

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Optimalizace metod kvantitativní proteomiky pro studium tepelné stability proteinů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Simona Juříková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. René Lenobel, Ph.D.
Rok:	: 2018

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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

... *podpis diplomanta*

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu, doktoru Renému Lenobelovi za všechny cenné rady a zkušenosti, které mi předal. Také velmi děkuji za pozitivní přístup, ochotu a skvělou komunikaci, díky kterým panovala příjemná pracovní atmosféra. Další poděkování patří mému školiteli za spolupráci při měření připravených vzorků pomocí hmotnostního spektrometru.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Simona Juříková
Název práce	Optimalizace metod kvantitativní proteomiky pro studium tepelné stability proteinů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. René Lenobel, Ph.D..
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Jednou ze základních vlastností proteinů je tvorba specifických nekovalentních komplexů, které hrají klíčovou roli ve většině buněčných procesů. Předpokládá se, že všechny proteiny v buňce jsou součástí obrovské proteinové sítě–interaktomu, přičemž na jeden protein připadá průměrně pět interakčních partnerů. Pro pochopení dějů probíhajících v živých organismech je tedy studium proteinových komplexů velmi důležité. Při vazbě ligandu na protein dochází k určitým změnám vlastností proteinu. Tato diplomová práce je postavena na skutečnosti, že vlivem proteinové interakce se může zvyšovat termostabilita daného proteinu. Cílem práce bylo optimalizovat metody kvantitativní proteomiky pro studium proteinových interakcí založené na změnách tepelné stability proteinů. Jako vzorový protein byla v experimentální části použita intestinální alkalická fosfatasa ve formě lyofilizovaného prášku s obsahem několika dalších proteinů. Připravené vzorky tak suplovaly podmínky, kdy se nachází cílový protein ve složitější proteinové směsi. Proteinové vzorky byly štěpeny v roztoku, následně značeny pomocí redukční dimethylace, čištěny pomocí StageTips a po separaci kapalinovou chromatografií analyzovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie ESI Q/TOF MS/MS. Pro studium interakce proteinu s ligandem byly využívány vzorky alkalické fosfatasy se substrátem *p*-nitrofenylfosfátem a inhibitorem L-fenylalaninem ovlivňované působení teploty. Bylo dokázáno, že navržený metodický postup je vhodný pro studium proteinových interakcí v proteinové směsi.

Klíčová slova	Kvantitativní proteomika, termostabilita, alkalická fosfatasa, proteinové interakce
Počet stran	85
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Surname	Bc. Simona Juříková
Title	Optimization of quantitative proteomics methods for the study of thermal stability of proteins
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. René Lenobel, Ph.D..
The year of presentation	2018

Abstract

One of the basic properties of proteins is the formation of specific non-covalent complexes that play a key role in most cellular processes. It is assumed that all of the proteins in the cell are part of a huge protein network-an interactome, with an average of five interacting partners per protein. To understand the processes taking place in living organisms, the study of protein complexes is very important. Ligand binding to protein results in certain changes in protein properties. This diploma thesis is based on the fact that the thermostability of the protein can increase due to protein interaction. The aim of the thesis was to optimize methods of quantitative proteomics for the study of protein interactions based on changes in protein thermal stability. As a model protein, intestinal alkaline phosphatase in the form of lyophilized powder containing several other proteins was used for the experimental work. Prepared samples thus supplemented the conditions in which the target protein occurs in the more complex protein mixture. Protein samples were digested in solution, subsequently labeled by reductive dimethylation, purified by StageTips, separated by liquid chromatography and analyzed by tandem mass spectrometry ESI Q/TOF MS/MS. For the study of protein-ligand interactions, alkaline phosphatase samples with *p*-nitrophenylphosphate substrate and L-phenylalanine inhibitor were used, influenced by temperature. It has been shown that the proposed method is suitable for the study of protein interactions in the protein mixture.

Keywords	Quantitative proteomics, thermostability, alkaline phosphatase, protein interactions
Number of pages	85
Number of appendices	0
Language	Czech

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše obsahující klíčová slova: proteomika, termostabilita, alkalická fosfatasa
- Optimalizace metody pro kvantitativní analýzu tepelné stability proteinu
- Spektrofotometrické měření změn proteinové aktivity po ovlivnění teplem a v přítomnosti, či nepřítomnosti vhodného interakčního partnera
- Kvantitativní analýza stability vybraného proteinu po ovlivnění teplem a v přítomnosti, či nepřítomnosti vhodného interakčního partnera

Obsah

1	Úvod	8
2	Současný stav řešené problematiky.....	9
2.1	Metody studia proteinových interakcí.....	9
2.2	Tepelná stabilita enzymů.....	10
2.2.1	Metody pro zvýšení termostability enzymů	11
2.2.2	Měření termostability enzymů.....	12
2.2.3	Studium tepelné stability proteinů ovlivněných vazbou ligandu.....	14
2.3	Kvantitativní proteomika.....	15
2.3.1	Proteomické techniky pro kvantifikaci proteinů a peptidů s použitím izotopových značek a standardů	16
2.3.1.1	Metabolické izotopové značení.....	17
2.3.1.2	Enzymatické značení.....	17
2.3.1.3	Chemické značení	18
2.3.2	Label-free kvantifikace.....	21
2.4	Příprava vzorku pro MS analýzu	22
2.4.1	Proteolytické štěpení proteinů	22
2.4.2	Odsolení a prekoncentrace peptidů.....	24
2.5	Hmotnostní spektrometrie v proteomice	26
2.5.1	Ionizační techniky využívané v proteomice	26
2.5.2	Hmotnostní analyzátory.....	27
2.5.3	Tandemová hmotnostní spektrometrie	28
2.6	Alkalická fosfatasa	28
3	Experimentální část	32
3.1	Použitý materiál a přístroje	32
3.1.1	Chemikálie.....	32
3.1.2	Použité přístroje a experimentální vybavení.....	33
3.2	Metody.....	34
3.2.1	Stanovení celkové koncentrace proteinů v roztoku alkalické fosfatasy metodou Bradforda	34
3.2.2	Štěpení proteinů v roztoku.....	34
3.2.2.1	Zjištění optimálního objemu reakce pro štěpení	35
3.2.2.2	Zjištění optimální koncentrace trypsinu	36
3.2.2.3	Zjištění vlivu trypsinové koncentrace na dosažení odpovídajícího poměru L:H	36
3.2.2.4	Štěpení s využitím komerčního purifikovaného trypsinu.....	37
3.2.2.5	Štěpení vzorků po tepelném ovlivnění a interakci s ligandem.....	38
3.2.3	Reduktivní dimethylace peptidů.....	38
3.2.4	Příprava StageTips mikrokolon	40

3.2.5	Odsolování vzorků.....	40
3.2.6	Studium míry agregace proteinového vzorku po tepelném ovlivnění	41
3.2.7	SDS PAGE a barvení gelů.....	42
3.2.8	Studium změn aktivity alkalické fosfatasy po tepelném ovlivnění a v přítomnosti substrátu a inhibitoru	44
3.2.9	nLC-MS/MS analýza.....	45
3.2.10	Zpracování dat	46
4	Výsledky a diskuze.....	48
4.1	Stanovení celkové koncentrace proteinů v roztoku alkalické fosfatasy metodou Bradforda.....	48
4.2	Identifikace proteinů v roztoku alkalické fosfatasy pomocí hmotnostní spektrometrie.....	49
4.3	Studium aminokyselinové sekvence a prostorového uspořádání vybraných peptidů	51
4.4	Zjištění optimálního objemu reakce pro štěpení	55
4.5	Zjištění optimální koncentrace trypsinu.....	57
4.6	Zjištění vlivu trypsinové koncentrace na dosažení odpovídajícího poměru L:H.....	61
4.7	Štěpení s využitím komerčního purifikovaného trypsinu.....	62
4.8	Studium míry agregace proteinového vzorku po tepelném ovlivnění.....	67
4.9	Studium změn aktivity alkalické fosfatasy po zahřívání a v přítomnosti substrátu a inhibitoru	71
4.10	Úbytek ALP vlivem agregace ve vzorcích po tepelném ovlivnění a v přítomnosti substrátu a inhibitoru.....	72
5	Závěr	76
6	Literatura.....	78
7	Seznam použitých zkratk	85

1 ÚVOD

Proteomika je analytický přístup využívaný ke kvantitativní, ale i kvalitativní charakterizaci proteinových vzorků. Díky značnému množství informací, které nám proteomika nabízí, však můžeme tento přístup využít i ke komplexnímu studiu proteinových interakcí a molekulárních mechanismů biochemických procesů. Jedním z mnohých využití metod kvantitativní proteomiky tak může být kupříkladu studium protein – proteinových interakcí a protein – ligandových interakcí (Zhang *et al.*, 2013). Tvorba interakcí mezi malými molekulami různého charakteru a proteinem či proteiny navzájem je klíčovým procesem širokého spektra biologických procesů a tedy i fungování živých organismů (Steinbrecher a Labahn, 2010). Kritickým krokem pro odhalení složitých molekulárních vztahů v živých systémech je tedy mapování interaktomu – kompletní sítě proteinových interakcí organismu a zároveň jednou z hlavních oblastí současného biologického výzkumu (De Las Rivas a Fontanillo, 2010).

Vazba ligandu je zodpovědná za konformační změnu proteinu, který následkem toho poskytuje příslušnou odezvu. Zároveň však dochází u proteinu k přidruženým změnám ovlivňujícím flexibilitu, stabilitu a dynamické chování proteinu (Celej *et al.*, 2003). Velikost těchto změn odpovídá síle, s jakou se daný ligand na protein váže. Vzhledem k povaze této práce je nejzajímavějším aspektem změna tepelné stability proteinu. Termostabilita proteinů je však zároveň vždy značně závislá na podmínkách prostředí reakce jako pH, iontová síla a samozřejmě teplota (Borzova *et al.*, 2016).

Experimentální část této práce je věnována optimalizaci metody pro studium proteinových interakcí na základě změn termostability proteinu po vazbě ligandu. Pro účely experimentální části této práce byl zakoupen enzym alkalická fosfatasa ve formě lyofilizovaného prášku, který ovšem nebyl čistý – obsahoval řadu dalších proteinů. Tato skutečnost byla pro účely mé práce výhodná, jelikož hlavním cílem bylo dokázat, že navržené postupy je možné využít pro vzorky, kde je cílený protein součástí proteinové směsi. Jako ligand alkalické fosfatasy byl vybrán její substrát *para*-nitrofenylfosfát (pNPP) a nekompetitivní inhibitor L-fenylalanin.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Metody studia proteinových interakcí

Interakce biologických makromolekul za tvorby specifických komplexů je základem většiny procesů v živých organismech. Proteiny se často vážou pomocí nekovalentních interakcí s dalšími proteiny, peptidy, substráty a jinými ligandy jako molekuly kyslíku či kovu, přičemž klíčovou roli při tom hraje molekulární rozpoznávání (Janin, 1995; Du *et al.*, 2016). Interakce proteinů mohou být studovány prostřednictvím proteinového skládání, signálních transdukcí, imunitní odpovědi, změny termodynamických vlastností či na bázi samotné interakce proteinu s ligandem (Wilchek *et al.*, 2006). U enzymu může po interakci dojít ke změně kinetických vlastností, tvorbě nového aktivního místa či k jeho inhibici (Monod *et al.*, 1965; Weber *et al.*, 1993, Vincent *et al.*, 1972). Postupem času bylo vyvinuto mnoho metod fyzikálních, biochemických či molekulárně biologických, které na základě povahy zmíněných změn dokáží proteinové interakce identifikovat a charakterizovat. V této krátké kapitole budou z těchto metod stručně popsány pouze ty nejznámější a nejběžnější.

Klasickou fyzikální metodou analýzy proteinových interakcí je afinitní chromatografie. Protein je kovalentně vázán k matici v koloně, zatímco potencionální ligandy jsou součástí fáze mobilní. Podle své afinity k proteinu jsou buď eluovány nebo specificky zachyceny (Cuatrecasas, 1970). Eluce zachycených proteinů se klasicky provádí zvýšenou koncentrací solí, chaotropními látkami, kofaktory či dodecylsíránem sodným (SDS; Phizicky a Fields, 1995). Analogem afinitní chromatografie je afinitní blotting založený na detekci interakcí proteinů, peptidů či jiných ligandů s proteiny imobilizovanými na membráně po předchozím elektroforetickém rozdělení (Creighton, 1997).

Další standardní metodou studující protein-proteinové interakce je koimunoprecipitace. Ta spočívá v šetrné lýzi buněk při zachování proteinových komplexů a následném přidavku protilátky pro rozpoznání testovaného proteinu. Komplex interagujících proteinů s protilátkou je poté precipitován a proteiny jsou analyzovány (Lee, 2007).

Jeden z nejstarších přístupů k problematice proteinových interakcí je chemické prokřížení bifunkčními činidly. Při něm dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi cílovými skupinami postranních řetězců interagujících proteinů, nacházejícími se ve

vzdálenosti odpovídající délce bifunkčního činidla. Následuje elektroforetické rozdělení vzniklých multimerů a jejich identifikace vzhledem k vyšší molekulové hmotnosti (Traut *et al.*, 1989).

Převratné pro studium proteinových interakcí *in vivo* se stalo vyvinutí kvasničného dvojhybridního systému. Jedná se o molekulárně genetickou metodu, která jako důkaz protein-proteinové interakce využívá funkci transkripčního aktivátoru. Ten sestává z DNA-vazebné domény a aktivační domény. DNA vazebná doména zajišťuje zacílení aktivátoru na specifický gen a aktivační doména nese katalytickou aktivitu díky kontaktu s dalšími proteiny nutnými pro spuštění transkripčního mechanismu. Tyto dvě domény mohou být propojeny prostřednictvím interakce dvou proteinů, což je následně detekováno expresí reportérových genů (Fields a Song, 1989).

Jinou alternativou studia proteinových interakcí je využití metod založených na měření tepelných vlastností proteinů. Interakce proteinů s ligandy je totiž obvykle doprovázena změnou termostability, denaturační teploty a tepelné kapacity proteinu (Celej *et al.*, 2003). Pro měření tepelné stability je běžně využíváno několik metod, o kterých bude pojednáno v následující kapitole. Tato práce je věnována optimalizaci postupu pro studium proteinových interakcí pomocí metod kvantitativní proteomiky právě na základě jejich termostability. Velkou výhodou tohoto přístupu by byla možnost provádět analýzu cílového proteinu ve směsi obsahující více proteinů. To metody běžně využívané pro studium proteinových interakcí, zmíněné výše, obvykle neumožňují.

2.2 Tepelná stabilita enzymů

Enzymy jsou skupinou globulárních bílkovin, jejichž terciální struktura je držena pohromadě pomocí slabých molekulárních interakcí. K narušení těchto sil však mnohdy dochází již s malou změnou teploty, což má za následek denaturaci enzymu. Při denaturaci je narušena terciální struktura, přičemž je původně definovaný sférický tvar bílkoviny rozvrácen za vzniku chaoticky stočeného řetězce. Proces denaturace je spojen se změnami fyzikálních i biologických vlastností enzymu. U většiny enzymů dochází ke ztrátě jejich katalytické aktivity, jelikož tato je podmíněna právě specifickým prostorovým uspořádáním jeho terciální struktury (McMurry, 2007).

