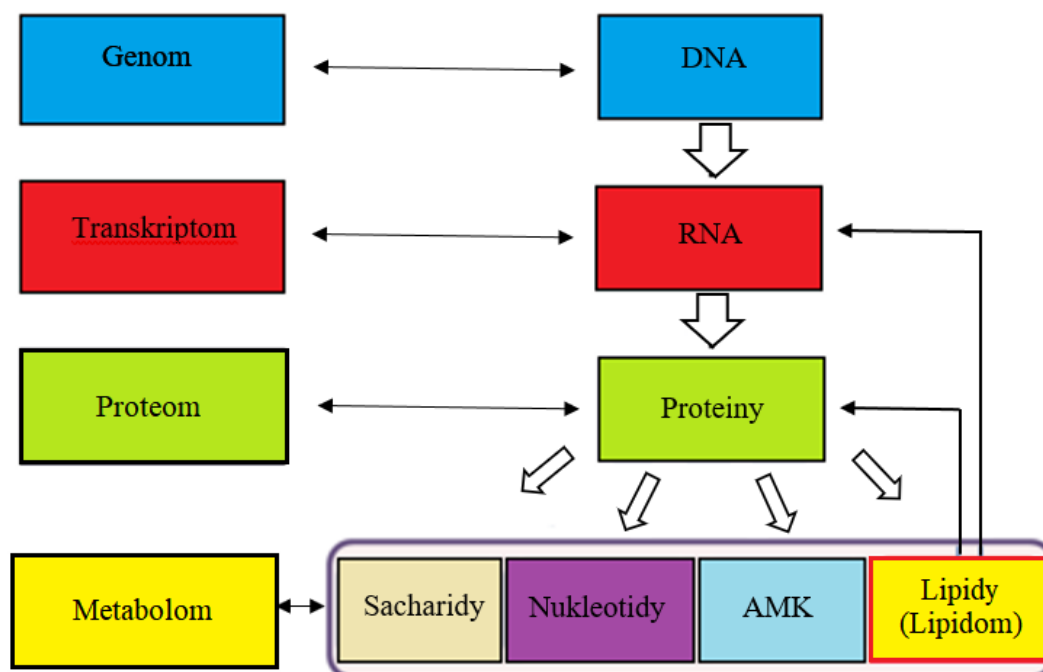


Obr. 17 Fosfolipidová dvojvrstva, převzato a upraveno podle:
http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/bc/Lipidy_membrany_transport.pdf (20. 1. 2019).

3 LIPIDOMIKA

Lipidy jsou základní složkou biologických membrán a důležitým produktem metabolismu, hrají tak zásadní roli v živých systémech (viz kapitola 2). Lipidová nerovnováha byla popsána ve spojení s různými patofyziologickými stavy, jako jsou například rakovina, diabetes, neurodegenerativní a infekční onemocnění (Zhao *et al.*, 2014).

Lipidomika se zabývá analýzou lipidů, resp. lipidomu (Obr. 18). Lipidom je soubor všech lipidů nacházejících se v buňce, biologických tekutinách, tkáních, či v organismu. Lipidomika je odvětvím metabolomiky (Wenk, 2005). Slouží pro studium biochemie lipidů za fyziologického a patologického stavu organismu, hledání nových klinických biomarkerů, diagnostice onemocnění, sledování známých biomarkerů a účinnosti farmakoterapie (Zhao *et al.*, 2014). Také slouží jako důležitý nástroj přispívající k pochopení funkce lipidů v biologických systémech (Wenk, 2005).



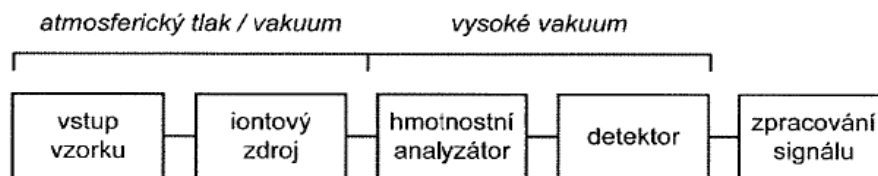
Obr. 18 Obecné schéma vztahu mezi lipidomem, genomem, transkriptomem, proteomem a metabolomem, převzato a upraveno podle: https://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics#/media/File:Metabolomics_schema.png (25. 4. 2019).

Lipidomická analýza se dělí na dvě skupiny: cílenou a necílenou. Cílenou lipidomickou metodou jsou detekovány předem vybrané skupiny či jednotliví zástupci lipidů. Necílená lipidomická analýza na rozdíl od cílené měří všechny detekovatelné analyty ve vzorku, a to chemicky známé i neznámé (Cajka a Fiehn, 2016). Měření probíhá v určitém rozmezí m/z (Roberts *et al.*, 2012). Diskriminující analyty jsou identifikovány zpětně pomocí fragmentace.

Prvním krokem je příprava vzorku, která zahrnuje extrakci lipidů do organické fáze, extrakcí jsou vzorky zároveň deproteinovány. Dále může být provedena derivatizace, která se využívá pro zlepšení separačních, či detekčních vlastností. Druhým krokem je analýza lipidů za pomoci separačních a spektrálních metod (Wenk, 2005). Mezi separační techniky, které se používají v lipidomice, patří zejména kapalinová chromatografie, dále také plynová chromatografie, kapilární elektroforéza a superkritická fluidní chromatografie (Wenk, 2005). Nejhojněji využívanými spektrálními metodami (díky vysokému rozlišení) jsou zejména hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetická rezonance (Cajka a Fiehn, 2016). Po samotné analýze je získán lipidový profil, což je hmotnostní spektrum udávající složení a hojnost výskytu jednotlivých lipidů, které vzorek obsahuje. Následuje identifikace lipidů za využití databází (Boiteau *et al.*, 2018). Získaná data jsou dále statisticky zpracována.

4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie je technikou, která převádí zkoumaný vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty dále separuje dle hodnoty m/z (podíl hmotnosti a náboje iontu). Tato technika je založená na interakci vzniklých iontů s elektrickým či magnetickým polem v prostředí vakua ($10^{-4} - 10^{-8}$ Pa). Používá se jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu. Všechny hmotnostní spektrometry mají tři základní části, kterými jsou iontový zdroj, analyzátor a detektor částic (Obr. 19). (Klouda, 2003), (Friedecký a Lemr, 2012).



Obr. 19 Schéma hmotnostního spektrometru, převzato z: (Záruba *et al.*, 2016).

4.1 Instrumentace

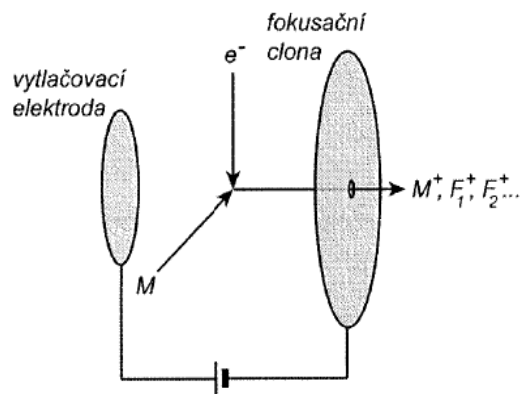
4.1.1 Iontový zdroj

Díky iontovému zdroji dochází ke vzniku elektricky nabitých částic (iontů) v plynné fázi. Molekuly analytu mohou být ionizovány za vzniku kladně či záporně nabitých molekulárních (M^+ , M^-) a aduktových iontů ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+CH_5]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ apod. U méně stabilních látek mohou vznikat fragmenty ionizované molekuly. Ionizační techniky rozdělujeme na tvrdé a měkké, a to podle množství dodané energie při ionizaci (Friedecký a Lemr, 2012).

4.1.1.1 Elektronová ionizace

Elektronová ionizace (Obr. 20) se řadí do skupiny tvrdých ionizačních technik. Principem je přenos energie elektronů emitovaných z katody molekulám analytu. Tímto typem ionizace získáme kladně nabitý radikál molekuly a jeho bohaté fragmentační spektrum (Záruba *et al.*, 2016). Nadbytek energie však může vést k úplnému rozpadu molekulového iontu, a tudíž ke ztrátě informace o molekulové hmotnosti. Problém je řešitelný použitím měkké ionizační techniky (např. chemické ionizace) (Friedecký a Lemr, 2012).

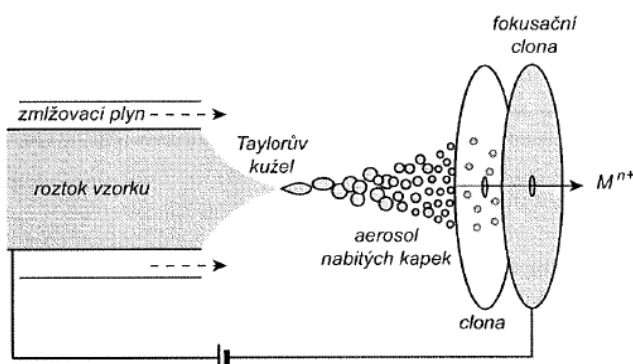
Při použití elektronové ionizace je nutno dbát na dostatečnou těkavost látky, případně je vhodné analyt derivatizovat, což však může vést ke zhoršení analytických parametrů, zejména u kvantitativních metod (Friedecký a Lemr, 2012), (Záruba *et al.*, 2016).



Obr. 20 Schéma děje probíhajícího při elektronové ionizaci, převzato z: (Záruba *et al.*, 2016).

4.1.1.2 Elektrosprej

Jednou z metod ionizace, která se používá pro analýzu nízko i vysokomolekulárních látek v biologických vzorcích, je ionizace elektrosprejem (ESI) (Obr. 21). Dovoluje ionizaci středně polárních molekul po ionty. Principem je aplikace silného elektrického pole na elektrodu (napětí 2-5 kV) za atmosférického tlaku (1013,25 hPa). Na hrotu elektrody/kapiláry, do které vstupuje roztok, dochází k tvorbě nabitých kapiček aerosolu. Rozpouštědlo je v krátkém čase z těchto kapiček odpařováno, a to proudem plynu o vyšší teplotě. Povrchový náboj kapiček vzrůstá, v určitém okamžiku je překonán Coulombickým odpuzováním a dojde k explozi nabitě kapky. Nabité ionty se uvolňují z povrchu kapičky do plynné fáze. Nevýhodou ESI je iontová suprese, kterou lze eliminovat separací analytu od složek snižující iontový výtěžek (Friedecký a Lemr, 2012), (Záruba *et al.*, 2016).



Obr. 21 Schéma elektrospreje, převzato z: (Záruba *et al.*, 2016).

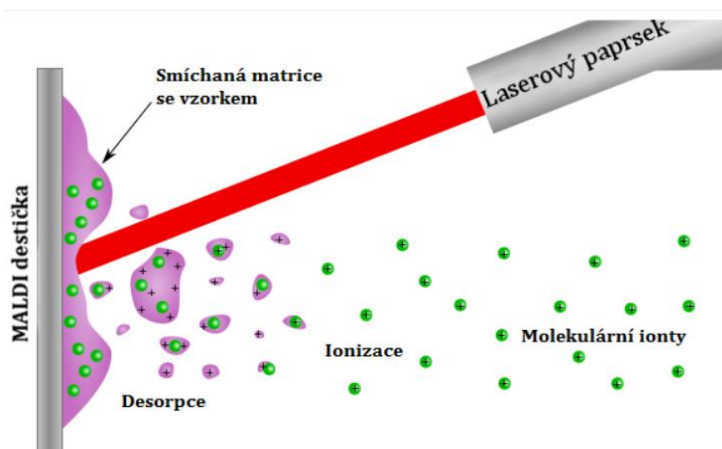
4.1.1.3 MALDI

MALDI, neboli desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) se využívá zejména pro analýzu proteinů a jiných makromolekul. Analyt je obvykle před ionizací smíchán s organickou kyselinou (matricí), jejíž důležitou vlastností je snadná absorpce energie laseru. Celý proces probíhá za podmínek vakua (Friedecký a Lemr, 2012).

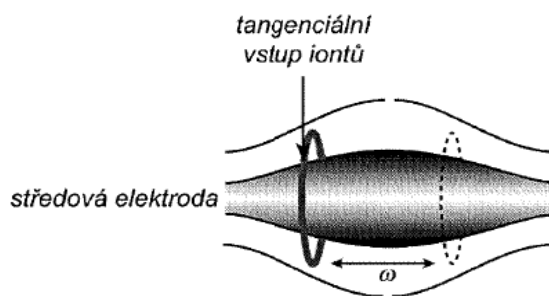
Proces (Obr. 22) je zahájen krátkým, intenzivním pulsem laseru. Laser zapříčiní zahřátí a uvolnění matrice s analytem. Ionizované molekuly matrice předávají náboj molekulám analytu, které pak následně pokračují k analyzátoru (Dass, 2007).

4.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor je klíčovou součástí hmotnostního spektrometru, jeho úkolem je separovat ionty na základě m/z v prostředí vakua. Hmotnostní analyzátoři se dělí do několika skupin. První skupinou jsou skenující analyzátoři, které kontinuálně separují ionty a ty s určitou hodnotou m/z vysílají k detektoru. Patří zde například kvadrupólové analyzátoři a sektorové přístroje. Další skupinou jsou analyzátoři, které separují ionty na základě doby letu letovou trubicí směrem k detektoru (průletové analyzátoři TOF – Time of Flight). Poslední skupinou jsou analyzátoři zachycující ionty v tzv. cele, či pasti (iontové pasti, iontově cyklotronová rezonance, elektrostatická iontová past - orbitrap). Orbitrap (Obr. 23) a iontově cyklotronová rezonance, mají analyzátor a detektor v jedné měřící cele a využívají Fourierovy transformace (Friedecký a Lemr, 2012).



Obr. 22 Proces ionizace (MALDI), převzato a upraveno podle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maldi.svg> (1.5.2019).

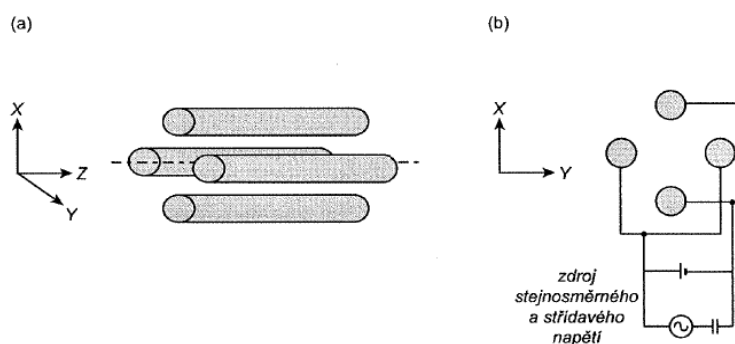


Obr. 23 Schéma orbitrapu, převzato z: (Záruba *et al.*, 2016).

4.2.1 Kvadrupól

Jedním z nejvíce rozšířených hmotnostních analyzátorů je kvadrupól, kdy je trajektorie iontů ovlivněna působením stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí, připojeného na kombinaci čtyř vzájemně rovnoběžných tyčových elektrod (Obr. 24). Elektrody jsou symetricky umístěné kolem osy trajektorie iontů a tyče naproti sobě mají vždy stejnou polaritu (Klouda, 2003), (Friedecký a Lemr, 2012), (Záruba a kol, 2016).

Velikost stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí se mění v čase. Jejich velikostí je určeno, které ionty (s danou hodnotou m/z) se budou pohybovat po stabilní dráze až k detektoru. Podle povahy analýzy lze využít měření ve skenujícím režimu nebo použijeme selektivní záznam iontu. V prvním případě dochází ke změně skenované veličiny (elektrické napětí - U , záporný potenciál - V , magnetická indukce - B), v jejíž závislosti jsou propouštěny ionty o určité m/z . Elektrické pole se plynule mění a je tak umožněno proměřit všechny hodnoty m/z iontů v krátkém čase, avšak na úkor citlivosti. V druhém případě je umožněn průchod pouze iontům o dané hodnotě m/z (Dass, 2007; Gross, 2011).



Obr. 24 Uspořádání tyčí kvadrupólu: a) čerchovaně vyznačena osa kvadrupólu, která je zároveň osou trajektorie iontů, b) společné zapojení dvou protilehlých tyčí, převzato z: (Záruba *et al.*, 2016).

4.3 Detektor

V moderních typech detektorů se energie dopadajících iontů přeměňuje na elektrický signál, který je digitalizován, zaznamenán a zpracován pomocí počítače (Záruba *et al.*, 2016). Detektory se obecně dělí podle schopnosti zaznamenávat ionty. Prvním typem jsou detektory zaznamenávající ionty nezávisle na hodnotě m/z . Při srážce iontu a dynody dochází ke vzniku elektrického proudu, který je zesilován pomocí násobičů a detektorem přímo monitorován. Druhým typem detektorů je možno zaznamenat i vztah iontu k hodnotě m/z . Zde patří například orbitrap a iontově cyklotronová rezonance, pomocí kterých se ionty zaznamenávají jako proudový obraz všech iontů s odlišnými hodnotami m/z . Signál je poté zpracován Fourierovou transformací (Friedecký a Lemr, 2012).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 MATERIÁL

5.1 Chemikálie a roztoky

Acetonitril (ACN), voda a methanol (MeOH) byly v LC-MS kvalitě zakoupeny od firmy Honeywell, USA. Isopropylalkohol (IPA) a kyselina octová byly v LC-MS kvalitě zakoupeny od firmy Fluka, USA. Methyl-terc-butyl ether (MTBE) a hydroxid amonný byly v LC-MS kvalitě zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, USA.

5.2 Přístroje

Centrifuga Sigma 3 16KL (Osterode am Harz, Německo), třepačka Biosan, typ PST60HL plus Thermo Shaker, (Riga, Lotyšsko), lyofilizátor (Christ Alpha 2-4 LO Plus), HPLC systém Dionex Ultimate 3000 RS (Sunnyvale, Kalifornie, USA), tandemový hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA), vortex (V-1 plus; Biosan, Riga, Lotyšsko).

5.3 Biologický materiál

Pro cílenou lipidomickou analýzu bylo použito 152 vzorků plasem myši (s genotypem GC57BL/6NCrl) odlišného stáří, pohlaví a mutace (Tab. 1). Vzorky byly získány ve spolupráci s 1. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy. Jako del17 jsou označeny vzorky od transgenních myši s delecí 17 bp a del4 s delecí 4bp v 11. exonu genu *Folh1*. V textu jsou slovem či písmenem DEL (D) označeny myši s delecí v genu *Folh1* a WT (W) jsou označeny kontroly. Mladé myši jsou označeny písmenem „Y“ z angl. young a staré „O“ z angl. old. Samičky jsou označeny písmenem „F“ z angl. female, samečci písmenem „M“ z angl. male.

Tab. 1 Popis vzorků plasem získaných od myši rozdílného pohlaví, typu delece a stáří (F-female-samička, M-male-sameček, O-old-starý, Y-young-mladý, WT - kontroly).

Pohlaví	Typ vzorku	Stáří	
		Týdny	Označení
F	del17	8,3	Y
F	del17	8,3	Y
F	del17	8,3	Y
F	del17	8,3	Y
F	del17	8,4	Y
F	del17	8,4	Y
F	del17	8,4	Y
F	del17	8,4	Y
F	del17	8,4	Y
F	del17	8,4	Y
F	del17	8,6	Y
F	del17	8,9	Y
F	del17	9,4	Y
F	WT	8	Y
F	WT	8,1	Y
F	WT	8,3	Y
F	WT	8,3	Y
F	WT	8,4	Y
F	WT	8,6	Y
F	WT	8,6	Y
F	WT	8,9	Y
F	WT	9,4	Y
F	WT	9,4	Y
F	WT	9,6	Y
F	WT	9,7	Y
F	WT	9,7	Y
F	del17	70,9	O
F	del4	69,7	O
F	del4	69,7	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,1	O
F	del4	70,3	O
F	del4	70,6	O
F	del4	70,6	O
F	del4	70,6	O
F	del4	70,6	O
F	del4	70,6	O
F	del4	70,6	O
F	del4	70,6	O
F	del4	70,6	O
F	del4	71	O

Tab. 1 Popis vzorků plasem získaných od myši rozdílného pohlaví, typu delece a stáří (F-female-samička, M-male-sameček, O-old-starý, Y-young-mladý, WT - kontroly *(pokračování)*).