Konformační stabilita je definovaná jako rozdíl volné Gibbsovy energie ΔG mezi složeným a rozloženým stavem proteinu. Pro většinu proteinů existuje teplotní rozmezí, ve kterém je jejich stabilita nepřímo úměrná k teplotě. S rostoucí teplotou klesá volná

Gibbsova energie. V rovnováze, kdy je koncentrace složeného a rozloženého stavu proteinu shodná, je ΔG nulová. Teplota, při které rovnováha nastává, se nazývá teplota tání (T_m ; Brandts a Lin, 1990). K zachování stability přispívá velké množství slabých, nekovalentních interakcí jako vodíkové vazby či van der Waalsovy síly. Největší mírou se však na stabilizaci proteinové struktury podílejí hydrofobní interakce, jejichž síla dokonce roste se zvyšující se teplotou do 75 °C (Menéndes-Arias a Argosf, 1989). K destabilizaci konformace naopak vedou síly konformační entropie. Všechny síly jsou navíc ovlivněny okolní teplotou, typem rozpouštědla a dalšími podmínkami prostředí (Creighton, 1993).

Teplotní nestabilita enzymů je velmi důležitá z hlediska regulace jejich funkce a neměla by tak být vnímána jako určité omezení. Existuje totiž velmi úzký vztah mezi stabilitou, flexibilitou a aktivitou enzymu (Daniel, 1996). Mezi těmito veličinami musí být zajištěna taková rovnováha, aby přílišná stabilita neomezovala flexibilitu enzymu a tedy i efektivitu jeho katalytických vlastností. Nepřiměřeně velká flexibilita enzymu by naopak měla za následek sníženou stabilitu vedoucí k rozvolnění struktury a denaturaci (Huber a Bennett, 1983).

2.2.1 Metody pro zvýšení termostability enzymů

Enzymy se uplatňují v nejrůznějších oborech a odvětvích průmyslu, kde je mnohdy potřeba využívat vyšších teplot. Zvýšení reakční teploty z 25 °C na 75 °C například umožňuje urychlit proces až stokrát, s vyšší teplotou je možné zabránit bakteriálním kontaminacím, snižuje se hustota média atd. (Klibanov, 1983). Tepelná degradace enzymů je pro většinu průmyslových aplikací velkou překážkou, a tak bylo vyvinuto mnoho metod, které se snaží o zvýšení jejich termostability (Iyer a Ananthanarayan, 2008).

Jedním z přístupů řešení zmíněného problému je využívání enzymů izolovaných z termofilních a hypertermofilních organismů, které jsou přizpůsobeny životu v prostředí o vysoké teplotě a povětšinou se řadí k doméně *Archea* (Stetter *et al.*, 1983). Výhodou těchto termoenzymů je větší množství nekovalentních interakcí, rigidnější struktura, větší účinnost skládání proteinu a naopak snížená entropie rozkládání (Mozhaev a Martinek, 1984). Příkladem využití v potravinářství jsou například termostabilní α -amylasa z *B. stearothermophilus* či glukosaisomerasa z termofilních

zástupců třídy bakterií *Bacilli* (Schmid, 1979). V molekulární biologii mají nezastupitelnou roli termostabilní DNA polymerasy, např. *Taq* polymerasa z bakterie *Thermus aquaticus* (Ladero *et al.*, 2002).

Enzymy termofilů ovšem nejsou velmi účinné za mírných teplot a jejich izolace je navíc poměrně náročná. Jako výhodnější přístup se tak jeví genetická modifikace mezofilních organismů, tedy klonování termofilních genů do organismů vyžadujících pro svůj růst mírnou teplotu (Iyer a Ananthanarayan, 2008).

Podobným řešením je také využití speciálně navržených bodových mutací v genech mezofilních enzymů za účelem zvýšení teplotní stability. V těchto případech bývají například nahrazeny termolabilní aminokyseliny (asparagin) za aminokyseliny s vyšší teplotní stabilitou (threonin, izoleucin; Fagain, 1995).

Dalším způsobem zvýšení termostability enzymů je jejich chemická modifikace jako například síťování pomocí cross-linkerů či připojení enzymu k polymerům. Tyto způsoby modifikace ovšem nejsou v praxi běžně vyhledávané (Davis, 2003).

Oproti tomu se velmi osvědčily metody imobilizace enzymů na pevných nosičích. Tepelnou stabilitu nejlépe zvyšuje imobilizace s využitím vícebodových kovalentních vazeb mezi enzymem a matrix (Guisan *et al.*, 1993).

Nejstarší cestou ke zvýšení tepelné stability enzymů je přidavek substrátu či jiného ligandu, které jsou pro enzymovou reakci vlastní. Při vazbě ligandu totiž dochází k energetickému párování a rozvinutí struktury proteinu. Rozložení energie při vazbě ligandu způsobí vzrůst volné Gibbsovy energie, což má za následek zvýšení T_m proteinu (Privalov, 1979).

Změny tepelné stability jsou přímo úměrné afinitě proteinu k danému ligandu. Přidavek substrátu však může mít v určitých případech na termostabilitu enzymu i opačný, či žádný efekt (Schmid, 1979).

2.2.2 Měření termostability enzymů

Referenční metodou pro měření tepelné stability proteinů je diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC, z angl. Differential Scanning Calorimetry) používaná od sedmdesátých let dvacátého století. DSC analyzuje rozdíl v příjmu energie mezi měřeným vzorkem a referenčním vzorkem během regulované teplotní změny. Umožňuje rozlišení teplotního přechodu s přesností $\pm 0,05$ °C. Množství energie

potřebné k vyrovnání teplotního rozdílu přímo koreluje s termodynamickými vlastnostmi vzorku. Tato metoda ovšem neumožňuje měření více vzorků najednou při vysoce výkonných analýzách (Krishinan a Brandts, 1978; O'Neil, 1964).

Zmíněný problém však překonává diferenční skenovací fluorimetrie (DSF). Tato metoda využívá citlivých fluorescenčních barviv navázaných na protein. Měří se změna fluorescence po působení tepelných vlivů a rozkladu proteinu. DSF je možné provést například v uspořádání RT-PCR v 96 jamkách, či s pomocí spektrofluorimetrů ve 384 jamkách (Senisterra a Finerty, 2009). V případě spektrofluorimetrů ovšem není precizně kontrolována rychlost ohřevu, a tak nejsou získaná data natolik robustní, jako v případě RT-PCR experimentů. Naměřené křivky závislosti fluorescence na teplotě mají sigmoidní charakter a poskytují informaci o teplotě tání proteinu (Lo *et al.*, 2004). Nejčastěji používanou fluorescenční sondou je díky vysokému poměru signálu k šumu barvivo SYPRO Orange (Niesen *et al.*, 2007). Problémy mohou nastat při analýze membránových proteinů, kdy dochází k silné fluorescenci sondy v hydrofobním prostředí micel detergentu užitého k rozpuštění proteinu, což má za následek vysoké fluorescenční pozadí (Yeh *et al.*, 2006).

Metoda využívající diferenčního statického rozptylu světla (DSL, z ang. Differential Static Light Scattering) je ovšem vhodná i ke studiu proteinů poskytujících vysoké fluorescenční pozadí. U této metody je principem měření výskyt proteinových agregátů, na rozdíl od předchozích zmíněných metod, kde byl klíčový výskyt proteinů v rozloženém stavu. Vychází se z předpokladu, že proteiny denaturují nevratně a to právě v důsledku jejich agregace. Výstupní hodnotou tak není teplota tání, nýbrž teplota agregace T_{agg} . Namísto intenzity fluorescence se měří intenzita uvolněného světla při agregaci (Senisterra *et al.*, 2006). Není tedy potřeba přídavku externích sond. Metoda je zároveň velmi robustní a je možné ji provést ve 384 jamkovém uspořádání. Některé proteiny při svém rozkladu ovšem neagregují, což využití DSL pro měření jejich termolability znemožňuje (Senisterra a Finerty, 2009).

Při metodě izotermické denaturace (ITD) dochází k měření kinetiky rozkladu proteinů při konstantní teplotě, která je obvykle o několik °C nižší, než T_m . Podobně jako u DSF je využíváno reportérových barviv. Rychlost rozkladu proteinové struktury za těchto podmínek může odhalit rozdíly v termostabilitě proteinů s daleko větší citlivostí, než teplota tání či teplota agregace u výše zmíněných metod (Senisterra *et al.*,

2008). Metody DSC, DSF či DSLS je nicméně třeba využít pro zjištění teploty tání analyzovaného proteinu (Senisterra a Finerty, 2009).

2.2.3 Studium tepelné stability proteinů ovlivněných vazbou ligandu

V posledních letech se rozvinul výzkum termostability proteinů v přítomnosti nejrůznějších látek. V případě, že je denaturace spojená s ireverzibilní agregací denaturovaných molekul proteinů, může být jako měřítko proteinové termostability využita teplota agregace T_{agg} , zmiňovaná již v Kap 2.2.2 v souvislosti s DSLS. Výstupem fluorescenčních měření bývá hodnota T_m (viz Kap 2.2). Při studiu proteinových interakcí na základě teplotního vlivu bývá sledován posun hodnot T_{agg} či T_m v přítomnosti či nepřítomnosti vázaného ligandu. Míra teplotního posunu by měla být zároveň úměrná afinitě ligandu k proteinu (Kurganov, 2013).

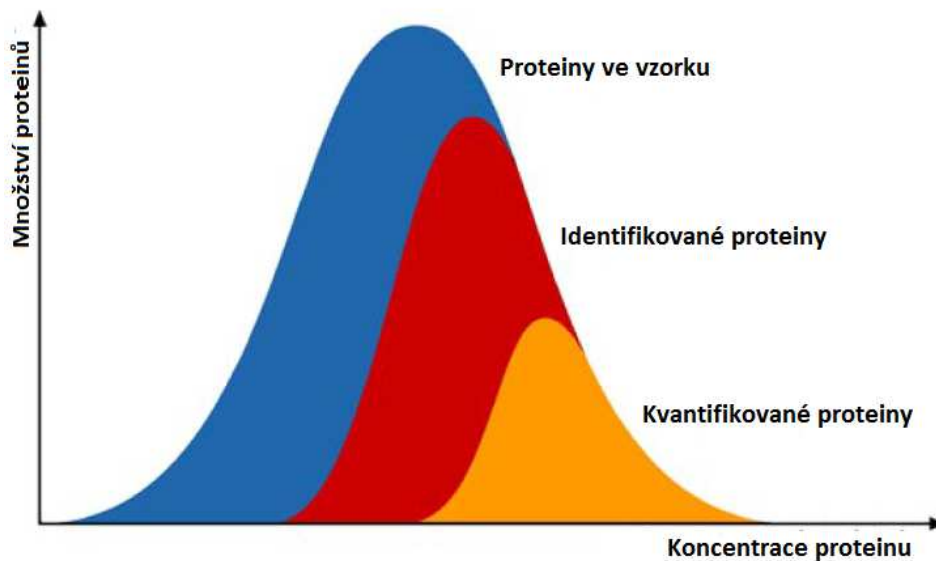
Martinez Molina *et al.*, 2013 při své práci využili metodu Cellular thermal shift assay (CETSA), při které jsou působení různých teplot vystaveny buňky nebo buněčné extrakty inkubované s různými ligandy. Množství cílových proteinů v rozpustné frakci po zahřívání bylo kvantifikováno relativně z intenzity proteinových pásů po Western blotu. Zjistili však, že tato metodika nebyla vhodná pro nehomogenní proteinové vzorky a samozřejmě pro proteiny, u kterých nedochází k tepelné agregaci. O rok později se podařilo spojit metodu CETSA s MS (Savitski *et al.*, 2014) při studiu interakce inhibitorů s kinasami. Bylo zjištěno, že proteiny o menší hmotnosti mají tendenci být stabilnější, než proteiny o hmotnosti větší. Také zjistili, že u buněčných extraktů je T_m proteinů asi o 2,7 °C vyšší, než u intaktních buněk. Stabilita proteinů je tedy ovlivněna biologickou povahou vzorku. Tato práce však byla omezena pouze na studium kinas a nenabízela možnosti použití pro membránové proteiny. Tuto skutečnost překonali Huber *et al.*, 2015, kteří sledovali posuny T_m různých membránových proteinů, oxidoreduktas i hydrolas ve vzorcích buněk karcinomu tlustého střeva. Ke svému studiu opět použili spojení CETSA a MS. Reinhard *et al.*, 2015 prováděli svou studii opět s membránovými proteiny s pomocí metody nazvané termální profilování proteomu. Pro extrakci membránových proteinů v této práci využívali nejrůznější detergenty a zjistili, že jejich použití nemělo žádný na posun křivek získaných pro protein a ligand. Zároveň však dokázali, že s použitím detergentu se T_{agg} snížila průměrně o 2,9 °C. Také bylo zjištěno, že membránové proteiny agregovaly za vyšších teplot s průměrnou T_m 51,6 °C, než proteiny uvnitř buněk s průměrnou T_m 49,5 °C.

2.3 Kvantitativní proteomika

Kvantitativní proteomika je analytický přístup využívaný ke kvantitativní charakterizaci proteinových vzorků. Klasické metody kvantifikace proteinů zahrnují použití specifických barviv, fluoroforů a radioaktivity. Bohužel mají tyto metody určité nedostatky – mnohdy přímo neodhalují identitu proteinů a jsou využitelné spíše pro abundantní a rozpustné proteiny. Tyto problémy jsou ovšem překonány s použitím LC-MS technik. Kvantifikace je však i v tomto případě značně komplikovaná kvůli široké škále fyzikálně chemických vlastností proteolyticky štěpených peptidů, které vedou k rozdílné odezvy hmotnostního analyzátoru. Pro přesnou kvantifikaci je obecně zapotřebí srovnání všech jednotlivých peptidů napříč experimenty. Toho může být dosaženo několika způsoby (Bantscheff *et al.*, 2007). Jeden ze dvou hlavních přístupů využívá ke kvantifikaci proteinů a peptidů izotopické značky či standardy. Novějším přístupem je tzv. label-free kvantifikace. S jeho pomocí dochází ke srovnání dvou či více experimentů přímým porovnáním intenzity signálu pro jednotlivé peptidy (Bondarenko *et al.*, 2002), nebo využitím množství získaných spekter, přiřazených peptidu/proteinu, jako indikátoru jejich množství v daném vzorku (Liu *et al.*, 2004).

Data získaná metodami kvantitativní proteomiky jsou typicky velmi komplexní. Dokonce i ty nejpokročilejší hmotnostní spektrometry jsou přehlceny množstvím peptidů obsažených ve vzorku. Důsledkem je, že během jedné analýzy může být identifikována jen určitá část z celkového množství proteinů ve vzorku (Aebersold, 2003). Pro kvantifikaci proteinů je zapotřebí, aby byl daný protein detekován v rámci všech experimentů, aby mohlo dojít k následnému srovnání. Tato podmínka však není vždy splněna, a tak je možné kvantifikovat opět pouze určitou část z identifikovaných proteinů (Liu *et al.*, 2004; Obr. 1).

Metody kvantitativní proteomiky ovšem neslouží pouze ke kvantifikaci proteinů jako takových, ale nabízejí možnost studovat stabilní či přechodné proteinové interakce a interakce závislé na posttranslačních modifikacích proteinů. V těchto případech poměry stabilních izotopů rozlišují složení bílkovin dvou nebo více proteinových komplexů.



Obr. 1 Schematické znázornění frakcí proteomu, které mohou být identifikovány či kvantifikovány pomocí metod kvantitativní proteomiky, založených na hmotnostní spektrometrii (převzato a upraveno z Bantscheff *et al.*, 2007).

Můžou tak být rozlišeny skutečné komponenty proteinového komplexu a nespecificky asociované proteiny. V případě proteinových komplexů izolovaných z buněk v různých stavech mohou být sledovány dynamické změny proteomu napříč těmito stavy (Blagoev *et al.*, 2003; Ranish *et al.*, 2003).