Pohlaví	Typ vzorku	Stáří	
		Týdny	Označení
F	del4	71	O
F	del4	71	O
F	del4	71,4	O
F	del4	71,4	O
F	del4	71,4	O
F	del4	71,4	O
F	del4	71,4	O
F	del4	71,4	O
F	WT	69,4	O
F	WT	69,6	O
F	WT	69,9	O
F	WT	69,9	O
F	WT	69,9	O
F	WT	69,9	O
F	WT	70	O
F	WT	70	O
F	WT	70,1	O
F	WT	70,1	O
F	WT	70,1	O
F	WT	70,3	O
F	WT	70,3	O
F	WT	70,3	O
F	WT	70,6	O
F	WT	70,6	O
F	WT	70,6	O
F	WT	70,6	O
F	WT	70,6	O
F	WT	70,7	O
F	WT	71	O
F	WT	71,4	O
F	WT	71,4	O
F	WT	71,4	O
F	WT	71,4	O
F	WT	71,4	O
F	WT	71,9	O
M	del17	8,1	Y
M	del17	8,3	Y
M	del17	8,3	Y
M	del17	8,3	Y
M	del17	8,3	Y
M	del17	8,4	Y
M	del17	8,4	Y
M	del17	8,4	Y
M	del17	8,4	Y
M	del17	8,4	Y
M	del17	8,4	Y
M	del17	8,4	Y
M	del17	8,4	Y
M	WT	8,0	Y

Tab. 1 Popis vzorků plasem získaných od myši rozdílného pohlaví, typu delece a stáří (F-female-samička, M-male-sameček, O-old-starý, Y-young-mladý, WT - kontroly (*pokračování*)).

Pohlaví	Typ vzorku	Stáří	
		Týdny	Označení
M	WT	8,0	Y
M	WT	8,1	Y
M	WT	8,1	Y
M	WT	8,1	Y
M	WT	8,1	Y
M	WT	8,3	Y
M	WT	8,4	Y
M	WT	10,9	Y
M	WT	10,9	Y
M	WT	10,9	Y
M	del17	63,7	O
M	del17	77,7	O
M	del17	78,0	O
M	del17	78,0	O
M	del3	66,6	O
M	del3	69,9	O
M	del3	70,1	O
M	del3	71,1	O
M	del3	80,9	O
M	del4	66,7	O
M	del4	70,1	O
M	del4	70,1	O
M	del4	70,1	O
M	del4	70,6	O
M	del4	70,6	O
M	del4	70,6	O
M	del4	74,6	O
M	del4	80,9	O
M	WT	63,4	O
M	WT	66,9	O
M	WT	69,9	O
M	WT	69,9	O
M	WT	69,9	O
M	WT	69,9	O
M	WT	70,1	O
M	WT	70,1	O
M	WT	70,1	O
M	WT	70,1	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,6	O
M	WT	70,7	O
M	WT	70,7	O

Tab. 1 Popis vzorků plasem získaných od myši rozdílného pohlaví, typu delece a stáří (F-female-samička, M-male-sameček, O-old-starý, Y-young-mladý, WT - kontroly *(pokračování)*).

Pohlaví	Typ vzorku	Stáří	
		Týdny	Označení
M	WT	71,1	O
M	WT	71,1	O
M	WT	74,4	O
M	WT	74,9	O
M	WT	77,7	O
M	WT	77,9	O
M	WT	78,0	O
M	WT	78,0	O
M	WT	78,0	O
M	WT	78,0	O
M	WT	78,0	O
M	WT	78,0	O
M	WT	80,3	O
M	WT	80,3	O
M	WT	80,9	O

5.4 Příprava vzorků

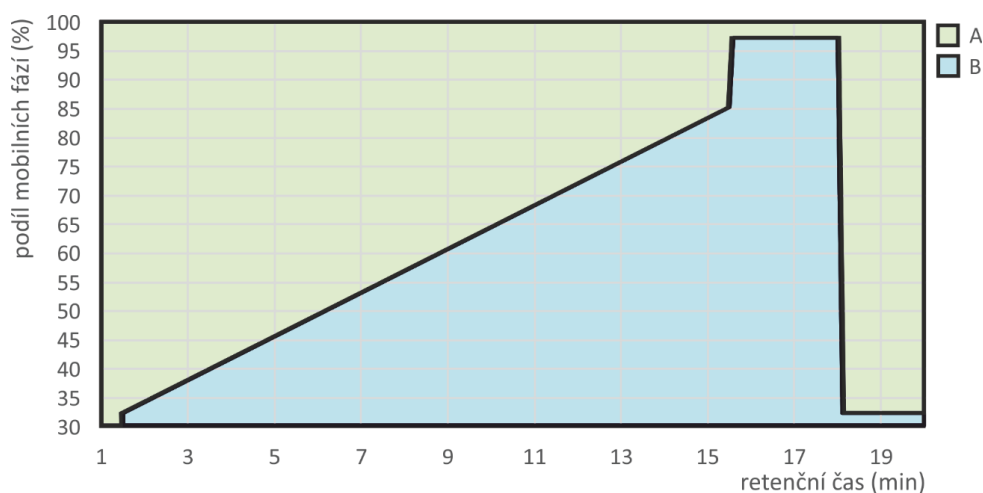
Do mikrozkušavek bylo odebráno 20 μl plasmy a k ní bylo přidáno 160 μl roztoku MTBE/MeOH (5:1). Všechny 152 takto připravených vzorků bylo za laboratorní teploty třepáno po dobu 1 hodiny. Do každé mikrozkušavky bylo dále přidáno 40 μl LC-MS vody a vzorky byly opět třepány po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byly centrifugovány 10 minut při 4 °C (14 000x g). Následně bylo 100 μl horní organické vrstvy odpipetováno a lyofilizováno (přes noc). Lyofilizát byl dále rozpuštěn v 50 μl roztoku IPA/ACN/H₂O (2:1:1). Nakonec byl připraven vzorek kontroly kvality (QC), a to odebráním 4 μl z každého vzorku. Tento vzorek byl během analýzy opakovaně nastříkovan a sloužil tak jako kontrola reprodukovatelnosti měření. Postup přípravy blanku byl stejný, místo samotného vzorku však byla použita LC-MS voda.

6 METODY

6.1 Cílená lipidomická analýza

Cílená lipidomická analýza byla provedena za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS systém).

Separace probíhala v HPLC systému Ultimate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) na koloně BEH C8 (2,1 mm x 100 mm, 1,7 μm), která byla vyhřívána na 55 °C. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,35 ml·min⁻¹. Průběh gradientové eluce je uveden na Obr. 25. Mobilní fázi A byl roztok ACN:H₂O, připravený v poměru 6:4. Mobilní fázi B tvořil roztok ACN:IPA v poměru 9:1. Ke každé mobilní fázi byl přidán roztok octanu amonného k dosažení konečné koncentrace 10 mmol·l⁻¹. Měření probíhalo na tandemovém hmotnostním spektrometru Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA) v pozitivním i negativním módu s randomizovaným pořadím vzorků. Nástřík vzorků byl 5 μl . Metoda byla převzata a upravena podle (Xuan *et al.*, 2018). Data byla dále zpracována softwarem MultiQuantTM 3.0 (AB Sciex, Framingham, MA, USA).



Obr. 25 Průběh gradientové eluce. Na začátku analýzy byl podíl mobilní fáze A 68 % a mobilní fáze B 32 %, tento stav trval do 1,5 minuty. Poté došlo k lineárnímu zvýšení obsahu mobilní fáze B na 85 %. V 15,6 minutě následovalo navýšení mobilní fáze B až na 97 %, tento stav byl konstantní až do 18 minuty. V 18,1 minutě došlo ke snížení obsahu mobilní fáze B na 32 % až do konce analýzy.

6.2 Statistická analýza

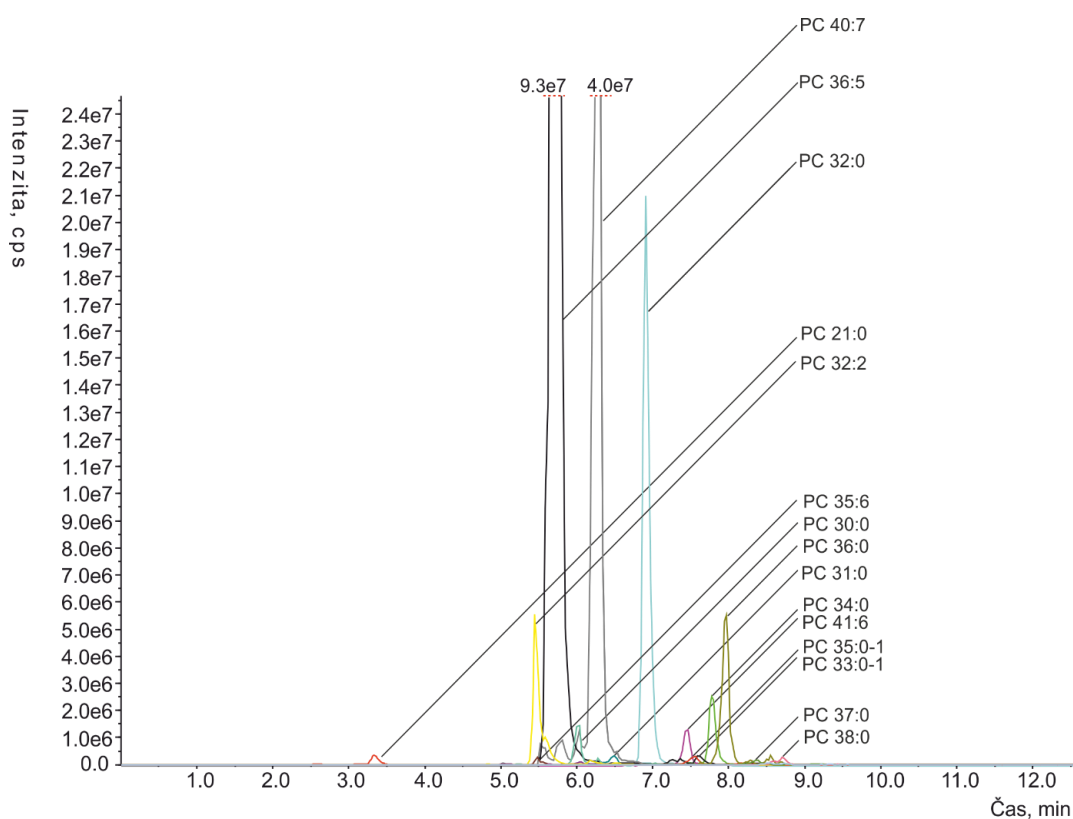
Data získána cílenou lipidomickou analýzou byla zpracována za pomoci R-programu verze 3.2.1 (www.r-project.org). K odstranění systémové chyby byla provedena interpolace dat metodou LOESS (z angl. locally weighted regression). Dále byl u QC vzorků vypočítán variační koeficient. Lipidy s variací QC nad 30 % byly z dalšího vyhodnocování vyřazeny. Zbylá data byla podrobena tzv. clr transformaci (centred logratio) a centrována na nulu (Karlíková *et al.*, 2017). Mezi grafické výstupy patřila analýza hlavních komponent (PCA), supervizovaná ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (OPLS-DA), vulkánové a krabicové grafy.