2.3.1 Proteomické techniky pro kvantifikaci proteinů a peptidů s použitím izotopových značek a standardů

Jeden z hlavních přístupů je založen na teorii izotopového ředění, podle které je izotopově značený peptid chemicky identický se svým neznačeným protějškem a tudíž se tyto dva peptidy budou chovat identicky i během chromatografické či hmotnostní analýzy. Hmotnostní spektrometr dokáže rozlišit hmotnostní rozdíl mezi značenou a neznačenou formou peptidu, díky čemuž je umožněno srovnání intenzit jejich signálů a následná kvantifikace (Gygi *et al.*, 1999). Postupně bylo vyvinuto mnoho metod založených na izotopovém značení a použití standardů, přičemž každá s sebou přináší určité výhody a nevýhody.

2.3.1.1 Metabolické izotopové značení

Metabolické izotopové značení je na rozdíl od ostatních přístupů prováděno *in vivo* a značka je tak zavedena do vzorků již během buněčného růstu a dělení. Následná analýza už probíhá se všemi vzorky současně a jsou tak eliminovány chyby způsobené oddělenou manipulací se vzorky. Další výhodou je, že metoda není limitována maximálním možným množstvím vzorku ke značení (Bantscheff *et al.*, 2007). Nevýhodou ovšem je, že tento způsob značení je možno užít jen na vzorky vycházející z buněčných kultur. Některé buněčné linie jsou navíc na změny složení kultivačního média citlivé a kultivace tak nemusí být zcela úspěšná (Blagoev *et al.*, 2004).

Používají se tři typy metabolického značení. Prvním typem je ^{15}N inkorporace, u které mohou být porovnány dva nezávislé vzorky – jeden kultivovaný v izotopicky obohacených médiích s ^{15}N ionty a druhý ve standardních médiích se ^{14}N ionty (Oda *et al.*, 1999). Podobně probíhá také ^{13}C inkorporace, kdy první vzorek je kultivován na ^{13}C obohacených médiích a druhý na ^{13}C ochuzených médiích (Zamboni *et al.*, 2009). Třetím typem je inkorporace aminokyselin značených stabilními izotopy, zkráceně SILAC. V tomto případě jsou buňky pěstovány v médiu ochuzeném o esenciální aminokyseliny, které jsou naopak nahrazeny izotopově značenými aminokyselinami (např. $^{13}\text{C}_6$ -lysin, $^{13}\text{C}_6$ -arginin), popřípadě pouze jejich přirozenou formou. Tímto způsobem je možné porovnat až tři nezávislé vzorky (Ong *et al.*, 2002). SILAC má ovšem velké omezení z hlediska využití – není možné takto značit bakteriální, tkáňové, ani rostlinné vzorky (Lau *et al.*, 2014).

2.3.1.2 Enzymatické značení

Tento typ značení využívá proteolytické reakce enzymů, kdy je během štěpení do nově vznikajících peptidů začleněn $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ kyslík. Následně dochází jako u jiných metod k porovnání těchto dvou hmotnostních variant peptidů a relativní kvantifikaci pomocí MS. Tímto způsobem tedy mohou být rozlišeny dva nezávislé vzorky (Ye *et al.*, 2009). V případě užití trypsinu pro štěpení dochází na karboxylové skupině C konce peptidů k záměně dvou ^{16}O atomů za dva ^{18}O atomy pocházející z H_2^{18}O vody. Hmotnostní rozdíl mezi srovnávanými peptidy pak odpovídá 4 Da (Schnölzer *et al.*, 1996). Výhodou této metody oproti ostatním metodám založeným na izotopových značkách je, že není založena na značení a tedy i výskytu určitých aminokyselin. Na rozdíl od SILAC je enzymatické značení vhodné pro klinické vzorky omezeného množství (plasma, sérum,

zmrazená tkáň). Navíc je tato metoda finančně nenáročná (Chahrour *et al.*, 2015). Problémem naopak bývá nekompletní začlenění ^{18}O do molekuly a s tím související nepřesnost kvantifikace (Reynolds *et al.*, 2002).

2.3.1.3 Chemické značení

Tyto metody značení využívají *in vitro* chemických reakcí nejrůznějších isotopomerních značek, typických pro konkrétní metodu, se specifickými reaktivními skupinami v proteinech a peptidech. Výhodou tohoto způsobu značení je obecně široká možnost využití pro nejrůznější vzorky, včetně vzorků živočišných i lidských tkání, u kterých metabolické značení selhává.

V roce 1999 byla vyvinuta první metoda s komerčně dostupnými činidly pro kvantitativní porovnání hladin peptidů a proteinů ve dvou vzorcích - ICAT (z ang. Isotope Coded Affinity Tag). ICAT značení využívá reakce biotinylovaných derivátů joadacetamidu s SH-skupinami cysteinů proteinů ve vzorku. Značené peptidy jsou selektivně izolovány na streptavidinových kolonách a analyzovány hmotnostním spektrometrem (Gygi *et al.*, 1999). Další metodou je PhIAT (z ang. Phosphoprotein Isotope-coded Affinity Tag) využívající isotopové značení a biotin pro kvantitativní měření rozdílů mezi fosforylovanými vzorky. Po proteolytickém štěpení jsou značené peptidy opět afinitně zachyceny na avidinovém nosiči a dále analyzovány pomocí LC-MS (Goshe *et al.*, 2001). Neselektivní ICPL (z ang.- Isotope-Coded Protein Labelling) je značení založené na schopnosti N-hydroxysukcinimidových esterů kyseliny nikotinové derivatizovat primární aminoskupiny - tedy vedlejší řetězce lysinů a N-konce proteinů. ICPL reagent je možné využít pro značení až čtyř nezávislých vzorků (Schmidt *et al.*, 2005). Všechny tyto metody patří mezi metody neizobarické, přičemž peptidy s různými značkami mají různou hmotnost a v MS spektru tedy tyto peptidy tvoří samostatné píky.

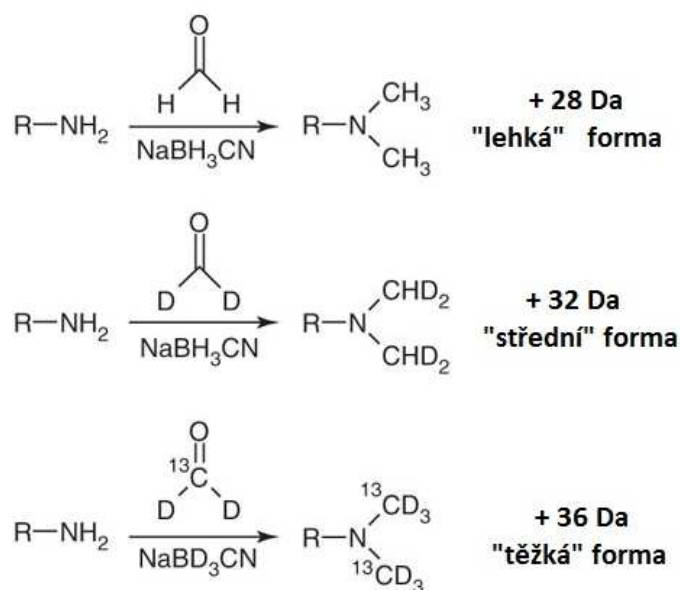
Dalším přístupem jsou metody založené na isobarickém značení. Díky isobarické povaze reagentu je možné vidět jeden peptid ze všech srovnávaných vzorků jako jediný pík v hmotnostním spektru. Díky tomu je redukována hustota dat a překrývání píků cizích peptidů. Isobarická značka obsahuje reaktivní skupinu, reportérovou skupinu a vyrovnávací skupinu navržené tak, aby součet jejich hmotností byl vždy konstantní, ačkoliv jejich dílčí hmotnosti se různí pro různé vzorky (Ross *et al.*, 2004). Značení pomocí ITRAQ (z ang. Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification) vychází

z reakce speciálně připravených činidel s primárními aminy. Nevýhodou této metody je bohužel problematická kvantifikace u komplexních směsí proteinů a špatná detekce peptidů s nízkou abundancí (Karp *et al.*, 2010). Dalším typem isobarického značení je TMT (z ang. Tandem Mass Tag) od firmy ThermoScientific. Stejně jako u metody ITRAQ, i TMT činidlo reaguje opět s primárními aminy ve vzorcích a umožňuje současně relativní a absolutní kvantifikaci (Thompson *et al.*, 2003). Pomocí tohoto značení je možné srovnání až deseti vzorků současně díky kombinaci ^{13}C a ^{15}N isotopů reportérové skupiny (McAlister *et al.*, 2012). Metodika umožňuje pro hmotnostní analýzu využít jak HCD (z ang. Higher-Energy Collisional Dissociation), tak ETD (z ang. Electron transfer Dissociation) typ fragmentace (Xiong *et al.*, 2011; Viner *et al.*, 2009). Problém tohoto typu značení je stejný, jako u značení ITRAQ (Chahrour *et al.*, 2015).

Zvláštním typem strategie pro kvantifikaci proteinů je AQUA (z ang. Absolute Quantification). Na rozdíl od předchozích zmíněných metod využívajících izotopových značek a standardů k relativní kvantifikaci, slouží AQUA již podle názvu ke kvantifikaci absolutní. Metodika zahrnuje použití syntetických isotopově značených peptidů jako standardů. Takové peptidy jsou analogy nativních peptidů vytvořených během štěpení analyzovaného vzorku. Výběr vhodného peptidu je součástí nutné optimalizace každého experimentu (Gerber *et al.*, 2003). Do syntetických standardních peptidů mohou být zaneseny modifikace, např. fosforylace, pro následné porovnání vzorků s posttranslačními modifikacemi a bez nich., což je velkou výhodou (Chahrour *et al.*, 2015). Nevýhodou využití AQUA peptidů je vysoká cena a časová náročnost jejich návrhu a přípravy (Modzel *et al.*, 2014).

N-terminální kvantitativní dimethylace peptidů je metoda, o které bude vzhledem k experimentální části této práce pojednáno podrobněji. Principem této metody je značení proteasou naštěpených peptidů různých vzorků pomocí izotopomerních dimethylových značek. Značené vzorky jsou smíchány a analyzovány současně pomocí LC-MS, zatímco abundance či intenzita peptidů lišících se o definovaný hmotnostní rozdíl vlivem rozdílných izotopomerních značek reprezentují obsah jednotlivých proteinů v různých porovnávaných vzorcích. Značení je založeno na reakci primárních aminů proteasou naštěpených peptidů s formaldehydem za tvorby Shiffovy báze, která je následně redukována přidávkem kyanoborohydridu sodného do směsi (Boersema *et al.*, 2009). V případě tryptických peptidů, které jsou využívány nejčastěji, se peptidy

v tripletu liší po značení o 4 Da v případě štěpení za argininem, v případě štěpení za lysinem o 8 Da, jelikož je značen jak N konec peptidu, tak postranní řetězec lysinu (Obr. 2; Boersema *et al.*, 2008). Ačkoliv by bylo obdobným způsobem možné vytvořit více variant značek, a tedy srovnávat zároveň více než tři vzorky vzniklé značené peptidy by se mezi sebou lišily pouze o 2 Da a interpretace a kvantifikace naměřených dat by byla velmi obtížná a nepřehledná. Výhodou této metody značení je její finanční nenáročnost, možnost značení vzorků se sub-mikrogramovým až miligramovým obsahem proteinů a možnost automatizace provedením reakce online s LC-MS. Hlavní výhodou je však skutečnost, že metoda nepodléhá omezením souvisejícím s původem vzorku. Je tedy možné ji aplikovat na prakticky jakýkoliv biologický vzorek, vzhledem k tomu, že je dimethylace prováděna na úrovni peptidů. Zároveň je však značení na úrovni peptidů nevýhodou v tom smyslu, že štěpení peptidů celý proces časově prodlužuje a dává prostor pro vytvoření chyb ještě před samotným značením. Další nevýhodou může být výskyt izotopového efektu během LC separace (Boersema *et al.*, 2009).



Obr. 2 Schéma značení peptidových triplexů pomocí N-termini kvantitativní dimethylace peptidů (převzato a upraveno z Boersema *et al.*, 2009).

2.3.2 Label-free kvantifikace

Ačkoliv kvantifikační metody využívající izotopové značení skýtají mnohá pozitiva, jejich uskutečnění vyžaduje obecně časově náročnou a složitou přípravu vzorků. Cena mnohých reagensů je navíc mnohdy dosti vysoká. Kromě toho je pomocí izotopových značek, s výjimkou metod TMT a iTRAQ, možné porovnávat pouze 2 až 4 vzorky. Kvantifikace bez izotopických standardů neboli label-free kvantifikace je tedy přístup, který se vyvinul především za účelem usnadnění, urychlení a snížení nákladů kvantifikačního procesu (Zhu *et al.*, 2009). Label-free kvantifikace má však také mnohá úskalí. Na rozdíl od metod založených na izotopových značkách a standardech se každý jednotlivý vzorek z každého biologického stavu analyzuje samostatně a může tak docházet k posunům retenčních časů či m/z hodnot. Následkem je nepřesnost a větší rozptyl naměřených dat a s tím související nutnost velké reprodukovatelnosti opakovaných analýz LC-MS či LC-MS/MS. Z důvodu velkého objemu dat sesbíraných po LC-MS/MS analýze komplexních proteinových směsí je nutná automatizovaná analýza a normalizace těchto dat pro porovnání vzorků mezi sebou (Wiener *et al.*, 2004).

Kvantifikace je obecně založena na dvou kategoriích měření. Prvním případem je relativní kvantifikace pomocí intenzit píků z LC-MS. Normalizace tak vychází z retenčních časů a identifikace peptidů. Po překrytí analyzovaných chromatogramů dochází k analýze ploch píků analýz s definovaným retenčním časem a hodnotou m/z (Chelius a Bondarenko, 2002).

Druhým typem měření je relativní kvantifikace a normalizace na počet analyzovaných spekter příslušejících danému proteinu. Metoda vychází z faktu, že nárůst proteinové abundance má za následek nárůst počtu proteolytických peptidů a obráceně. Tento nárůst počtu naštěpených peptidů znamená zároveň zlepšení pokrytí proteinové sekvence a zvýšení počtu identifikovaných peptidů a počtu celkově identifikovaných MS/MS spekter pro každý protein (Washburn *et al.*, 2001). Pro tento typ kvantifikace existuje však ještě několik dílčích strategií, které se mezi sebou liší porovnáváním odlišných parametrů vedoucích k výsledkům. Jedna z nejznámějších strategií je založena na měření tzv. indexu proteinové abundance (PAI), definovaného jako počet identifikovaných peptidů pro daný protein oproti počtu peptidů, které mohou být z daného proteinu teoreticky získány (Ishihama *et al.*, 2005).

2.4 Příprava vzorku pro MS analýzu

Výsledky získané proteolytickými metodami jsou mimo jiné velmi závislé také na přípravě vzorku. Kritická je především část postupu od štěpení proteinu po koncovou hmotnostní analýzu. Správné navržení a provedení jednotlivých metodických kroků ovlivňuje jak celkovou kvalitu, tak i citlivost analýzy (Rappsilber *et al.*, 2003).

2.4.1 Proteolytické štěpení proteinů

K digesci proteinů je možné využít široké spektrum endoproteas, které jsou více či méně specifické, cenově nákladné a vhodné pro určité typy proteinových vzorků. Zdaleka nejpoužívanějším je však trypsin produkující peptidy velmi vhodné pro následnou MS/(MS) analýzu. Štěpí peptidové vazby na C konci bazických aminokyselin argininu a lysinu. Výsledné peptidy mají velikost od 800-2000 Da. Takto velké peptidy mohou být analyzovány s velkou citlivostí a díky vysoké bazicitě argininu a lysinu jsou během ionizace velmi dobře protonizovány. Nejčastěji využívané způsoby štěpení proteinů jsou štěpení v gelu a štěpení v roztoku (von Hagen, 2008).

Proteolytické štěpení proteinů sestává z několika kroků, které jsou s drobnými úpravami společné pro štěpení v gelu i v roztoku. Rozpuštění a denaturace je prvním krokem úpravy proteinového vzorku. Pro tento účel jsou využívány nejrůznější látky od močoviny, přes další detergenty, surfaktanty a organická rozpouštědla. S pomocí těchto látek tedy dochází k rozrušení kvartérní a terciární struktury proteinu a tedy umožnění či zlepšení průběhu proteolytického štěpení. Nevýhoda je, že po jejich přidání často dojde ke snížení proteolytické aktivity enzymu či k nežádoucí interferenci s hmotnostní analýzou či kapalinovou chromatografií (Strader *et al.*, 2006). Je tedy velmi důležité před hmotnostní analýzou ze vzorku vymýt detergenty a nežádoucí látky před elucí (Lin *et al.*, 2010). Dalším bodem štěpení v roztoku je redukce proteinů. Ta probíhá při vyšší teplotě – standardně 56 °C s redukčním činidlem dithiotreitem (DTT). Redukční činidlo způsobí rozpad disulfidového můstku cystinu na dvě volné sulfhydrylové skupiny cysteinu. Tím dochází k dalšímu rozvolnění terciární struktury proteinu. Po 30-45 minutách inkubace následuje proces alkylace pomocí alkylačního činidla jodacetamidu (IAA). Alkylační činidlo reaguje s volnými sulfhydrylovými skupinami cysteinu za tvorby S-karboxyamidomethylcysteinu, který nemůže být zpětně reoxidován. Dojde tedy k ochraně SH-skupin před opětovným spojením v disulfidový

můstek. Alkylace probíhá 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Redukce a alkylace před samotným štěpením nejsou zcela nutné, ale umožňují trypsinu maximální přístup k místům štěpení, což výrazně zvýší pokrytí proteinové sekvence po MS analýze. V případě proteinového vzorku bez obsahu cysteinů je možné tyto kroky přeskočit. Po alkylaci je možné znovu přidat redukční činidlo. Tento krok slouží ke spotřebování přebytečného alkylačního činidla, které by mohlo alkylovat následně přidaný proteolytický enzym. V případě výběru trypsinu pro štěpení jej následně přidáme v poměru 1:20 - 1:100 (w/w) vzhledem k obsahu proteinu ve vzorku. Proteinový vzorek je ponechán štěpení po 4-18 hodin při 37 °C. Pro vysokou aktivitu trypsinu je vhodné zajistit pH hodnotu vzorku okolo osmi. Pro zastavení reakce je naopak důležité snížit pH na hodnotu 2-3 pomocí kyseliny trifluoroctové (TFA) či kyseliny mravenčí (FA; Gundry *et al.*, 2009).

Samotnému štěpení proteinů v gelu zpravidla předchází jejich separace v gelu pomocí gelové elektroforézy. Součástí bottom-up přístupu v proteomice bývá konkrétně denaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Po jejím provedení jsou obarvené proteinové bandy vyřezány z gelu a proteiny podrobeny štěpení. Štěpení v gelu má oproti štěpení v roztoku tu výhodu, že díky předchozí frakcionaci pomocí elektroforézy mohou být následně analyzovány původně více komplexní vzorky (Aebersold a Mann, 2003; Granvogl *et al.*, 2007). Dalším pozitivem může být usnadněná manipulace se vzorkem například při odstraňování produktů alkylace cysteinu (Štosová *et al.*, 2005).

Štěpení v roztoku je jedna ze standardních technik využívaných v shotgun proteomice. Zahrnuje denaturaci, redukci, alkylaci a digesci proteinového vzorku v kapalně fázi. Jedná se o běžnou, velmi často používanou metodu, která je aplikovatelná na různé typy vzorků (Li *et al.*, 2004). Celý proces štěpení v roztoku může být proveden v jediné zkumavce, čímž je eliminována ztráta vzorku spojená s přenosem vzorku. Výhoda štěpení v roztoku tkví v jeho jednoduchosti a přímočarosti provedení. Dále je nutné menší množství proteinu ve vzorku, než u štěpení v gelu, díky menším ztrátám vzorku (Feist a Hummon, 2015). Další výhodou je vyšší účinnost štěpení, přičemž účinnost štěpení v gelu společně s extrakcí je pouze 70-80% oproti účinnosti štěpení v roztoku (Shevchenko *et al.*, 1996). Běžně jsou proteiny v roztoku štěpeny po několik hodin či přes noc za účelem vytvoření dostatečného a odpovídajícího množství peptidů pro analýzu. I přes dlouhou dobu štěpení však

mnohdy dochází ke vzniku nedostatečného množství peptidů především u hydrofobních a proteolyticky rezistentních proteinů. Tento nedostatek pak vede ke špatné identifikaci proteinů (Russel *et al.*, 2001).

2.4.2 Odsolení a prekoncentrace peptidů

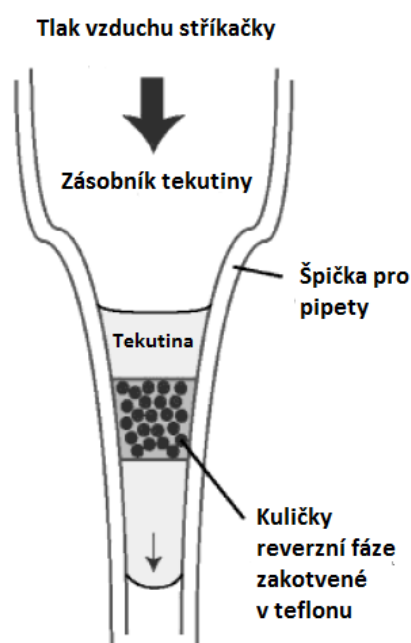
Peptidové vzorky získané proteolýzou obvykle nejsou rovnou podrobeny hmotnostní analýze. Je to z toho důvodu, že koncentrace vzorků a pufrů, ve kterých jsou vzorky rozpuštěny, nejsou kompatibilní s vysoce citlivou MS analýzou (Rappsilber *et al.*, 2003). Pro zakoncentrování a purifikaci vzorků bylo vyvinuto několik metod. Mezi ně patří dialýza, ultrafiltrace, gelová permeační chromatografie, afinitní purifikace a extrakce na pevné fázi (Gilar *et al.*, 2001). Ultrafiltrace a gelová permeační chromatografie však často nezajistí dostatečné odsolení pro MS. Dialýza poskytuje dostatečné odsolení vzorků, ale je poměrně náročné a drahé ji zautomatizovat (Schuette *et al.*, 1995).

Extrakce na pevné fázi neboli SPE (z ang. Solid Phase Extraction) s reverzní fází je rozšířená a dostupná metoda v širokém spektru provedení. Existuje několik požadavků hrajících roli při výběru stacionární fáze. Adsorbent by měl mít co nejmenší vliv aktivity zbytkových silanolových skupin kvůli eliminaci sekundární retence sodných a draselných kationtů a následně jejich možné koeluce se vzorkem. Vzorky by měly být eluovány v co nejmenším objemu tak, aby byl tento objem kompatibilní s požadavky pro MALDI-TOF-MS či ESI-MS analýzu. SPE by také neměla být negativně ovlivněna vysušením sorbentu během extrakce (Gilar *et al.*, 2001). Při klasické extrakci na pevné fázi je adsorbent umístěn v průtokových kolonkách napojených na zdroj vakua. Pro práci s malými objemy vzorku (< 50 μ l) je však výhodnější používat pro dávkovaný vzorek kapiláry, kanálky mikrofluidních zařízení, či špičky pipet (Alwael *et al.*, 2011).

Výhoda SPE ve špičkách pipet je jejich snadné použití, spotřeba menšího množství rozpouštědel a menší objem vzorku. Případně je možné zpracovávat více vzorků současně s použitím multikanálových pipet či robotického systému pro pipetování. Potřebný tlak pro průchod tekutiny špičkou může být aplikován pipetou, stříkačkou, centrifugací či napojením na vakuový manifold (Altun *et al.*, 2010). Provedení špiček pro SPE prošlo od svého zavedení řadou změn kvůli odstranění

určitých problémů. Klíčovými nedostatky byly nižší senzitivita pro malá množství proteinů extrahovaných ve velkém objemu, reprodukivita a robustnost (Rappsilber *et al.*, 2003).

Na odsolování, obohacení, purifikaci a frakcionaci vzorků proteinů lze využít jak komerčně dostupných špiček, tak těch ručně vyrobených. Komerčně dostupné jsou například široce používané špičky ZipTip od společnosti Milipore. Tyto komerční špičky však mají jistá negativa jako relativně vysoká cena, mnohdy neuspokojivé vazebné vlastnosti polymerního adsorpčního materiálu či požadované eluční objemy (Larsen *et al.*, 2002; Steward *et al.*, 2001). Příkladem ručně vyrobených SPE špiček jsou stop-and-go extrakční špičky, zkráceně StageTips (Obr. 3). C18 disky, popřípadě disky jiné reverzní fáze, jsou ručně vyřezávány jehlou ze speciálního porozičního materiálu (např. Empore Disk C18). Následně jsou disky z jehly vytlačeny a přiměřenou silou zatlačeny do špičky. Reverzní fáze může být zakotvena v teflonu a je udržována na místě díky zužujícímu se průměru špičky.



Obr. 3 Schematické znázornění StageTips - ručně vyráběných špiček pro SPE (převzato a upraveno z Rappsilber *et al.*, 2003).

Stejně jako u klasické SPE je reverzní fáze postupně vhodně vybranými roztoky ekvilibrována, aktivována, promyta a poté je nanášen vzorek. Zachycený analyt je následně promýván a eluován. Nevýhodou ručně vyráběných špiček pro SPE je jistě časová náročnost přípravy, pozitivem však je vyšší návratnost peptidů čištěných na StageTips oproti komerčním ZipTips, nižší cenové náklady a větší objemová kapacita (Rappsilber *et al.*, 2003; Steward *et al.*, 2001).

2.5 Hmotnostní spektrometrie v proteomice

Hmotnostní spektrometrie (MS) je mocným nástrojem pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Principem této metody je selektivní izolace iontů ze vzorku podle jejich měrného náboje m/z , tedy hmotnosti k náboji. Tyto ionty v plynné fázi jsou buď pozitivně či negativně nabitě. (Zhang *et al.*, 2013). První přístroj charakteru hmotnostního spektrometru byl zkonstruován v roce 1913, kdy tento přístroj umožňoval pouze analýzu malých anorganických molekul (Thomson, 1913). Dnes jsou s pomocí MS analyzovány i biologické makromolekuly prakticky bez hmotnostních limitů (Zhang *et al.*, 2013).

2.5.1 Ionizační techniky využívané v proteomice

Iontový zdroj je část hmotnostního spektrometru, kde dochází k tvorbě nabitých částic - iontů. Je vstupem do dalších částí přístroje, tedy do analyzátoru a detektoru (Dass, 2007). Proteomický výzkum je s MS technologiemi úzce spojen především od doby vývoje měkkých ionizačních technik – ionizace elektrosperejem (ESI; Yamashita a Fenn, 1984) a laserové desorpční ionizace za spoluúčasti matrice (MALDI; Karas a Hillenkamp, 1988). Termín měkká ionizační technika znamená, že analytu je během ionizace předáno minimum vnitřní energie (Zhang *et al.*, 2013).

ESI-MS je používána ke studiu netěkavých a termicky labilních anorganických látek, stejně tak jako komplexních biologických struktur. Pro ionizaci elektrosprejem je potřeba vzorky rozpustit v polárním pufru či rozpouštědle, tak aby mohly být do ionizačního zdroje zavedeny pod atmosférickým tlakem tenkou kapilárou. Na kapiláru je vloženo napětí 3-4 kV, čímž dojde k tvorbě nabitých kapek, které jsou postupně odpařeny s pomocí horkého inertního plynu (Dass, 2007). Původně byly vzorky zaváděny pod průtokem 2-20 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Whitehouse *et al.*, 1985). Později byl

vyvinut nanosprej, který pracuje při velmi nízkém průtoku nanolitřů za minutu. Výhodou nanospreje je také zlepšený mechanismus tvorby iontů, který je vhodný například pro analýzu glykokonjugátů (Karas *et al.*, 2000).

MALDI je ionizační technika, při které jsou ionty na rozdíl od ESI uvolněny z pevné fáze. Vzorek je nejprve rozpuštěn ve vhodném solventu a smíchán s nadbytečným množstvím vhodně vybrané matrice. Následně je takto připravený vzorek nanesen na MALDI destičku a ponechán volně krystalovat. Vzorek je převeden do plynné fáze pomocí laserového paprsku. Dojde totiž k absorpci energie laseru matricí a následné desorpci a ionizaci analytu ve vzorku (Karas a Hillenkamp, 1988; Zhang *et al.*, 2013).

2.5.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor je část přístroje, kde dochází k separaci iontů podle jejich m/z hodnot. Existuje mnoho typů analyzátorů, potřebněji však budou rozebrány dva - kvadrupólový analyzátor a analyzátor doby letu, které později daly díky svému spojení vzniknout hybridní technologii Q-TOF

Kvadrupólový analyzátor je složen ze čtyř paralelních elektrických tyčí. Na dvou tyčích je vloženo napětí stejnosměrného proudu a na zbylých dvou radiofrekvenční napětí. Ionty jsou elektrickou silou nasměrovány do kvadrupólu. Změnami hodnot napětí na tyčích a frekvence je korigován průchod iontů s různými hodnotami m/z skrz kvadrupól. Ty ionty, co neprojdou skrz, narazí na některou z tyčí, kde se vybijí. Kvadrupól tak funguje jako iontový filtr. Hlavní výhodou kvadrupólového analyzátoru je jeho nízká cena, malá velikost, robustnost a snadná údržba. Je však limitován hmotnostním rozsahem analyzovaných m/z hodnot iontů, nízkým rozlišením a neumožňuje fragmentaci MS/MS (Zhang *et al.*, 2013).

Analyzátor doby letu TOF (z ang. Time Of Flight) je založen na průletu ionizovaných molekul 1-2 metry dlouhou trubicí před dosažením detektoru. Pokud jsou dva ionty vytvořeny ve stejný čas a mají stejný náboj, dorazí do detektoru za stejný čas. Využívá se tedy závislosti m/z hodnoty iontů na čase (Schlag, 2012). Nevýhodou je, že některým iontům o stejné m/z je udělena jiná kinetická energie E_k . Ion s vyšší E_k tak dosáhne detektoru rychleji, což vede ke špatnému rozlišení iontů. Řešením je připojení součástky zvané refleatron. Díky ní ionty o větší E_k letí hlouběji do iontového zrcadla

reflektronu a urazí delší dráhu, následkem čehož jsou na detektoru fokusovány ionty se stejnou hodnotou m/z (Mamyrin a Shmikk, 1979). Na druhou stranu dochází u reflektornových TOF analyzátorů ke ztrátám iontů a mají tak menší citlivost. Výhodou TOF analyzátorů je téměř neomezený hmotnostní rozsah analyzovaných m/z v případě uspořádání bez reflektornu (Zhang *et al.*, 2013).