Nesupervizované statistické metody, mezi které se řadí PCA, nepracují s informací o zařazení vzorku do jednotlivých skupin. Slouží k vizualizaci chování vzorku vůči celku. Supervizované metody naopak s touto informací pracují, řeší vzájemné vztahy mezi srovnávanými skupinami.

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Cílená lipidomická analýza

Pomocí cílené lipidomické analýzy bylo celkem detekováno 418 lipidů z následujících lipidových tříd: fosfatidylcholinů (PC; s alkylovým zbytkem PC O), lysofosfatidylcholinů (LPC; s alkylovým zbytkem LPC O), fosfatidylethanolaminů (PE; s alkylovým zbytkem PE O), lysofosfatidylethanolaminů (LPE; s alkylovým zbytkem LPE O), sfingomyelinů (SM), ceramidů (Cer), diacylglycerolů (DG), triacylglycerolů (TAG), fosfatidylinositolů (PI), fosfatidylserinů (PS) a mastné kyseliny (FA). Název lipidu „A B:C-D“ je definován následovně: A = lipidová třída, B = celkový počet uhlíků acylových řetězců, C = celkový počet dvojných vazeb, D = jednotlivé isomery. Chromatogram na Obr. 26 znázorňuje separaci vybraných PC.

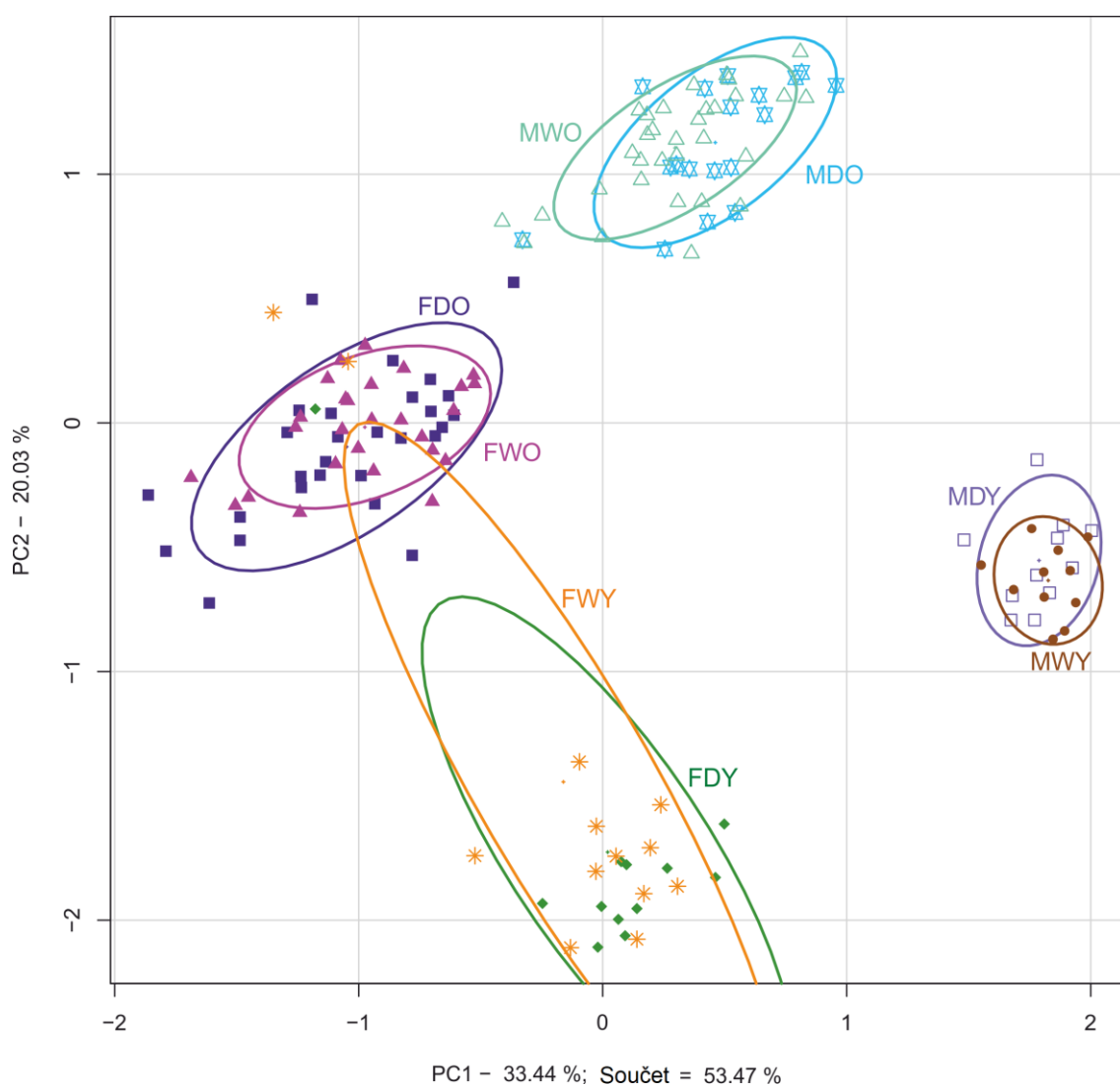


Obr. 26 Ukázkový chromatogram znázorňující separaci vybraných fosfatidylcholinů ve vzorku myší plasmy.

7.2 Statistická analýza

Cílenou lipidomickou analýzou bylo naměřeno 418 látek. V rámci předzpracování dat (interpolace, vyřazení lipidů s variačním koeficientem $> 30\%$ pro QC vzorky – viz kapitola 6.2) bylo do samotné statistické analýzy zahrnuto 406 látek.

Grafické výstupy statistického vyhodnocení cílené lipidomické analýzy plasem myši s deficitem GCPII a kontrol jsou zobrazeny na Obr. 27-31. V PCA grafu (Obr. 27) jsou vzorky barevně odlišeny dle pohlaví, stáří a typu mutace myšního modelu.



Obr. 27 PCA vzorků plasem transgenních myši s deficitem glutamátcarboxypeptidasy II a kontrol. Oranžově jsou znázorněny kontrolní vzorky mladých samic (FWY), růžově pak starých samic (FWO). Zeleně jsou označeny vzorky mladých samic s delecí (FDY), modře pak starých samic s delecí (FDO). Hnědě jsou znázorněny kontrolní vzorky mladých sameček (MWY), olivově pak starých sameček (MWO). Fialově jsou zvýrazněny vzorky mladých sameček s delecí (MDY) a tyrkysově pak starých sameček s delecí (MDO). Celková vysvětlená variabilita datového souboru je 53,47 %.

Pro znázornění diskriminujících lipidů mezi jednotlivými skupinami (FDO/FWO, FDY/FWY, MDO/MWO, MDY/MWY) byla provedena supervizovaná OPLS-DA analýza. Jedním z jejích výstupů je OPLS-DA VIP graf (z angl. Variable Importance for the Projection). Třicet lipidů, které nejvíce přispěly k dělení v rámci skupin WT a DEL je uvedeno v Tab. 2-5. Pro srovnání výsledků z jednorozměrné a vícerozměrné statistiky bylo těchto 30 látek barevně vizualizováno i ve vulkánových grafech (Obr 28-31). Výsledky obou analýz se mohou odlišovat. V případě dat s mnohorozměrnou strukturou (jako jsou i lipidomická data) jsou pro vyhodnocení podstatné zejména výsledky z mnohorozměrných metod, které berou v potaz celou datovou strukturu. Jednorozměrné metody, které vyhodnocují každý metabolit zvlášť, slouží jako doplňující informace.

Tab. 2 Třicet nejvíce diskriminujících lipidů mezi skupinami FDO a FWO dle OPLS-DA VIP plotu. Nejpočetnější skupinou lipidů, které jsou v této tabulce uvedeny, jsou lysofosfatidylcholiny.

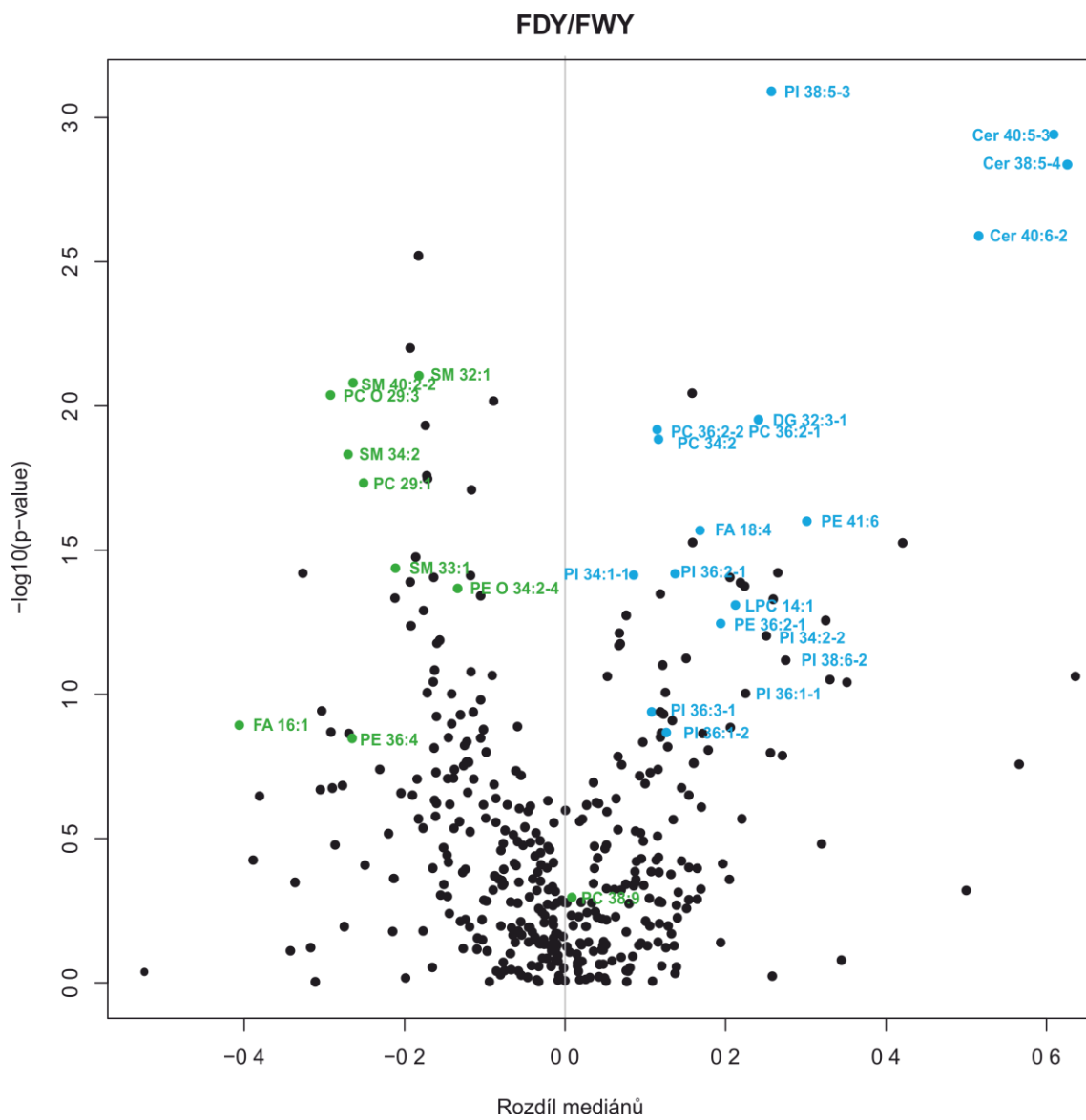
	Průměr VIP	Směrodatná odchylna VIP	p1
PC 43:6	2,69	0,12	-0,99
PS 38:6-2	2,48	0,24	1,33
Cer 40:6-2	2,44	0,23	0,74
LPC 18:4-1	2,41	0,11	0,73
Cer 40:5-3	2,40	0,25	0,71
LPC 20:4	2,29	0,17	0,73
PE 36:4	2,27	0,14	0,81
LPC 17:2	2,20	0,11	0,60
PI 36:1-2	2,14	0,12	-0,84
LPC 18:3	2,14	0,14	0,61
FA 18:4	2,08	0,17	0,54
LPC 16:2	2,06	0,10	0,65
LPC 17:1	2,02	0,14	0,59
LPC 18:2	2,02	0,15	0,57
PI 36:2-1	2,01	0,14	-0,83
PE O 38:6-3	2,00	0,22	0,70
PC 40:10	1,97	0,23	-0,49
LPC 22:4	1,97	0,14	0,73
LPC 22:5-1	1,96	0,15	0,75
LPC 22:6	1,93	0,20	0,68
PC O 34:3-2	1,92	0,17	-0,68
LPC 15:1-1	1,91	0,11	0,48
Cer 38:5-4	1,88	0,26	0,54
PI 36:1-1	1,87	0,15	-0,75
FA 20:3	1,86	0,22	-0,26
PI 38:3	1,86	0,20	-0,54
PC 28:0	1,84	0,26	-0,27
PE O 38:5-2	1,83	0,18	0,52
PC 44:11-1	1,82	0,29	0,73
SM 40:8	1,82	0,15	-0,45



Obr. 28 Vulkánový graf skupin FDO/FWO. Signifikantní lipidy dle p-hodnot (po Bonferroniho korekci) jsou označeny červeným trojúhelníkem. V grafu je zároveň znázorněno 30 nejvíce diskriminujících lipidů z VIP OPLS-DA: zeleně látky zvýšené u FWO, modře zvýšené u FDO.

Tab. 3 Třicet nejvíce diskriminujících lipidů mezi skupinami FDY a FWY dle OPLS-DA VIP plotu. Nejpočetnější skupinou lipidů, které jsou v této tabulce uvedeny, jsou fosfatidylinositoly.

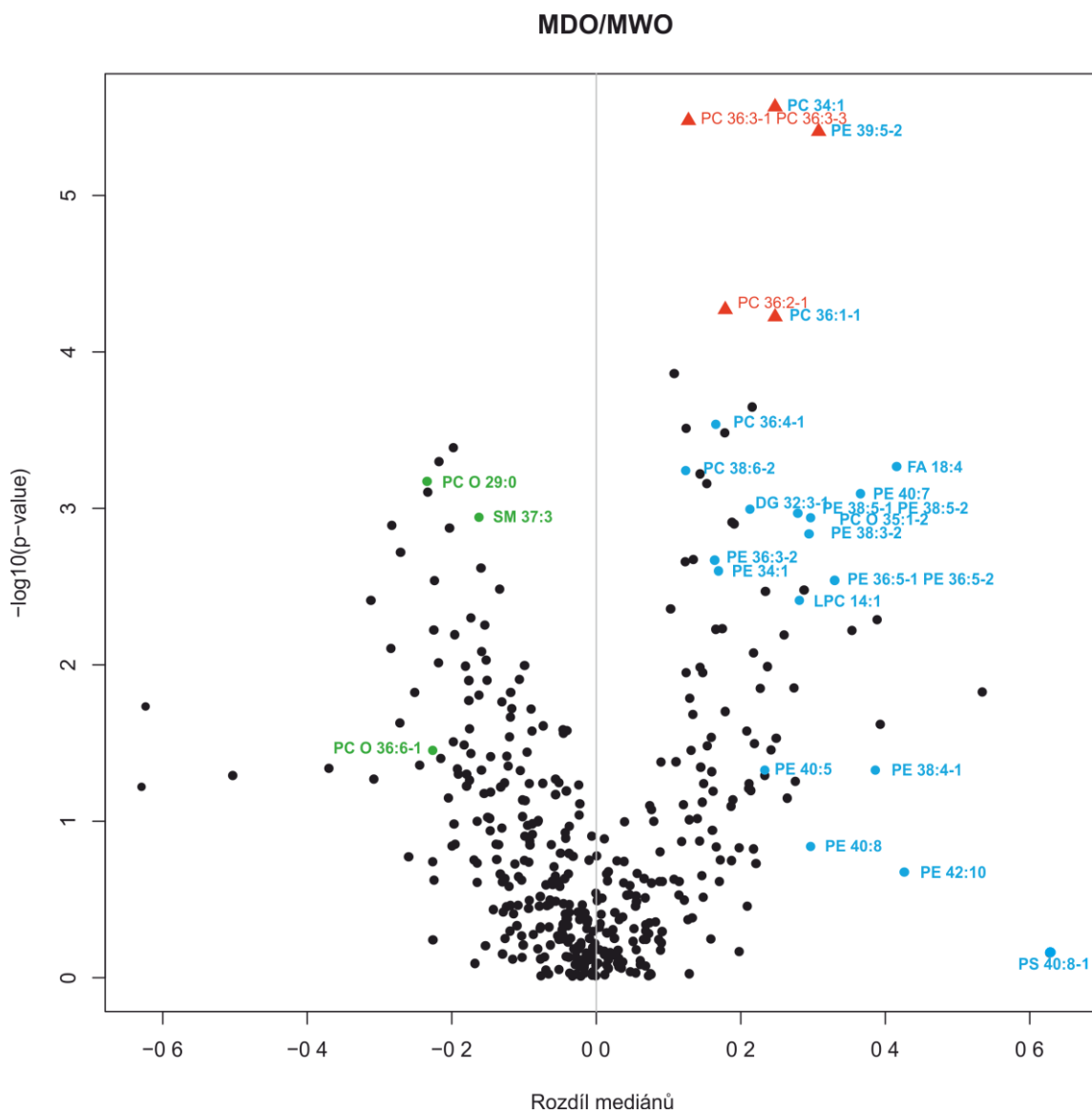
	Průměr VIP	Směrodatná odchylka VIP	p1
Cer 38:5-4	2,95	0,29	1,22
Cer 40:5-3	2,86	0,30	1,15
Cer 40:6-2	2,49	0,31	0,82
PI 36:2-1	2,43	0,18	1,47
PE O 34:2-4	2,39	0,30	-0,97
PI 38:5-3	2,28	0,11	1,49
FA 16:1	2,28	0,29	-0,91
PI 36:1-1	2,20	0,24	1,11
PI 36:1-2	2,16	0,23	1,30
SM 32:1	2,15	0,18	-1,26
PI 34:2-2	2,15	0,18	1,03
PC O 29:3	2,13	0,22	-1,41
PI 34:1-1	2,12	0,24	0,77
SM 40:2-2	2,08	0,19	-0,92
SM 33:1	2,03	0,23	-1,44
SM 34:2	2,00	0,21	-0,51
SM 40:7	1,94	0,49	-0,94
PI 39:4	1,94	0,19	0,84
PC 36:2-2 PC 36:2-1	1,90	0,11	1,06
PC 34:2	1,90	0,11	1,08
PC 38:9	1,86	0,53	-1,11
PI 36:3-1	1,86	0,17	1,21
PE 36:2-1	1,84	0,14	1,01
PE 41:6	1,81	0,18	1,50
PC 29:1	1,81	0,22	-1,12
FA 18:4	1,81	0,27	1,11
DG 32:3-1	1,78	0,23	0,70
PI 38:6-2	1,78	0,21	1,28
LPC 14:1	1,76	0,18	1,33
PE 36:4	1,75	0,34	-0,85



Obr. 29 Vulkánový graf skupin FDY/FWY. Signifikantní lipidy dle p-hodnot (po Bonferroniho korekci) jsou označeny červeným trojúhelníkem. V grafu je zároveň znázorněno 30 nejvíce diskriminujících lipidů z VIP OPLS-DA: zeleně látky zvýšené u FWY, modře zvýšené u FDY.