2.5.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie tkví v izolaci specifické hodnoty m/z prekurzorových iontů, které mohou být podrobeny disociaci a následné produkci fragmentů rodičovského iontu. K tomu je třeba spojení dvou a více hmotnostních analyzátorů v prostoru či čase. První analyzátor slouží typicky k izolaci iontu, druhý na tvorbu iontových fragmentů v kolizní cele a koncový analyzátor separuje tyto fragmenty podle m/z hodnot (Zhang *et al.*, 2013). Jedním z běžně užívaných tandemových hmotnostních analyzátorů je trojitý kvadrupólový analyzátor označovaný QqQ. Jde o prostorové spojení tří kvadrupólů, přičemž prostřední slouží jako kolizní cela (Yost a Enke, 1978).

Hybridní hmotnostní analyzátor je takový, který spojuje více analyzátorů různého typu. Jedním z hybridních analyzátorů je Q-TOF. Skládá se ze dvou kvadrupólů a jednoho analyzátoru doby letu. Výhodou takového uspořádání je kombinace kladných vlastností obou typů dílčích analyzátorů. Q-TOF tak disponuje skenovacími vlastnostmi kvadrupólu a zároveň vysokým rozlišením průletového analyzátoru. Poskytuje informace jak v jednoduchém a rychlém MS módu, tak v tandemovém MS/MS módu. Další výhodou je možnost spojení s ESI i MALDI ionizací (Morris *et al.*, 1996; Ens a Standing, 2005).

2.6 Alkalická fosfatasa

Alkalická fosfatasa (ALP; E.C. 3.1.3.1.) je hojně rozšířený nespecifický enzym katalyzující hydrolýzu fosfátových monoesterů při bazických hodnotách pH. ALP je ovšem také fosfodiesterasa a v přítomnosti vysoké koncentrace fosfátových akceptorů je tento enzym schopen fosfotransferázových reakcí (Millán, 2006). Jako substráty ALP jsou v laboratorní praxi nejčastěji využívány syntetické estery jako *p*-nitrofenylfosfát (*p*NPP) či fenylfosfát. Enzym bývá využíván nejčastěji v laboratořích molekulární

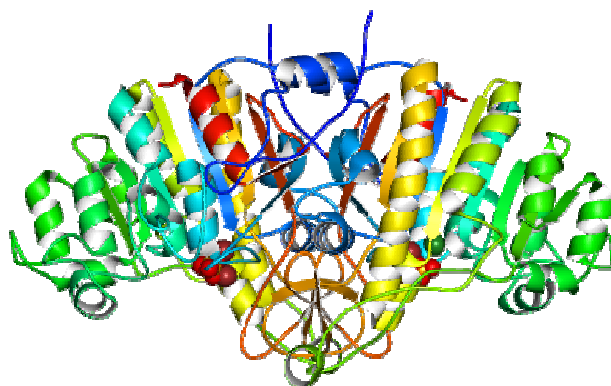
biologie pro defosforylaci nukleotidů či jako značka při enzymové imunoanalýze (McComb *et al.*, 1979; Aizawa, 1994). Užití nachází též v mlékárenství jako indikátor účinnosti pasterizace (Kay, 1935). V neposlední řadě má alkalická fosfatasa klinický význam pro diagnózu širokého spektra onemocnění (McComb *et al.*, 1979).

Alkalická fosfatasa se v přírodě nachází v různých strukturních formách. Vzhledem k tomu, že je tento enzym součástí nejrůznějších organismů od prokaryot po eukaryota s výjimkou některých vyšších rostlin, strukturní odlišnosti jsou reakcí na přizpůsobení se životním podmínkám daného organismu (Sharma *et al.*, 2014). Savčí ALP má kupříkladu oproti bakteriální ALP bazičtější pH optimum, je vázaná na membránu nebo má vyšší hodnoty K_m a specifické aktivity (Millán, 2006).

Nejlépe je prostudovaná alkalická fosfatasa z *Escherichia coli* (Obr. 4). Enzym se zde nachází ve formě dimeru o M_r přibližně 94000 Da s identickými podjednotkami (Besman a Coleman, 1985).

Součástí enzymu jsou čtyři zinečnaté ionty a dva ionty hořečnaté, přičemž se zinek nachází v aktivních místech A a B a hořčík v aktivním místě C jednotlivých podjednotek. Plně aktivní formu ALP lze tedy označovat jako nativní $(Zn_A Zn_B Mg_C)_2$ enzym. Ačkoliv sekvenční homologie mezi ALP z *E. coli* a ALP z vyšších organismů dosahuje pouze 25-30 %, oblasti aktivních míst napříč různými organismy jsou vysoce konzervované s rozdíly pouze na třech pozicích (Holtz a Kantrowitz, 1999).

Mechanismus reakce zahrnuje formaci nekovalentního fosfátového komplexu, kdy dva atomy kyslíku z fosfátu tvoří fosfátový můstek mezi Zn_A a Zn_B , zatímco dva zbylé kyslíky fosfátu tvoří vodíkové vazby s guanidinovou skupinou Arg166 enzymu. To umožňuje udržet v požadované pozici reziduum Ser102, které zodpovídá za iniciaci nukleofilní reakce na fosfát a je během hydrolýzy fosfátu fosforylováno. Aktivní místo C s hořečnatým iontem není v dostatečné blízkosti na to, aby se mohlo přímo podílet na mechanismu hydrolýzy fosfátu. Hořčík však hraje nezastupitelnou roli při stabilizaci enzymu v jeho nejaktivnější konformaci díky síti vodíkových vazeb a elektrostatickému poli v okolí aktivního místa (Coleman, 1992; Holtz a Kantrowitz, 1999).



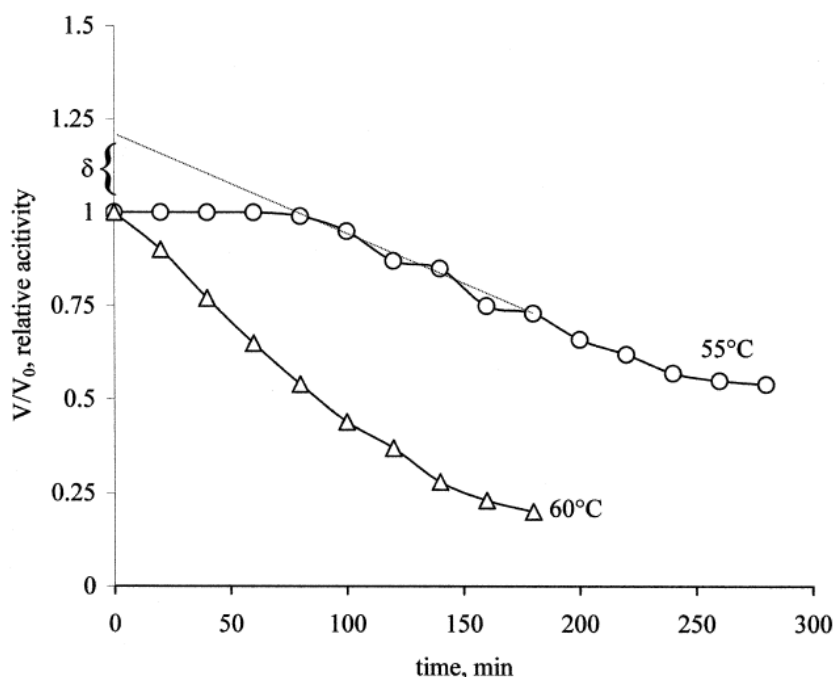
Obr. 4 Schéma prostorové struktury alkalické fosfatasy z *E. coli*. (převzato z Kim a Wyckoff, 1991).

U savců se alkalická fosfatasa nachází ve velkém množství v játrech, střevech, placentě, kostech a ledvinách. Podle tkáně, ve které dochází k expresi, tedy rozlišujeme čtyři izozymy tohoto enzymu – intestinální ALP, placentální ALP, ALP zárodečných buněk a tkáňově nespecifickou ALP nebo také L/B/K ALP (z ang.-jaterní, kostní, ledvinná; Sharma *et al.*, 2014). Savčí ALP je stejně jako u *E. coli* dimer, ovšem s průměrnou molekulovou hmotností okolo 120000 Da, přičemž podjednotky jsou větší a glykosylované (Besman a Coleman, 1985). V experimentální části této práce je využívána intestinální alkalická fosfatasa, jejíž molekulová hmotnost je okolo 160000 Da. Stabilita této AP je nejvyšší při pH 7,5 – 9,5. V kyselém prostředí naopak dochází u tohoto enzymu k inaktivaci, avšak je možná ochrana proti denaturaci v kyselém prostředí zprostředkovaná přítomností anorganického fosfátu (Fosset *et al.*, 1974).

Mezi nejznámější inhibitory savčí alkalické fosfatasy patří L-homoarginin, levamisol a fosfát, který za vhodných podmínek vystupuje také jako substrát ALP. L-homoarginin a levamisol ovšem nepůsobí na placentální a intestinální formu enzymu (Fishman a Sie, 1970). V této práci byl k inhibici hovězí intestinální alkalické fosfatasy použit L-fenylalanin. Stejnou látku k inhibici krysí intestinální ALP použili ve své práci Ghosh a Fishman (1966). Zjistili, že stupeň inhibice ALP L-fenylalaninem při použití fenylfosfátu jako substrátu je silně závislý na hodnotě pH prostředí reakce, a že optimální pH pro inhibici je 10,2. Také bylo zjištěno, že daná inhibice je nekompetitivního typu a je výrazně ovlivněna koncentrací substrátu i inhibitoru. Později bylo objasněno, že inhibitor v tomto případě nemá vliv na tvorbu komplexu

enzym-substrát, ale že zabraňuje uvolnění anorganického fosfátu v konečné fázi reakce (Fernley a Walker, 1970).

Termostabilita savčí alkalické fosfatasy je výrazně nižší, než termostabilita tohoto enzymu z *E. coli*. Navíc se hodnoty tepelné stability liší v případě jednotlivých isoformů savčí ALP, přestože mechanismus tohoto typu inaktivace je u všech isoformů stejný. U intestinální a tkánově nespecifické ALP je aktivita výrazně potlačena při teplotách vyšších než 65 °C, kdežto placentální ALP je až pozoruhodně stabilní – může být zahřívána na teplotu 65 °C po celou hodinu, aniž by došlo ke snížení aktivity (Sharma *et al.*, 2014). Bylo zjištěno, že u bovinní intestinální alkalické fosfatasy se konec indukční periody, tedy fáze předcházející hlavnímu procesu tepelné inaktivace, objevuje při 55 °C. Mechanismus tohoto procesu je však značně závislý na experimentálních podmínkách dané reakce, a tak je potřeba zmínit, že této hodnoty bylo dosaženo při pH 7,5 v Tris- HCl pufru a *p*-NPP užitým jako substrát. Se zvyšující se teplotou (60 °C) může dojít k úplnému zániku indukční fáze (Obr. 5; Poltorak *et al.*, 1999).



Obr. 5 Křivky tepelné inaktivace bovinní intestinální APL vyjádřené jako závislost relativní aktivity na čase při dané teplotě (převzato z Poltorak *et al.*, 1999).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Alkalická fosfatasa z hovězí střešní sliznice, ≥ 10 DEA/mg (Sigma Aldrich, Německo)

BSA, 99% electrophoresis grade (Sigma Aldrich, Německo)

Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck, Německo)

Dithiotreitol (Serva, Německo)

Dodecylsírán sodný (Serva, Německo)

Formaldehyd 20% in D₂O (Cambridge Isotope Laboratories, USA)

Formaldehyd 37% (Sigma Aldrich, USA)

Glycin (Sigma Aldrich, USA)

Hydroxid amonný ≥ 25 % (Fluka, Švýcarsko)

Isopropanol (Merck, Německo)

Jodacetamid (Sigma Aldrich, USA)

Kyanoborohydrid sodný (Sigma Aldrich, USA)

Kyselina mravenčí ≥ 98 % (Sigma Aldrich, Německo)

Kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR)

Kyselina trihydrogenfosforečná (Sigma Aldrich, Německo)

Laemliho pufr 2x koncentrovaný (Sigma Aldrich, Německo)

LC-MS grade voda (Merck, Německo)

L-fenylalanin (Sigma Aldrich, USA)

Methanol pro LC-MS (Biosolve, Francie)

Močovina (Sigma Aldrich, USA)

N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin , TEMED (Merck, Německo)

n-butanol (Sigma Aldrich, USA)

Peroxodisírán amonný, APS (Serva, Německo)

p-nitrofenylfosfát (Sigma Aldrich, USA)

Proteinový standard Precision Plus, Unstained, (Biorad, USA)

Sírán amonný (Merck, Německo)

TEAB pufr pro HPLC, 1M (Fluka, Švýcarsko)
Trisaminomethan (MP Biomedicals, Francie)
Trypsin modifikovaný rafinosou 200 μ M – připravil prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Trypsin, Sequencing Grade, modifikovaný, >5000 u/mg (Promega, USA)

3.1.2 Použité přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Radwag, Polsko)
Centrifuga 5702 (Eppendorf, Německo)
Centrifuga MiniSpin (Eppendor, Německo)
Digitální pH metr (XS Instruments, Čína)
Elektromagnetická míchačka (Chromservis, ČR)
Extrakční disky C18 (Dyneon LLC, USA)
Hmotnostní spektrometr maXis UHR-Q-TOF (Bruker Daltonik, Německo)
Indikátorové papírky pH 0,0 – 6,0 (Sigma Aldrich, USA)
Indikátorové papírky pH 0,0 – 14,0 (Sigma Aldrich, USA)
Inkubátor zkumavek Drybath (Major Science, USA)
Kapalinový chromatograf Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
Laboratorní skener Umax U9908-HAR0 (Amersham Bioscience Corp, USA)
Rotační odparka Concentrator plus (Eppendorf, Německo)
Sada pipet Eppendorf Research (Eppendorf, Německo)
Spektrofotometr Lightwave II (WPA Biochrom)
Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)
Thermostat plus (Eppendorf, Německo)
Total Recovery vialky (Waters, USA)
Třepačka Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH)
Ultrazvuková čistička (Kraintek, ČR)
Ultrazvuková lázeň (VWR International, USA)
Váha laboratorní (VIBRA, Japonsko)
Vortex V-1 Plus (Biosan, Litva)
Zařízení pro elektroforézu Mini protean (Bio-Rad, USA)
Zdroj k elektroforéze (Biorad, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Stanovení celkové koncentrace proteinů v roztoku alkalické fosfatasy metodou Bradforda

Jako vzorový protein byla v této práci použita intestinální alkalická fosfatasa z hovězí sliznice zakoupená ve formě lyofilizovaného prášku od firmy Sigma Aldrich. Množství ALP, resp. celkové množství všech proteinů obsažených v tomto produktu, bylo měřeno spektrofotometricky metodou Bradforda. K měření bylo použito činidlo s obsahem barviva Coomassie Brilliant Blue G-250, metanolu a kyseliny fosforečné, dostupné jako součást kitu od firmy Biorad. Pro vytvoření řady kalibračních standardů sloužil roztok hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentracích 125, 250, 500, 750 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako vzorek sloužil roztok ALP s teoretickou koncentrací 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno vždy 10 μl standardu či vzorku a následně 200 μl činidla. Po 10 min inkubace byla měřena absorbance při 595 nm.