Tab. 4 Třicet nejvíce diskriminujících lipidů mezi skupinami MDO a MWO dle OPLS-DA VIP plotu. Nejpočetnějšími skupinami lipidů, které jsou v této tabulce uvedeny, jsou fosfatidylcholin a fosfatidylethanolamin.

	Průměr VIP	Směrodatná odchylna VIP	p1
FA 18:4	2,61	0,14	1,10
PE 38:3-2	2,44	0,15	1,20
PE 40:7	2,26	0,10	0,88
PE 36:3-2	2,21	0,14	0,76
PE 36:5-1 PE 36:5-2	2,19	0,11	1,43
PE 36:4	2,14	0,13	0,99
PE 38:5-1 PE 38:5-2	2,13	0,14	0,86
PC O 36:6-1	2,07	0,12	-1,16
PE 38:4-1	2,06	0,14	0,81
PE 39:5-2	2,05	0,08	1,32
PE 40:8	1,96	0,19	0,73
PC 34:1	1,95	0,08	1,16
LPC 14:1	1,93	0,13	0,60
PE 42:10	1,90	0,22	1,31
DG 32:3-1	1,89	0,12	0,77
PE 40:5	1,88	0,13	0,82
PC 36:4-1	1,88	0,08	0,78
PC O 35:1-2	1,87	0,11	1,23
SM 37:3	1,87	0,07	-0,99
PC 36:3-2	1,83	0,09	0,71
PS 40:8-1	1,82	0,36	1,19
PC O 34:4-1	1,81	0,07	-0,99
PC 29:2	1,78	0,15	-0,98
PC 38:4-2	1,77	0,11	0,59
PE 38:4-3 PE 38:4-2	1,75	0,14	0,59
LPC 15:1-1	1,73	0,19	-0,40
PC 36:1-1	1,73	0,09	1,24
PC 38:6-2	1,71	0,08	0,69
PE 34:1	1,71	0,10	1,32
PC O 29:0	1,70	0,07	-1,11



Obr. 30 Vulkánový graf skupin MDO/MWO. Signifikantní lipidy dle p-hodnot (po Bonferroniho korekci) jsou označeny červeným trojúhelníkem. V grafu je zároveň znázorněno 30 nejvíce diskriminujících lipidů z VIP OPLS-DA: zelené látky zvýšené u MWO, modře zvýšené u MDO.

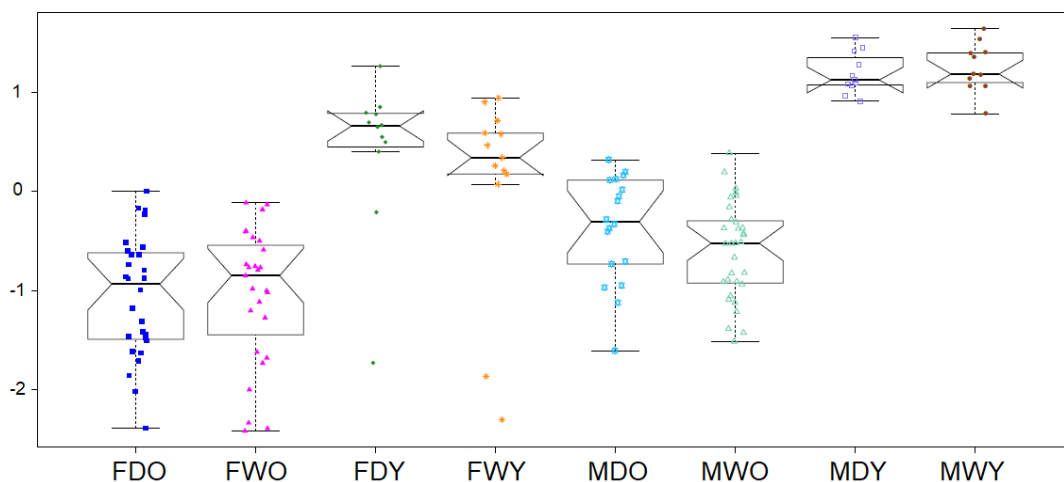
Tab. 5 Třicet nejvíce diskriminujících lipidů mezi skupinami MDY a MWY dle OPLS-DA VIP plotu. Nejpočetnějšími skupinami lipidů, které jsou v této tabulce uvedeny, jsou lysofosfatidylcholin a fosfatidylethanolaminy.

	Průměr VIP	Směrodatná odchylna VIP	p1
Cer 40:6-2	3,07	0,30	1,60
Cer 40:5-3	3,05	0,41	0,93
Cer 38:5-4	3,04	0,39	0,83
LPC 15:1-1	2,77	0,15	1,22
PE 40:6-1	2,47	0,21	-1,59
PE 40:5	2,46	0,28	-1,29
PE 40:9-2	2,45	0,24	-1,26
LPC 20:5	2,37	0,21	1,30
LPC 18:4-1	2,36	0,23	0,85
PE 36:4	2,36	0,27	-1,22
LPC 17:2	2,28	0,15	0,99
FA 16:1	2,24	0,32	1,34
LPC 18:3	2,22	0,21	0,83
PI 36:3-3	2,21	0,24	1,06
LPE O 18:3	2,11	0,12	-0,99
PE O 37:2	2,07	0,28	0,59
LPC 14:0	2,02	0,22	1,17
LPC 16:2	2,02	0,14	1,07
PE 38:4-3 PE 38:4-2	2,01	0,28	-1,02
PE O 40:5	1,97	0,18	-1,07
PC O 39:3	1,97	0,23	-0,98
PE 34:2	1,96	0,20	-1,34
PE O 34:2-4	1,95	0,28	0,76
LPC 16:1	1,95	0,22	1,25
LPC O 20:1	1,92	0,17	1,03
PE 36:5-1 PE 36:5-2	1,90	0,24	-1,37
PI 34:1-1	1,88	0,18	0,49
LPC 14:1	1,87	0,29	-0,87
FA 22:1	1,86	0,27	0,83
LPE 16:0	1,86	0,15	-1,19



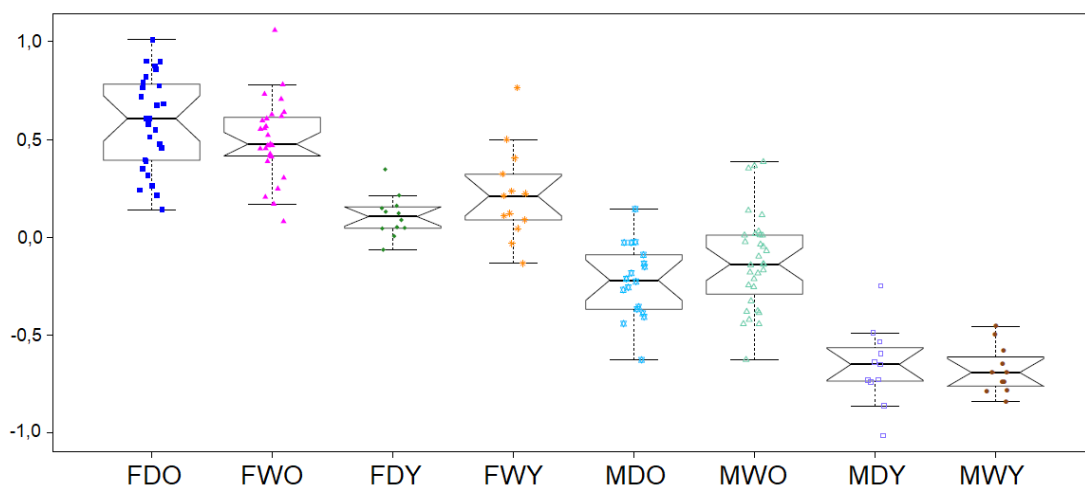
Obr. 31 Vulkánový graf skupin MDY/MWY. Signifikantní lipidy dle p-hodnot (po Bonferroniho korekci) jsou označeny červeným trojúhelníkem. V grafu je zároveň znázorněno 30 nejvíce diskriminujících lipidů z VIP OPLS-DA: zeleně látky zvýšené u MWY, modře zvýšené u MDY.

Dle našich výsledků inaktivace GCPII nemá výrazný vliv na celkový lipidový profil. Dělení vzorků bylo pozorováno zejména v závislosti na pohlaví a stáří myších modelů (viz Obr. 27). V této souvislosti bylo publikováno několik prací. Lu a kol ve své práci popsali sníženou hladinu fosfatidylinositolů s přibývajícím věkem, což se nám u většiny z diskriminujících PI prokázalo, rozdíl byl zaznamenán například pro PI 36:5 (Obr. 32) (Lu *et al.*, 2019).



Obr. 32 Krabicové grafy znázorňující hladinu fosfatidylinositolu 36:5 napříč danými skupinami. Výrazné snížení hladiny tohoto lipidu bylo pozorováno u starších myší.