3.2.2 Štěpení proteinů v roztoku

Pro štěpení proteinů v roztoku byly vytvořeny zásobní roztoky BSA o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a alkalické fosfatasy o koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 32 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ve vodě. Požadované množství zásobního roztoku proteinu bylo smícháno s TEAB pufrům o koncentraci 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro vytvoření pracovního roztoku proteinu. Koncentrace proteinu ve vzorku se lišila dle potřeb jednotlivých experimentů a je popsána v podkapitolách níže popisujících provedení těchto experimentů. Z pracovního roztoku proteinu bylo odebráno množství odpovídající objemu štěpícího roztoku do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml. Tyto a všechny další objemy použitých roztoků jsou uvedeny v Tab. 1. K proteinovému roztoku byla přidána močovina o koncentraci 8 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Poté bylo přidáno redukční činidlo dithiothreitol (DTT; $c = 50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a vzorky byly umístěny na Thermomixer, kde byly protřepávány a redukovány po dobu 45 min při 56 °C při 300 rpm. Následně bylo přidáno alkylační činidlo jodacetamid (IAA; $c = 330 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), obsah mikrozkušavek byl šetrně promíchán poklepáním prstem a ponechán 30 min alkylaci ve tmě při laboratorní teplotě. Poté bylo opět přidáno redukční činidlo DTT pro spotřebování přebytečného alkylačního činidla.

Tab. 1 Objemy dílčích složek využitých pro štěpení proteinů v roztoku

objem roztoku pro štěpení	200 μ l	100 μ l	50 μ l
protein + 100 mM TEAB	5 μ l	2,5 μ l	1,25 μ l
8M močovina	15 μ l	7,5 μ l	3,75 μ l
55 mM DTT	4 μ l	2 μ l	1 μ l
330 mM IAA	4 μ l	2 μ l	1 μ l
55 mM DTT	8 μ l	4 μ l	2 μ l
10 mM TEAB	164 μ l	82 μ l	41 μ l
trypsin + 10 mM TEAB	(2 μ l)	(2 μ l)	(2 μ l)
98% FA	10,1 μ l	5,1 μ l	2,6 μ l

Poté byly na thermomixeru vzorky třepány po dobu 30 min při 56 °C. Dále byl ke vzorkům přidán TEAB pufr pro zředění močoviny. Vzorky proteinů byly proteolyticky štěpeny pomocí trypsinu. Zásobní roztok trypsinu byl ředěn na různé koncentrace popsané níže v rámci dílčích experimentů. K ředění zásobního roztoku trypsinu sloužil vždy TEAB pufr o koncentraci 10 mmol.l⁻¹. Z vytvořených pracovních roztoků byly do mikrozkuvek se vzorky odebírány zpravidla 2 μ l, ačkoliv tento objem nebyl závislý na objemu štěpící reakce a mohl tak být měněn podle požadované koncentrace. Po šetrném promíchání a krátkém stočení byly vzorky ponechány inkubaci v thermomixeru přes noc při 37 °C. Následujícího dne byla proteolytická reakce zastavena přidávkem 98% kyseliny mravenčí o objemu 20krát menším, než celkový objem vzorku v mikrozkuvce.

3.2.2.1 Zjištění optimálního objemu reakce pro štěpení

Za účelem zjištění, v jakém objemu roztoku dochází k nejúčinnějšímu štěpení proteinů, byl použit BSA. Tento protein byl štěpen pomocí trypsinu ve 200 μ l, 100 μ l a 50 μ l štěpícího roztoku podle Tab 1. Pro každou ze tří variant objemů roztoku pro štěpení bylo zhotoveno 6 vzorků. Ve všech vzorcích bylo zachováno stejné množství štěpeného proteinu – 2 μ g. Pro samotné štěpení byl použit 200 μ mol.l⁻¹ zásobní roztok trypsinu modifikovaného rafinosou (Šebela *et al.*, 2006). V tomto experimentu byla použita koncentrace trypsinu v poměru 1:20 vzhledem ke koncentraci štěpeného proteinu Pracovní roztok trypsinu měl tedy takovou koncentraci, aby se po přidání 2 μ l tohoto roztoku nacházelo ve vzorku 0,1 μ g trypsinu. Po štěpení v roztoku byly peptidové vzorky přečištěny na reverzní fázi pomocí StageTips technologie (Kap. 3.2.5). V poslední fázi byly vzorky podrobeny LC-MS analýze (Kap. 3.2.9), po které byla

srovnána kvalita identifikace proteinů, množství uvolněných peptidů, jejich reprodukovatelnost a také kvalita získaných hmotnostních spekter pro jednotlivé varianty objemů štěpících roztoků ve vzorcích.

3.2.2.2 Zjištění optimální koncentrace trypsinu

V rámci tohoto experimentu došlo ke štěpení vzorků BSA a ALP s obsahem různého množství těchto proteinů a zároveň různých koncentrací trypsinu vzhledem k proteinu. Tentokrát byly vzorky také značeny pomocí reduktivní dimethylace (Kap. 3.2.3) s použitím těžké značky jako standardu a lehké značky pro jednotlivé vzorky s různou koncentrací proteinu a trypsinu. V objemu 50 μ l byly štěpeny vzorky obsahující 1 μ g, 2,5 μ g a 5 μ g BSA či ALP. Pro každou z proteinových koncentrací byl štěpen vzorek s koncentrací přidaného trypsinu 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 a 1:100 vzhledem k množství proteinu. Celkem tedy bylo vytvořeno 15 vzorků pro BSA a 15 vzorků pro ALP, které byly po štěpení značeny lehkou značkou. V objemu 100 μ l byl štěpen jeden vzorek obsahující 80 μ g BSA či ALP, který byl následně značen těžkou značkou. Po naznačení byl tento vzorek rozdělen na 16 alikvotů, kdy na každý z patnácti vzorků připadalo 5 μ g těžce značeného standardu. Po smíchání tak došlo k vytvoření vzorků s poměrem lehké a těžké značky (L:H) 1:5, 1:2 a 1:1. Následně byly vzorky podrobeny odsolení a LC-MS/MS analýze. Získaná data byla použita k vyhodnocení optimální koncentrace trypsinu pro štěpení proteinů v roztoku. Také byl sledován počet identifikovaných peptidů u jednotlivých proteinů. Kromě samotného BSA a ALP byla vyhodnocována také data získaná pro serotransferin, který byl součástí vzorků ALP vzhledem k nižšímu obsahu tohoto proteinu v zakoupeném produktu. Pro účely dalších experimentů byly pro ALP vybrány peptidy s vysokou intenzitou a vhodným aminokyselinovým složením.

3.2.2.3 Zjištění vlivu trypsinové koncentrace na dosažení odpovídajícího poměru L:H

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda má koncentrace trypsinu při štěpení proteinových vzorků vliv na přesnost poměrů L:H po smíchání těchto vzorků. Za tímto účelem bylo vytvořeno 15 vzorků s obsahem 5 μ g ALP ve vzorku. Tyto vzorky byly následně štěpeny v objemu 50 μ l v triplikátech trypsinem v poměrech 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 a 1:100 vzhledem k obsahu ALP.

Těchto 15 vzorků bylo značeno lehkou značkou. Dále byl připraven standard, kdy v objemu 100 μl byl štěpen jeden vzorek obsahující 80 μg ALP. Ten byl následně značen těžkou značkou. Po naznačení byl tento vzorek rozdělen na 16 alikvotů, kdy na každý z patnácti vzorků připadalo 5 μg těžce značeného standardu. Po smíchání tak došlo k vytvoření vzorků s poměrem L:H 1:1. Následně byly vzorky podrobeny odsolení a LC-MS/MS analýze. Ze získaných dat byly vyhodnocovány pouze dva peptidy ALP vybrané v předchozím experimentu jako nejvhodnější.

3.2.2.4 Štěpení s využitím komerčního purifikovaného trypsinu

Účelem tohoto experimentu bylo porovnat, nakolik se liší kvalita dat naměřených pro vzorky ALP štěpené dvěma různými roztoky trypsinu. Roztok prvního trypsinu modifikovaného rafinosou, využívaný ve všech dosavadních experimentech, byl připravován dle práce (Šebela *et al.*, 2006). Tento zásobní roztok byl připravován v koncentraci 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Druhý roztok trypsinu byl připraven z komerčně dostupného purifikovaného produktu od firmy Promega upraveného reduktivní metylací. Pro vytvoření zásobního roztoku bylo zapotřebí rozpustit 20 μg lyofilizovaného trypsinu ve 100 μl 50 mmol.l^{-1} octovové kyseliny.

Pro obě varianty trypsinu bylo připraveno 15 vzorků, které v triplicátech obsahovaly 1, 2,5, 5, 10 a 25 μg ALP. Tyto vzorky byly štěpeny trypsinem, jehož koncentrace byla v poměru 1:60 oproti množství proteinu ve vzorku. Následně došlo ke značení těchto vzorků lehkou značkou. Zároveň bylo k oběma sadám 15 vzorků štěpeno dalších 15 vzorků standardů obsahujících vždy 5 μg ALP. Po značení těžkou značkou byly vzorky standardů přidány k mikrozkušavkám s obsahem ALP o různé koncentraci. Poté došlo k přečištění vzorků pomocí StageTips a LC-MS/MS analýze. Data byla vyhodnocována pro vybrané peptidy ALP, ale také BSA a serotransferinu, které jsou součástí zakoupeného enzymu ALP. Byly sestrojeny kalibrační křivky vybraných peptidů všech tří proteinů. Kvalita získaných dat po štěpení vzorků dvěma různými roztoky trypsinu byla porovnávána na základě poměrů tryptických a chymotryptických peptidů a celkového počtu tryptických peptidů. K vyhodnocení těchto parametrů byly použity vzorky s obsahem L:H 1:1.

3.2.2.5 Štěpení vzorků po tepelném ovlivnění a interakci s ligandem

Provedení tohoto experimentu bylo konečným krokem experimentální práce. Cílem bylo zjistit, zda přítomnost substrátu *p*-nitrofenylfosfátu (*p*-NPP) a inhibitoru L-fenylalaninu ALP ovlivňuje jeho termostabilitu. Byly použity dříve připravené alikvoty vzorků ALP. Tyto vzorky tedy obsahovaly pouze ALP, ALP a inhibitor či ALP a substrát. Byly podrobeny zahřívání na 9 různých teplot – 20, 35, 43, 50, 56, 62, 68, 75 a 90 °C. Podrobná příprava těchto vzorků je popsána v Kap. 3.2.8. Pro každou teplotu a kombinaci ALP/ALP + inhibitor/ALP + substrát byl k dispozici 1 vzorek. V případě, že by během zahřívání nedošlo k agregaci proteinů a jejich vyloučení ze vzorku, by připravené alikvoty obsahovaly 5 µg ALP. Vzorky byly štěpeny komerčním purifikovaným trypsinem v objemu 50 µl v poměru 1:60 vzhledem k předpokládanému množství 5 µg proteinů ve vzorku, ačkoliv se měla koncentrace proteinů vlivem teploty snižovat. Ke všem těmto 27 vzorkům byly připraveny standardy, které obsahovaly 5 µg ALP. Tyto standardy byly štěpeny za stejných podmínek jako vzorky po tepelném ovlivnění. Po proteolytickém štěpení byly zahřívání vzorky podrobeny značení lehkou značkou a standardy značení těžkou značkou. Následně byly vzorky po zahřívání smíchány se standardy, odsoleny pomocí StageTips a analyzovány pomocí LC-MS/MS.

3.2.3 Reduktivní dimethylace peptidů

Reduktivní dimethylace vzorků probíhala dvěma způsoby. Nejprve byla těžká značka plnicí funkci standardu přidávána pouze do jednoho vzorku s obsahem 80 µg proteinu. Tento vzorek byl následně dělen na alikvoty a rozpipetován do jednotlivých vzorků značených lehkou značkou. Objemy a koncentrace látek přidávaných do reakce v tomto případě jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. 2). Později byl pro každý vzorek značený lehkou značkou používán jeden standard štěpený a značený samostatně. Pro tento případ jsou informace o jednotlivých složkách přidávaných ke vzorkům uvedeny též v tabulce (Tab. 3).

Vzorky po proteolytickém štěpení v roztoku byly nejprve krátce stočeny. Následně bylo štěpení zastaveno přidávkem 98 % FA (Tab. 1). Poté byly vzorky odpařeny téměř do sucha pomocí vakuové odparky po dobu asi 45 min. Následně byl k odparkům přidán 100 mmol.l⁻¹ TEAB pufr pro rozpuštění. U rozpuštěných a promíchaných vzorků bylo třeba upravit pH na hodnotu mezi 5-8,5. K tomu byl použit

opět TEAB pufr, ovšem o koncentraci 1 mol.l^{-1} . K ověření pH byly využity indikátorové papírky s rozsahem pH 0,0 – 14,0. Poté byl pro vnesení lehké značky do vzorků použit roztok formaldehydu CH_2O , kdežto pro vnesení těžké značky do vzorků roztok deuterovaného formaldehydu CD_2O . Vzorky byly krátce promíchány a stočeny na dno zkumavky. Následně byl k obsahu mikrozkuvek přidán roztok kyanoborohydridu sodného NaBH_3CN . Takto byly vzorky inkubovány v termomixeru při 700 rpm a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 40 min. Po inkubaci byly vzorky promíchány, stočeny na dno zkumavky a kroky od přidavku $\text{CH}_2\text{O}/\text{CD}_2\text{O}$ po přidavek NaBH_3CN , včetně inkubace, byly opakovány. Poté byly vzorky přeneseny na led a do digestoře pro další manipulaci. Značení bylo zastaveno přidavkem 1% NH_4OH . Po zamíchání a stočení byla ke vzorkům přidána 5% FA. Následně došlo ke smíchání vzorků značených lehkou a těžkou značkou. Nakonec byly vzorky s určitým poměrem L:H odpařeny téměř do sucha na vakuové odparce. Pro následnou purifikaci vzorků pomocí StageTips byly vzorky rozpuštěny ve $100 \mu\text{l}$ 5% FA.

Tab. 2 Objemy a koncentrace složek přidávaných ke vzorkům pro značení v případě použití pouze jednoho těžce značeného vzorku děleného na alikvoty.

Značení lehkou značkou		Značení těžkou značkou	
100 mmol.l^{-1} TEAB	100 μl	100 mmol.l^{-1} TEAB	100 μl
1 mol.l^{-1} TEAB	(8 μl)	1 mol.l^{-1} TEAB	(8 μl)
4% CH_2O	8 μl	20% CD_2O	8 μl
0,6 mol.l^{-1} NaBH_3CN	8 μl	6 mol.l^{-1} NaBH_3CN	4 μl
1% NH_4OH	32 μl	1% NH_4OH	160 μl
5% FA	16 μl	5% FA	80 μl

Tab. 3 Objemy a koncentrace složek přidávaných ke vzorkům pro značení v případě použití odpovídajícího množství samostatně štěpených a těžce značených standardů.

Značení lehkou značkou		Značení těžkou značkou	
100 mmol.l^{-1} TEAB	100 μl	100 mmol.l^{-1} TEAB	100 μl
1 mol.l^{-1} TEAB	(8 μl)	1 mol.l^{-1} TEAB	(8 μl)
4% CH_2O	8 μl	4% CD_2O	8 μl
0,6 mol.l^{-1} NaBH_3CN	8 μl	0,6 mol.l^{-1} NaBH_3CN	8 μl
1% NH_4OH	32 μl	1% NH_4OH	32 μl
5% FA	16 μl	5% FA	16 μl

3.2.4 Příprava StageTips mikrokolon

Jako stacionární fáze byly využity extrakční disky 3M C18 (Dyneon LLC, USA), ze kterých byly dutou jehlou vykrojeny menší disky o průměru asi 1 mm. Tyto drobné disky byly vytlačeny z jehly ven a současně umístěny do žluté 200 µl špičky se zkráceným - zastřiženým horním okrajem. Do jedné špičky byly vždy vloženy současně dva disky vzhledem k tomu, že kapacita jednoho disku je 5 µg. Následně byly do víček mikrozkmavek o objemu 1,5 ml vytvořeny otvory pomocí kovové pinzety. Do těchto otvorů byly upevněny připravené StageTips.

3.2.5 Odsolování vzorků

Ke vzorkům přímo po proteolytickém štěpení jsem přidala 98% kyselinu mravenčí (FA) tak, aby její objemový zlomek v celkovém objemu byl 5 % (Tab. 1) a lehce jsem vzorky promíchala. V případě vzorků po dimethylaci peptidů byl tento krok proveden již dříve. Nutné bylo u vzorků zajistit $\text{pH} < 5$, k čemuž byly využity indikátorové papírky s rozsahem $\text{pH} 0,0 - 6,0$. Mezitím byla provedena aktivace reverzní fáze připravených StageTips kolon pomocí 50 µl isopropanolu a centrifugací po dobu 3 min při 3000 g v ekvilibračních mikrozkmavkách. Poté byla provedena ekvilibrace reverzní fáze na počáteční podmínky pomocí 50 µl 5% FA (2x), kdy centrifugace trvala 3 min při 2500 g. Následně byly StageTips mikrokolony přeneseny do čistých mikrozkmavek a byly na ně nanášeny vzorky. V závislosti na objemu vzorků byly vzorky nanášeny buď najednou či v několika fázích tak, aby objem jednoho nanášení nepřekročil 60 µl. V případě, že vzorek obsahoval více než 10 µg proteinů, byl poměrně rozdělen do více mikrokolon. Nanášené vzorky byly postupně centrifugovány po dobu 5 minut při 1200 g. Vzorky byly poté promyty 50 µl 5% FA (2x), kdy centrifugace probíhala 2,5 min při 2000 g. Pro eluci vzorků jsem StageTips mikrokolonky přenesla do čistých mikrozkmavek a nanášela 50 µl elučního činidla 50% MeOH/2,5% FA (2x) a takto jsem vzorky centrifugovala 5 min při 1500 g. Nakonec byly vzorky potřetí centrifugovány 5 min při 3000 g bez přidání elučního činidla. Vzorky byly přeneseny do vialek pro následnou LC-MS analýzu a v nich odpařeny při 45 °C.

3.2.6 Studium míry agregace proteinového vzorku po tepelném ovlivnění

Za účelem zjištění změny aktivity alkalické fosfatasy při jejím zahřívání byl připraven zásobní roztok tohoto proteinu o koncentraci 2 mg.ml^{-1} v 100 mmol.l^{-1} TEAB pufru. Dále byl připraven zásobní roztok inhibitoru alkalické fosfatasy L-fenylalaninu o koncentraci $80,02 \text{ mmol.l}^{-1}$ v 100 mmol.l^{-1} TEAB pufru. Také byl vytvořen roztok substrátu alkalické fosfatasy *p*-NPP o koncentraci $84,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ ve 100 mmol.l^{-1} TEAB pufru. Kvůli své nestabilitě byl roztok substrátu vždy připraven čerstvý.

V rámci prvního experimentu byla sledována míra agregace vzorků s obsahem ALP a inhibitoru a vzorků pouze s ALP. Do 10 mikrozkušavek bylo přidáno $12,5 \mu\text{l}$ ze zásobního roztoku alkalické fosfatasy obsahujících $25 \mu\text{g}$ proteinu. Do pěti z těchto mikrozkušavek bylo dále přidáno $12,5 \mu\text{l}$ zásobního roztoku L-fenylalaninu. Obsah zkumavek byl doplněn 100 mmol.l^{-1} TEAB pufrům na $50 \mu\text{l}$. Výsledná koncentrace L-fenylalaninu v $50 \mu\text{l}$ směsi tedy byla 20 mmol.l^{-1} . Vzorky byly ponechány 30 min inkubaci při pokojové teplotě pro vytvoření interakce ALP s inhibitorem. Poté byly vzorky zahřívány po dobu 5 min při teplotách 20, 35, 50, 75 a $90 \text{ }^\circ\text{C}$. Následně byl obsah mikrozkušavek krátce stočen na dno. Po vychladnutí byly vzorky umístěny do centrifugy, kde byly stočeny na 20 minut při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a 25000 g . Po centrifugaci bylo opatrně z hladiny vzorků odebráno $10 \mu\text{l}$ supernatantu do čisté mikrozkušavky. Takto byly vzorky připraveny pro SDS-PAGE.

Následující experiment byl proveden obdobným způsobem, pouze s tím rozdílem, že zahřívání vzorků probíhalo po dobu 1, 2, 3, 4 a 5 h při 50, 75 a $90 \text{ }^\circ\text{C}$.

Nakonec byl proveden experiment, v rámci kterého byla sledována míra agregace vzorků s obsahem ALP a substrátu *p*-NPP a vzorků pouze s ALP. Do šestnácti mikrozkušavek bylo opět přidáno $12,5 \mu\text{l}$ ze zásobního roztoku ALP obsahujících $25 \mu\text{g}$ proteinu. Dále byl vytvořen roztok *p*-NPP o koncentraci $84,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ ve 100 mmol.l^{-1} TEAB pufru. Do osmi mikrozkušavek s ALP bylo přidáno $12,5 \mu\text{l}$ zásobního roztoku *p*-NPP, jehož výsledná koncentrace v $50 \mu\text{l}$ směsi po doplnění 100 mmol.l^{-1} TEAB pufrům tedy byla 15 mmol.l^{-1} . Připravené vzorky obsahující pouze ALP, či ALP a substrát byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. Následně byly zahřívány po dobu 1 h při teplotách 35, 50, 75 a $90 \text{ }^\circ\text{C}$. Poté došlo k okyselení vzorků přídatkem $4,5 \mu\text{l}$ 5% FA na hodnotu pH 5. Po okyselení se vzorky nechaly inkubovat 15 min při laboratorní teplotě. Následně byly vzorky centrifugovány při 25000 g

po dobu 20 min při 4 °C. Po stočení bylo z hladiny vzorků odebráno 10 µl supernatantu do čisté mikrozkuhavky. Takto byly vzorky připraveny pro SDS-PAGE.

3.2.7 SDS PAGE a barvení gelů

Pro primární informaci o úbytku množství proteinů ve vzorcích vlivem jejich tepelné agregace byla provedena polyakrylamidová gelová elektroforéza. Množství dílčích složek k přípravě gelů pro elektroforézu jsou uvedena v Tab. 4. Pro přípravu 10% dělicího gelu byla do odsávací Erlenmeyerovy baňky nejprve přidána směs 30% akrylamidu a 0,8% bisakrylamidu (AA/BIS), 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufru o pH 8,8 a vody. Směs byla 20 min míchána a odvzdušňována. Po uplynutí této doby byl ke směsi přidán TEMED, 10% roztok SDS, 10% roztok APS a celá směs byla jemně promíchána a nanášena mezi připravená skla. Poté bylo třeba převrstvit ještě tekutý gel n-butanolem nasyceným vodou, který byl po zatuhnutí gelu odstraněn. Během tuhnutí dělicího gelu byly do Erlenmeyerovy baňky přidány první tři složky zaostřovacího gelu, tedy 30% akrylamid s 0,8% bisakrylamidem, 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pufr o pH 6,8 a voda. Po 20min odvzdušňování byl do baňky přidán opět TEMED, 10% roztok SDS, 10% roztok APS a po řádném promíchání všech složek byl obsah baňky nanášen mezi skla na zatuhlý dělicí gel zbavený n-butanolu. Mezi skla byl do ještě tekutého zaostřovacího gelu vložen hřebíček pro vytvoření jamek. Po 30 min tuhnutí byl gel připraven na vyjmutí ze stojánku a na nanášení vzorků.

Vzorky byly před nanášením na gel smíchány 1:1 s Laemliho vzorkovacím pufrem a umístěny na 5 min do termobloku při 95 °C tak, aby došlo k tepelné denaturaci. Do komůrky mezi skly v elektrodovém držáku a do elektrodové vany byl nalit elektrodový pufr o pH 8,3 a složení 25 mmol·l⁻¹ Tris, 192 mmol·l⁻¹ glycin a 0,1 % (w/v) SDS. Po vyjmutí hřebíčeků a propipetování jamek bylo nanášeno 20 µl směsi vzorku s pufrem, popřípadě 5 µl proteinového standardu (Precision plus, Biorad). Separace proteinů probíhala při stálém napětí 110 V.

Po elektroforetické separaci byly gely barveny koloidním roztokem barviva Coomassie Brilliant Blue o složení 0,12% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10% (w/v) síran amonný a 10% (v/v) kyseliny fosforečná. Tento zásobní roztok byl před použitím smíchán v poměru 4:1 (v/v) s metanolem (MeOH). Tuto směs bylo nutné nechat míchat 15 min. Gely řádně opláchnuté destilovanou vodou byly umístěny

do Petriho misek s přibližně 30 ml připraveného barviva. Za stálého míchání byly gely ponechány barvení přes noc.

Následující den bylo třeba gely odbarvit. Nejprve byla z Petriho misek odstraněna barvicí směs a veškeré její zbytky. Gely propláchnuté destilovanou vodou byly umístěny opět do Petriho misky, tentokrát však naplněné 20% (v/v) kyselinou octovou. Za stálého míchání byly gely odbarvovány tak dlouho, dokud nebylo odbarveno pozadí gelů, tedy 5-6 h. Průběžně byl po 30min intervalech odbarvovací roztok vyměňován pro zkrácení doby a lepší účinnost odbarvování. Odbarvené gely byly opláchnuty a umístěny do Petriho misky s deionizovanou vodou a takto uchovány v lednici.

Obrazový záznam gelů byl získán s pomocí skeneru Umax U9908-HAR0 (Amersham Bioscience Corp, USA) a zpracován s použitím softwaru ImageMaster.

Tab. 4 Objemy složek pro přípravu gelů na elektroforézu.

Složka	Dělicí gel 10 %	Zaostřovací gel 4%
AA/BIS 30%, 0,8%	3,4 ml	0,65 ml
1,5mol.l ⁻¹ HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
0,5mol.l ⁻¹ HCl, pH 6,8	-	1,25 ml
H ₂ O	3,8 ml	2,95 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	0,05 ml	0,06 ml
TEMED	0,015 ml	0,01 ml

3.2.8 Studium změn aktivity alkalické fosfatasy po tepelném ovlivnění a v přítomnosti substrátu a inhibitoru

Za účelem zjištění změny aktivity ALP při jejím zahřívání byl použit zásobní roztok tohoto proteinu o koncentraci $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TEAB pufru. Také byl použit zásobní roztok inhibitoru alkalické fosfatasy L-fenylalaninu o koncentraci $80,02 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TEAB pufru. Dále byl vytvořen roztok substrátu alkalické fosfatasy *p*-NPP o koncentraci $84,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TEAB pufru. Do mikrozkušavek obsahujících $25 \mu\text{l}$ $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TEAB pufru bylo odebráno $12,5 \mu\text{l}$ ze zásobního roztoku alkalické fosfatasy obsahujících $25 \mu\text{g}$ proteinu. Pro sledování vlivu inhibitoru na aktivitu ALP po tepelném ovlivnění bylo do mikrozkušavek dále přidáno $12,5 \mu\text{l}$ zásobního roztoku L-fenylalaninu tak, že jeho výsledná koncentrace v $50 \mu\text{l}$ směsi byla $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro sledování vlivu substrátu na aktivitu ALP po tepelném ovlivnění bylo naopak přidáno $12,5 \mu\text{l}$ zásobního roztoku *p*-NPP jehož výsledná koncentrace v $50 \mu\text{l}$ směsi tedy byla $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Připravené vzorky obsahující pouze ALP, či ALP a substrát, popřípadě ALP a inhibitor byly inkubovány 30 min při pokojové teplotě. Následně byly zahřívány po dobu 1 h při různých teplotách – 20, 35, 43, 50, 56, 62, 68, 75 a 90 °C. Následně došlo k okyselení vzorků přidávkem $4,5 \mu\text{l}$ 5% FA na hodnotu pH 5. Pro posouzení vlivu okyselení na výsledné hodnoty absorbance byly pro kombinaci ALP a substrát vyhotoveny dvě sady vzorků, přičemž jedna z nich zůstala neokyselená – tedy s pH 8,5. Po okyselení se vzorky nechaly inkubovat 15 min při laboratorní teplotě. Následně byly vzorky centrifugovány při 25000 g po dobu 20 min při 4 °C. Po centrifugaci bylo opatrně z hladiny vzorků odebráno $10 \mu\text{l}$ supernatantu do čisté mikrozkušavky. (Zároveň bylo odebráno dalších $10 \mu\text{l}$ supernatantu pro pozdější štěpení (Kap. 3.2.2.5). K nim bylo přidáno $500 \mu\text{l}$ substrátu ALP *p*-nitrofenylfosfátu o koncentraci $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto byly vzorky ponechány inkubovat po dobu 1 h při 35 °C. Následně byly vzorky ředěny pomocí $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TEAB pufru. V případě vzorků ALP a ALP s inhibitorem stačilo ředění 3x, pro vzorky ALP se substrátem bylo zapotřebí ředit vzorky 40x. Poté byla měřena absorbance barevného produktu reakce ALP a *p*-nitrofenylfosfátu při absorpčním maximu 405 nm. Z naměřených hodnot byl vytvořen graf závislosti absorbance na době zahřívání vzorků pro varianty vzorků s obsahem ALP (pH 5), ALP+ inhibitor (pH 5) a ALP+ substrát (pH 5) a ALP+ substrát (pH 8,5). Všechny vzorky byly vyhotoveny v duplikátech.

3.2.9 nLC-MS/MS analýza

Vzorky, obsahující naštěpené a reduktivní dimethylaci modifikované peptidy, byly analyzovány pomocí systému kapilární chromatografie (nLC; RSLCnano, Thermo Fisher Scientific, USA) online spojeného s tandemovým hmotnostním analyzátozem Q-TOF vybaveným nano-ESI ionizací (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo). Připravené odpařené vzorky ve skleněných vialkách byly rozpuštěny v 50 μ l roztoku 5% kys. mravenčí (FA) modifikované 5% MeOH, sonikovány po dobu 5 min a přeneseny do autosampleru chromatografického systému. K analýze byly odebrány 2 μ l vzorku a obsažené peptidy byly při průtoku 4 μ l/min zachyceny na předkoloně 75 μ m \times 3 cm (IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reposil GOLD C18, 5 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) pomocí vzorkovací pumpy a následně izokraticky promyty 21 μ l 2% FA. Dělení zachycených peptidů bylo provedeno dvousložkovou gradientovou elucí v průběhu 47 min na analytické nanokapilární koloně (50 μ m \times 20 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněnou reverzní fází (Reposil AQ C18, 3 μ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) při průtoku 200 nl/min. Eluční gradient byl vytvořen mícháním mobilní fáze A (0,1% FA) a mobilní fáze B (90% acetonitril modifikovaný 0,1% FA) se směrnici míchání složek gradientu odpovídající nárůstu mobilní fáze B v mobilní fázi A s rychlostí 1,25% složky B/min v průběhu 20 min (celý gradient je uveden v Tab. 5).

Tab. 5 Nastavení chromatografického dělení peptidů obsažených ve vzorcích pomocí 47 min gradientu při průtoku 200 nl/min. Složení mobilních fází bylo následující: pufr A: 0,1% FA ve vodě, pufr B: 90% acetonitrilu modifikovaného 0,1% FA.