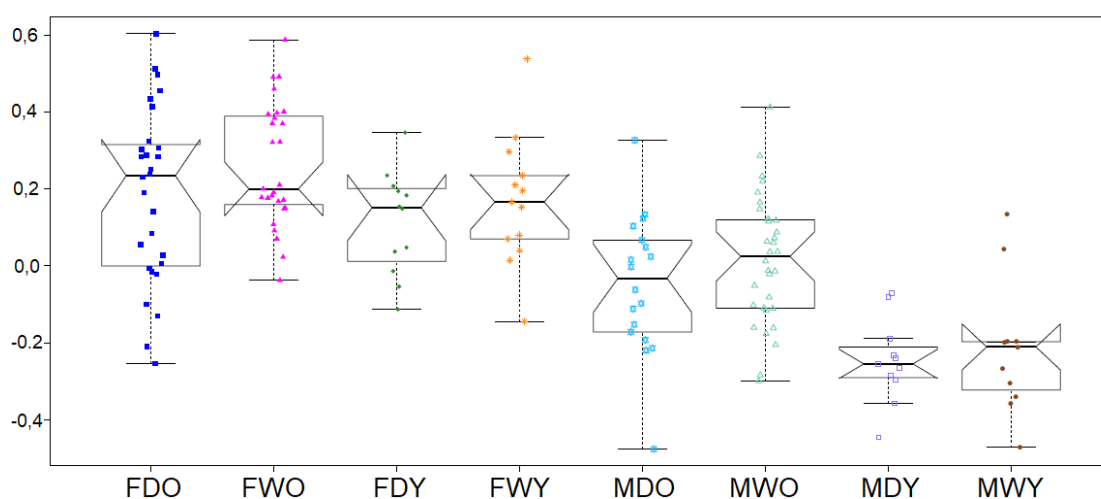
Při stárnutí dochází ke změnám ve složení buněčných membrán, v mitochondriálním metabolismu a v hladině oxidačního stresu (Yu *et al.*, 2012). Právě oxidační stres dramaticky ovlivňuje biologické membrány peroxidací lipidů, která vede ke změně fluidity membrány a narušení funkce membránových proteinů (Mecocci *et al.*, 1996). Jedním z nejdůležitějších membránových lipidů jsou sfingomyeliny, jejichž hladina se zvyšuje s věkem (Vaarhorst *et al.*, 2011; Gonzalez-Covarrubias *et al.*, 2013). Naše výsledky tomuto zjištění odpovídají, příkladem může být SM 38:3 (Obr. 33), jehož hladina je u starých myší vyšší než u mladých.



Obr. 33 Krabicové grafy znázorňující hladinu sfingomyelinu 38:3, která se liší v závislosti na stáří a pohlaví.

Trabado a kol. ve své práci mimo jiné uvedli, že hladina SM se lišila v závislosti na pohlaví. SM 38:3 byl nalezen ve vyšší koncentraci u samic (viz Obr. 33) (Trabado *et al.*, 2017).

U rakoviny prostaty byla popsána zvýšená exprese GCPII (Silver *et al.*, 1997). Zhou a kol. publikovali práci, která popisuje změny v lipidovém profilu plasmy u pacientů s nádorem prostaty vůči kontrolám. Mezi kandidátní biomarkery pro diagnostiku tohoto onemocnění byly lysofosfatidylcholiny, konkrétně LPC 18:0, LPC 18:1, LPC 18:2 a LPC 20:4, jejichž hladina byla zvýšena u pacientů s rakovinou (Zhou *et al.*, 2012). Pokud by aktivita GCPII výrazně ovlivňovala koncentrace těchto lipidů, byl by u skupin DEL pravděpodobný pokles jejich hladin vůči WT. Tento jev však byl patrný jen u skupin MDO/MWO a to pouze v případě LPC 18:0 (Obr. 34). Uvedený předpoklad tak nebyl naší analýzou potvrzen.



Obr. 34 Krabicové grafy znázorňující hladinu lysofosfatidylcholinu 18:0. Samečci s delecí zaznamenávají mírný pokles hladiny daného lipidů oproti kontrolám.

8 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše týkající se problematiky glutamátcarboxypeptidasy II, lipidů, lipidomiky a hmotnostní spektrometrie.

V experimentální části byla provedena cílená lipidomická analýza plasem myší s deficitem GCPII a kontrol pomocí LC-MS/MS. Bylo nalezeno 418 lipidů různých tříd. Následnou statistickou analýzou byly vyhledány diskriminující lipidy mezi oběma skupinami. Změny v lipidovém profilu byly pozorovány zejména v rámci stáří a pohlaví.

Dle našich výsledků tedy inaktivace GCPII nemá výraznější vliv na celkový lipidový profil.

9 LITERATURA

Adedoyin, O. M. (2010) *The Role of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) in the amygdala*.

Ando, J. *et al.* (2015) 'Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy', *ePub*, 112(15), pp. 4558–4563.

Bacich, D. J. *et al.* (2001) 'Cloning , expression , genomic localization , and enzymatic activities of the mouse homolog of prostate-specific membrane antigen / NAALADase / folate hydrolase', (June 2015). doi: 10.1007/s003350010240.

Bacich, D. J. *et al.* (2002) 'Deletion of the glutamate carboxypeptidase II gene in mice reveals a second enzyme activity that hydrolyzes N -acetylaspartylglutamate', *Journal of Neurochemistry*, 83, pp. 20–29.

Bacich, D. J. *et al.* (2005) 'Mice lacking glutamate carboxypeptidase II are protected from peripheral neuropathy and ischemic brain injury', *Journal of Neurochemistry*, 95(2), pp. 314–323. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03361.x.

Bařinka, C. *et al.* (2002) 'Substrate specificity , inhibition and enzymological analysis of recombinant human glutamate carboxypeptidase II', 80, pp. 477–487.

Bařinka, C. *et al.* (2007) 'Structural Insight into the Pharmacophore Pocket of Human Glutamate Carboxypeptidase II', pp. 3267–3273. doi: 10.1021/jm070133w.

Bařinka, C. *et al.* (2008) 'Structural Basis of Interactions between Human Glutamate Carboxypeptidase II and Its Substrate Analogs', pp. 1438–1450. doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.066.

Bařinka, C. *et al.* (2012) 'Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer', 19(6), pp. 856–870.

Barret, A. J. (1997) 'Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) Enzyme Nomenclature . Recommendations 1992', *Eur. J. Biochem.*, 6, pp. 2963–2968.

Boiteau, R. M. *et al.* (2018) 'Structure Elucidation of Unknown Metabolites in Metabolomics by Combined NMR and MS / MS Prediction', *Metabolites*, 8(1). doi: 10.3390/metabo8010008.

- Cajka, T. and Fiehn, O. (2016) 'Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics', *Analytical Chemistry*, 88, pp. 524–545. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04491.
- Cansev, M. *et al.* (2008) 'Oral administration of circulating precursors for membrane phosphatides can promote the synthesis of new brain synapses', *Alzheimers Dement.*, 4, pp. 153–168.
- Cheng, Y.-C. and Prusoff, W. H. (1973) 'Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction', *Biochemical Pharmacology*, 22(23), pp. 3099–3108.
- Dass, C. (2007) *Fundamentals Of Contemporary Mass Spectrometry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Fass, L. (2008) 'Imaging and cancer : A review', *Molecular Oncology*, 2, pp. 115–152. doi: 10.1016/j.molonc.2008.04.001.
- Friedecký, D. and Lemr, K. (2012) 'Úvod Do Hmotnostní Spektrometrie', *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 20(3), pp. 152–157.
- Gao, Y. *et al.* (2015) 'Mice lacking glutamate carboxypeptidase II develop normally, but are less susceptible to traumatic brain injury', *Journal of Neurochemistry*, 134, pp. 340–353. doi: 10.1111/jnc.13123.
- Gonzalez-Covarrubias, V. *et al.* (2013) 'Lipidomics of familial longevity', *Aging Cell*, 12(3), pp. 426–434. doi: 10.1111/accel.12064.
- Gross, J. H. (2011) *Mass Spectrometry*. second. Berlin: Springer Heidelberg.
- Halsted, C. H. (1991) 'Jejunal Brush-Border Folate Hydrolase', *Biomedical Science*, (35747), pp. 605–609.
- Halsted, C. H. *et al.* (1998) 'Folylpoly-gamma-glutamate Carboxypeptidase from Pig Jejunum', *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), pp. 20417–20424.
- Han, L. *et al.* (2009) 'Phenotypic Characterization of Mice Heterozygous for a Null Mutation of Glutamate Carboxypeptidase II', *Synapse*, 63(8), pp. 625–635. doi: 10.1002/syn.20649.Phenotypic.
- Haseman, M., Reed, N. and Rosenthal, S. (1996) 'Monoclonal antibody imaging of

- occult prostate cancer in patients with elevated prostate-specific antigen. Positron emission tomography and biopsy correlation', *Clin. Nucl. Med.*, 21, pp. 704–713.
- Hecker, S. J. and Erion, M. D. (2008) 'Prodrugs of Phosphates and Phosphonates', *J. Med. Chem.*, 51, pp. 2328–2345.
- Horoszewicz, J. S., Kawinski, E. and Murphy, G. P. (1987) 'Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients', *Anticancer Res*, 53(2), pp. 227–30.
- Israeli, R. S. *et al.* (1993) 'Molecular Cloning of a Complementary DNA Encoding a Prostate-specific Membrane Antigen', pp. 227–230.
- Jackson, P. F. *et al.* (1996) 'Design , Synthesis , and Biological Activity of a Potent Inhibitor of the Neuropeptidase N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipeptidase', 39, pp. 619–622. doi: 10.1021/jm950801q.
- Kahn, D. *et al.* (1994) 'Radioimmunoscintigraphy with 111indium labeled CYT-356 for the detection of occult prostate cancer recurrence', *Journal of Urology*, 152(5), pp. 1490–1495.
- Karlíková, R. *et al.* (2017) 'Metabolic status of CSF distinguishes rats with tauopathy from controls', *Alzheimer's Research & Therapy*, 9(1), p. 78. doi: 10.1186/s13195-017-0303-5.
- Klouda, P. (2003) *Moderní analytické metody*. Druhé. Ostrava: Pavel Klouda.
- Klusák, V. *et al.* (2009) 'Reaction Mechanism of Glutamate Carboxypeptidase II Revealed by Mutagenesis, X-ray Crystallography, and Computational Methods', *Biochemistry*, 48, pp. 4126–4138.
- Knedlík, T. (2017) *Glutamate Carboxypeptidase II as a Drug Target and a Molecular Address for Cancer Treatment*.
- Kodíček, M., Valentová, O. and Hynek, R. (2015) *Biochemie - chemický pohled na biologický svět*. First. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
- Kozikowski, A. P. *et al.* (2001) 'Design of Remarkably Simple, Yet Potent Urea-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II (NAALADase)', *J. Med. Chem.*, 44(Scheme 1), pp. 298–301. doi: 10.1021/jm000406m.

- Limpert, A. S., Mattmann, M. E. and Cosford, N. D. P. (2013) 'Recent progress in the discovery of small molecules for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)', *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9, pp. 717–732. doi: 10.3762/bjoc.9.82.
- Lu, X. *et al.* (2019) 'Integrated Lipidomics and Transcriptomics Characterization upon Aging-Related Changes of Lipid Species and Pathways in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells', *J. Proteome Res.*, 18(5), pp. 2065–2077.
- Majer, P. *et al.* (2003) 'Synthesis and Biological Evaluation of Thiol-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II : Discovery of an Orally Active GCP II Inhibitor', *J. Med. Chem.*, 46, pp. 1989–1996. doi: 10.1021/jm020515w.
- Majer, P. *et al.* (2006) 'Structural Optimization of Thiol-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II by Modification of the P1 ' Side Chain', *J. Med. Chem.*, 49, pp. 2876–2885. doi: 10.1021/jm051019l.
- Man, P. *et al.* (2004) 'Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity', pp. 1627–1635. doi: 10.1110/ps.04622104.2001.
- Maraj, B. H. *et al.* (1998) 'Detailed genetic mapping around a putative prostate-specific membrane antigen locus on human chromosome 11p11.2', 9, pp. 3–9.
- Mecocci, P. *et al.* (1996) 'Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain', *Neuroscience Letters*, 207(2), pp. 129–132. doi: 10.1016/0304-3940(96)12509-X.
- Mesters, J. R., Henning, K. and Hilgenfeld, R. (2011) 'Human glutamate carboxypeptidase II inhibition: structures of GCPII in complex with two potent inhibitors, quisqualate and 2-PMPA', *Biological Crystallography*, 20(1), pp. 1–15. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.10.061.Bioisosterism.
- Neale, J. H. *et al.* (2011) 'Advances in Understanding the Peptide Neurotransmitter NAAG and Appearance of a New Member of the NAAG Neuropeptide Family', *J. Neurochem.*, 118(4), pp. 490–498. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07338.x.Advances.
- Neale, J. H., Bzdega, T. and Wroblewska, B. (2000) 'N-acetylaspartylglutamate: the most abundant peptide neurotransmitter in the mammalian brain nervous system', *Journal of Neurochemistry*, 75, pp. 443–452.
- O'Keefe, D. S. O. *et al.* (1998) 'Mapping , genomic organization and promoter analysis

of the human prostate-specific membrane antigen gene', 1443.

Olszewski, R. T. *et al.* (2004) 'NAAG peptidase inhibition reduces locomotor activity and some stereotypes in the PCP model of schizophrenia via group II mGluR', *Journal of Neurochemistry*, 89(4), pp. 876–885. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02358.x.

Pinto, J. T. *et al.* (1996) 'Prostate-specific Membrane Antigen: A Novel Folate Hydrolase in Human Prostatic Carcinoma Cells', *Clinical Cancer Research*, 2(September), pp. 1445–1451.

van der Post, J. P. *et al.* (2005) 'The central nervous system effects, pharmacokinetics and safety of the NAALADase-inhibitor GPI 5693', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 60, pp. 128–36. doi: 10.1111/j.1365-2125.2005.02396.x.

Raczyński, P. *et al.* (2006) 'Reorientational dynamics of cholesterol molecules in thin film surrounded carbon nanotube: Molecular dynamics simulations', *Journal of Molecular Structure*, 792–793(3), pp. 216–220.

Roberts, L. D. *et al.* (2012) 'Targeted Metabolomics', *Current Protocols in Molecular Biology*, 98(1), p. 30.2.1-30.2.24.

Robinson, M. B. *et al.* (1987) 'Hydrolysis of the Brain Dipeptide N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL N-ACETYLATED (Alpha-LINKED ACIDIC DIPEPTIDASE ACTIVITY FROM RAT BRAIN*', *The Journal Of Biology Chemistry*, 262(30), pp. 14498–14506.

Sasaki, H. *et al.* (2009) 'pH dependence of sphingosine aggregation', *Biophysical Journal*, 96(7), pp. 2727–2733.

Schulke, N. *et al.* (2003) 'The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy', *PNAS*, 100(22), pp. 12590–12595.

Silver, D. *et al.* (1997) 'Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues', *Clinical Cancer Research*, 3(1), pp. 81–85.

Slusher, B. S. *et al.* (1999) 'Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury', *Nature Medicine*, 5, pp. 1396–1402.

Slusher, S. *et al.* (1990) 'Rat Brain N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipeptidase

- Activity', *Journal of Biological Chemistry*, 265(34), pp. 21297–21301.
- Speno, H. S. *et al.* (1999) 'Site-directed mutagenesis of predicted active site residues in glutamate carboxypeptidase II', *Molecular Pharmacology*, 55(1), pp. 179–185.
- Su, S. *et al.* (1995) 'Alternatively Spliced Variants of Prostate-specific Membrane Antigen RNA: Ratio of Expression as a Potential Measurement of Progression1', *Cancer Res.*, (7), pp. 1441–1443.
- Trabado, S. *et al.* (2017) 'The human plasma-metabolome: Reference values in 800 French healthy volunteers; Impact of cholesterol, gender and age', *PLoS ONE*, 12(3), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0173615.
- Tsai, G. *et al.* (2003) 'Early Embryonic Death of Glutamate Carboxypeptidase II (NAALADase) homozygous mutants', *Synapse*, 50, pp. 285–292. doi: 10.1002/syn.10263.
- Tsukamoto, T., Wozniak, K. M. and Slusher, B. S. (2007) 'Progress in the discovery and development of glutamate carboxypeptidase II inhibitors', 12(September). doi: 10.1016/j.drudis.2007.07.010.
- Vaarhorst, A. A. M. *et al.* (2011) 'Lipid metabolism in long-lived families: The Leiden Longevity Study', *Age*, 33(2), pp. 219–227. doi: 10.1007/s11357-010-9172-6.
- Vodrážka, Z. (2002) *Biochemie*. První. Praha: Academia.
- Voet, D. and Voetová, J. G. (1995) *Biochemie*. První. Edited by A. Kotyk. Praha: Victoria Publishing.
- Weissleder, R. and Pittet, M. J. (2008) 'Imaging in the era of molecular oncology', *Nature*, 452(7187), pp. 580–589. doi: 10.1038/nature06917.Imaging.
- Wenk, M. R. (2005) 'The emerging field of lipidomics', *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(7), pp. 594–610. doi: 10.1038/nrd1776.
- Wright, G. L., Haley, T. C. and Beckett, M. Lou (1995) 'Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen in Normal, Benign, and Malignant Prostate Tissues', *Urol Oncol.*, 1(1), pp. 18–28.
- Xuan, Q. *et al.* (2018) 'Development of a High Coverage Pseudotargeted Lipidomics Method Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass

Spectrometry', *Analytical Chemistry*, 90(12), pp. 7608–7616. doi:
10.1021/acs.analchem.8b01331.

Yu, Z. *et al.* (2012) 'Human serum metabolic profiles are age dependent', *Aging Cell*, 11(6), pp. 960–967. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00865.x.

Záruba, K. and a kol (2016) *Analytická chemie (1. díl)*. 1st editio. Praha: VŠCHT Praha.

Zhao, R., Matherly, L. H. and Goldman, I. D. (2009) 'Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues', 11.

Zhao, Y.-Y., Cheng, X.-I. and Lin, R.-C. (2014) 'Lipidomics Applications for Discovering Biomarkers of Diseases in Clinical Chemistry', *International Review of Cell and Molecular Biology*, 313, pp. 1–26.

Zhou, X. *et al.* (2012) 'Identification of Plasma Lipid Biomarkers for Prostate Cancer by Lipidomics and Bioinformatics', *PLoS One*, 7(11). doi:
10.1371/journal.pone.0048889.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-MPPA	kyselina 2-(3-merkaptopropyl)pentandiová
2-PMPA	kyselina 2-(fosfonomethyl)pentandiová
ACN	acetonitril
AMK	aminokyselina
bp	páry bazí
Cer	ceramidy
DEL	delece v genu pro GCPII
DG	diacylglyceroly
ESI	ionizace elektrosprejem
F	samička
FA	mastné kyseliny
GCPII	glutamátcarboxypeptidasa II
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPA	isopropylalkohol
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LPC	lysofosfatidylcholin
LPC O	lysofosfatidylcholiny s alkylovým zbytkem
LPE	lysofosfatidylethanolaminy
LPE O	lysofosfatidylethanolaminy s alkylovým zbytkem
M	sameček
MALDI	desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice
MeOH	methanol
MK	mastné kyseliny
MTBE	methyl terc-butyl ether
NAAG	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát
O	starý
OPLS-DA	ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců
PC	fosfatidylcholin
PC O	fosfatidylcholiny s alkylovým zbytkem

PCA	analýza hlavních komponent
PE	fosfatidylethanolaminy
PE O	fosfatidylethanolaminy s alkylovým zbytkem
PI	fosfatidylinositoly
PS	fosfatidylseriny
QC	kontrola kvality
SM	sfingomyeliny
TAG	triacylglyceroly
TOF	analyzátor doby letu
WT	wild-type - zdravé kontroly
Y	mladý