Čas (min)	%A	%B
0	90	10
10	90	10
30	65	35
35	10	90
37	10	90
40	90	10
52	90	10

Rozdělené peptidy eluované z analytické kolony byly ionizovány ESI ionizací a detekovány metodou tandemové hmotnostní analýzy v uspořádání „data-dependent analysis (DDA)“ s kolizně indukovanou fragmentací peptidů v kolizní cele plněné dusíkem. Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: Zdroj (Source; capillary voltage 1650 V; Dry gas: 6 L/min; Dry temperature: 150 °C); Tune Page nastavení (Ion funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 3,2 eV; collision energy 6 eV; Collision RF 1200 Vpp; transfer time 70 μs; pre-puls storage 12 μs); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; Precursor Ions: 2s cycle time; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 5000 cts; active exclusion po 2 spektrech po dobu následujících 30 s; excluded mass rozsah prekurzorů 100-350 Da). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 250-1600 m/z s dobou sběru (acquisition time) 500 ms pro MS a 100-300 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekurzoru.

3.2.10 Zpracování dat

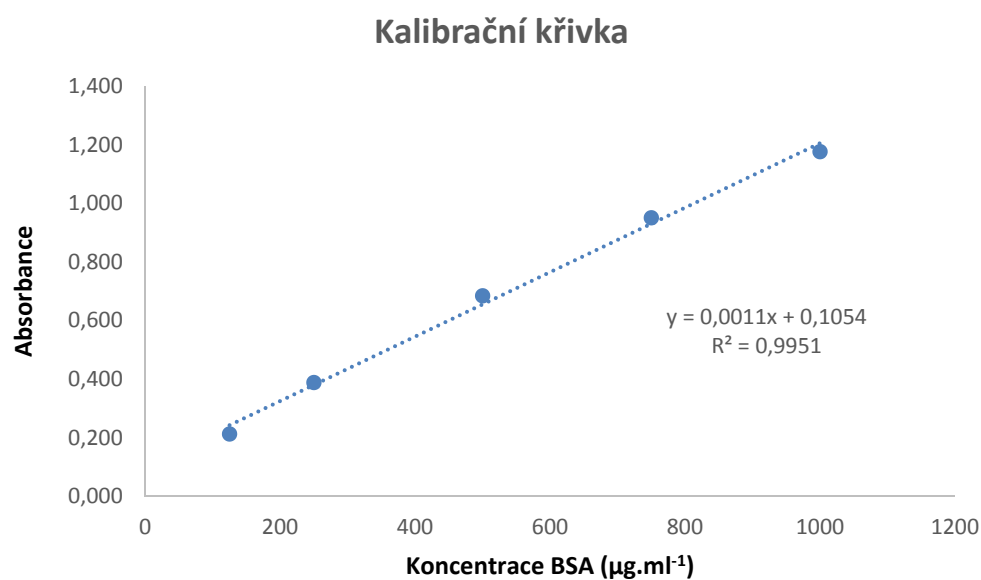
Naměřená surová data byla zpracována programem DataAnalysis v. 4.3 (x64; Bruker Daltonics, Německo), fragmentační spektra a měrné hmotnosti prekurzorů byly uloženy ve formátu mgf (Mascot generic file). Tato spektra byla importována do programu ProteinScape v2.2 a využita k identifikaci nejprve peptidů a následně proteinů pomocí databázového prohledávání pomocí Mascot algoritmu (in-house mascot server, Matrix Science, England, UK) proti databázi obsahující vybrané proteinové sekvence hovězího sérového albuminu, serotransferinu, alkalické fosfatázy a dalších běžných kontaminantů.

Pro identifikaci peptidů a proteinů byly nastaveny tyto parametry: štěpící proteáza: chymotrypsin/trypsin; maximální povolený počet vynechaných štěpných míst (miss cleavage) 5; povolené modifikace peptidů: karbamidomethylace cysteinů jako pevná (fixed), acetylace N-konců proteinů, oxidace methioninu, dimethylace lysinu a N-konců peptidů (Dimethyl (K), Dimethyl (N-term), Dimethyl:2H(4) (K), Dimethyl:2H(4) (N-term)) byly nastaveny jako variabilní; povolené odchylky pro MS prekurzorů: 25 ppm a pro MS/MS fragmentace peptidů 0,03 Da; minimální skóre pro identifikaci peptidů 25, pro identifikaci proteinu minimálně 1 peptid s identity skóre definovaným algoritmem MASCOT na základě velikosti databáze; minimální skóre pro identifikaci proteinů 30. Výsledky prohledávání a identifikace peptidů byly exportovány do formátu XLS a vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu MS Excel.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení celkové koncentrace proteinů v roztoku alkalické fosfatasy metodou Bradforda

Spektrofotometrickým měřením s využitím metody Bradforda byla získána kalibrační křivka standardů BSA (Obr. 6). Také byla změřena absorbance roztoku alkalické fosfatasy, jehož teoretická koncentrace dle navážky by se rovnala $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dosazením změřené hodnoty do rovnice charakterizující závislost absorbance na koncentraci proteinů však bylo vypočteno, že skutečná celková koncentrace proteinů v daném roztoku se rovnala pouze $440,24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnoty absorbance pro každý standard i vzorek byly získány ze tří měření. Navážky výchozího materiálu ALP byly tedy úměrně navýšeny.



Obr. 6 Kalibrační křivka proteinových standardů BSA pro stanovení koncentrace proteinového vzorku metodou Bradforda.

4.2 Identifikace proteinů v roztoku alkalické fosfatasy pomocí hmotnostní spektrometrie

V rámci prvních pokusných experimentů byly proteolyticky naštěpeny vzorky roztoku ALP. Po odsolení na StageTips a nLC-MS analýze byly identifikovány proteiny obsažené ve vzorku vůči databázi Swiss-Prot a s pomocí vyhledávacího nástroje Mascot. Bylo zjištěno, že výchozí materiál ALP obsahuje celé spektrum dalších proteinů (Tab. 6) – v největším zastoupení hovězí serotransferin, BSA a dipeptidylpeptidasu 4. ALP byla identifikována ve výchozím materiálu až jako čtrnáctý protein v celkovém pořadí. Kompletní počet identifikovaných peptidů pro všechny proteiny ve vzorku byl 242, pro ALP však bylo identifikováno pouze 7 peptidů, tedy necelá 3 % z celkového množství. Ačkoliv je v rámci jednotlivých experimentů uváděno použití vzorků ALP, tyto vzorky obsahovaly vždy komplexní proteinovou směs s minoritním obsahem samotné ALP. Této skutečnosti však bylo využito – díky nízkému obsahu ALP ve výchozím materiálu byly získány vzorky proteinové směsi. Tato práce tak má za úkol prokázat, že využití metody a postupy lze aplikovat na cílový protein i přesto, že je součástí směsi více proteinů. Množství peptidů pro jednotlivé experimenty a vzorky ALP však mělo určitou variabilitu. V Tab. 7 je soupis peptidů identifikovaných pro protein ALP v rámci jiného experimentu s již optimalizovanými experimentálními podmínkami. Tentokrát bylo identifikováno pro ALP celkem 15 peptidů, tedy přibližně dvojnásobné množství oproti identifikaci v Tab. 6, což svědčí o jisté variabilitě počtu peptidů. Bylo identifikováno 12 tryptických peptidů a 3 peptidy semitryptické. Semitryptické peptidy se však nevyskytují vždy a reprodukovatelně, jelikož za chymotryptickou stranou štěpu se většinou nachází také místo pro štěpení trypsinem, který zde štěpí za vzniku delší varianty daného semitryptického peptidu. Z hlediska kvantifikace tedy takové peptidy nejsou žádoucí a je preferován výběr peptidů tryptických. Množství tryptických peptidů je však pro kvantifikaci také nevhodné především kvůli výskytu aminokyselin podléhajících posttranslačním modifikacím ve své sekvenci. Určitý počet peptidů z celkového množství se např. kvůli své prostorové dostupnosti vyskytuje nepravidelně a ze zbytku pravidelně se vyskytujících peptidů se tedy dá jen určitá část peptidů s optimálním experimentálním chováním využít pro kvantitativní reprezentaci proteinu. Výběr takových peptidů pro studované proteiny je popsán v následující kapitole (Kap 4.3).

Tab. 6 Proteiny identifikované ve vzorku ALP po LC-MS analýze.

Protein	Accession	Počet peptidů	Pokrytí sekvence
Serotransferrin OS=Bos taurus	sp Q29443 TRFE_BOVIN	68	66,2
Serum albumin OS=Bos taurus	sp P02769 ALBU_BOVIN	25	43,3
Dipeptidyl peptidase 4 OS=Bos taurus	sp P81425 DPP4_BOVIN	20	24,8
Filamin-C OS=Mus musculus	sp Q8VHX6 FLNC_MOUSE	14	5,6
Filamin-C OS=Homo sapiens	sp Q14315 FLNC_HUMAN	3	5,4
Polymeric immunoglobulin receptor OS=Bos taurus	sp P81265 PIGR_BOVIN	13	18,9
Adenosine deaminase OS=Bos taurus	sp P56658 ADA_BOVIN	11	32,8
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Pan troglodytes	sp A5A6M6 K2C1_PANTR	8	10,8
IgGfc-binding protein OS=Homo sapiens	sp Q9Y6R7 FCGBP_HUMAN	9	1,6
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 OS=Bos taurus	sp P15396 ENPP3_BOVIN	9	11,4
Alpha-2-macroglobulin OS=Bos taurus	sp Q7SIH1 A2MG_BOVIN	7	5,6
Dipeptidyl peptidase 1 OS=Bos taurus	sp Q3ZCJ8 CATC_BOVIN	7	16
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Canis familiaris	sp Q6EIZ0 K1C10_CANFA	4	10,4
Intestinal-type alkaline phosphatase OS=Bos taurus	sp P19111 PPBI_BOVIN	7	15,8
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens	sp P35908 K22E_HUMAN	6	11,9
Fibrillin-1 OS=Bos taurus	sp P98133 FBN1_BOVIN	8	2,8
Cationic trypsin OS=Bos taurus	sp P00760 TRY1_BOVIN	3	20,7
Lactotransferrin OS=Camelus dromedarius	sp Q9TUM0 TRFL_CAMDR	2	7,6
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens	sp P35527 K1C9_HUMAN	4	5,9
Antithrombin-III OS=Bos taurus	sp P41361 ANT3_BOVIN	4	8,8
Transthyretin OS=Bos taurus	sp O46375 TTHY_BOVIN	3	24,5
Trefoil factor 3 OS=Bos taurus	sp A8YXX7 TFF3_BOVIN	3	53,1
Fibrinogen alpha chain OS=Bos taurus	sp P02672 FIBA_BOVIN	1	2,1
Dipeptidyl peptidase 1 OS=Macaca fascicularis	sp Q60HG6 CATC_MACFA	1	4,5
Dipeptidase 1 OS=Sus scrofa	sp P22412 DPEP1_PIG	1	2,4
60 kDa chaperonin 2 OS=Propionibacterium acnes	sp Q6A6W2 CH602_PROAC	1	1,9

Tab. 7 Peptidy vyskytující se pro protein ALP. Mnohé z identifikovaných peptidů neměly pravidelný výskyt, některé v sekvenci obsahovaly aminokyseliny podléhající posttranslačním modifikacím popřípadě obsahovaly místa pro štěpení chymotrypsinem.

peptid	specifita
F.LGDGMGVPTVTATR.I	semitryptický
K.KLQPIQTAAK.N	tryptický
K.LGPETPLAMDQFPY.V	semitryptický
K.LGPETPLAMDQFPYVALSK.T	tryptický
K.LQPIQTAAK.N	tryptický
K.NVILFLGDGMGVPTVTATR.I	tryptický
K.QNLVQAWQAK.H	tryptický
K.SVGVVTTTR.V	tryptický
K.YMFPVGTDPPEYRDDASVNGVR.K	tryptický
R.GFYLFVEGGR.I	tryptický
R.GNEVTSVMNR.A	tryptický
R.GTSIFGLAPSK.A	tryptický
R.QVPDSAGTATAY.L	semitryptický
R.TIGVSAAAR.Y	tryptický
R.VQHASPAGAYAHTVNR.N	tryptický

4.3 Studium aminokyselinové sekvence a prostorového uspořádání vybraných peptidů

Nejprve byla vyhledána aminokyselinová sekvence proteinů ALP, BSA a serotransferinu. K tomu byla použita databáze UniProt, kde byl vygenerován FASTA formát sekvence. Ten byl vložen do nástroje ProteinCutter na stránkách <https://software.cr-hana.upol.cz/proteincutter/index.php>. Bylo zjištěno procentuální zastoupení aminokyselin využitelných pro štěpení trypsinem – Arg a Lys a také zastoupení aminokyselin, za kterými štěpí chymotrypsin – Leu, Tyr, Phe a Trp.

MQGACVLLLLLGLHLQLSLGLVPVEEEDPAFWNRQAAQALDVAKKLQPIQTAAKNVILFLGDGMGVPTVTATRILKQMGNGKLGPEPLAMDQFPYVALSKTYNVDRQVPDSAGTATAYLCGVKGNRYRTIGVSAAARYNQC
 KTTTRGNEVTSVMNRAKKAGKSVGVVTTTRVQHASPAGAYAHTVNRNWYSDADLPADAQMNGCQDIAAQLV
 NNMDIDVILGGGRKYMFPVGTDPPEYRDDASVNGVRKRKQNLVQAWQAKHQGAQYVWNR TALLQAADDSS
 VTHLMGLFEPADMKYNVQDHTKDPTLQEMTEVALRVVSRNPRGFYLFVEGGRIDHGHDDKAYMALTEA
 GMFDNAIAKANELTSELDTLILVTADHSHVFSFGGYTLRGTSIFGLAPSKALDSKSYTSILYGNGPGYAL
 GGGSRPDVNDSTSEDP SYQQAAVPAQSETHGGEDVAVFARGPQAHLVHGVVEETFVAHIMAFAGCPEPY
 TDCNLPAPTTATSIPDAAH LAASPPPLALLAGAMLLLLAPTLY

Obr. 7 Aminokyselinová sekvence alkalické fosfatasy se žlutě zvýrazněnými místy pro štěpení trypsinem (Arg, Lys), tyrkysově zvýrazněnými tryptickými peptidy a šedě zvýrazněnými semitryptickými peptidy vyskytujícími se při identifikaci ALP.

Bylo zjištěno, že aminokyselinová sekvence ALP obsahuje oproti BSA či serotransferinu velmi nízké procento štěpných míst pro trypsin (Tab. 8). Z aminokyselinové sekvence je navíc patrné, že potenciální peptidy jsou povětšinou příliš dlouhé, či naopak krátké k tomu, aby mohly sloužit ke kvantifikaci. (Obr. 7). Optimální délka peptidu spolehlivě reprezentujícího protein při kvantifikaci je totiž mezi 5 a 22 aminokyselinami (Demeure *et al.*, 2014). Do budoucna by tedy bylo vhodné zvážit použití jiného proteolytického enzymu ke štěpení ALP – např. Lys - C. Na Obr. 7 jsou pro názornost také žlutě znázorněna místa pro štěpení trypsinem – Arg a Lys a peptidy ALP, které byly identifikovány a jsou zároveň zobrazeny v Tab 7. Tyrkysově jsou zvýrazněny peptidy tryptické a šedou barvou jsou zvýrazněny peptidy semitryptické. Je patrné, že dva ze semitryptických peptidů K.LGPETPLAMDQFPY.V a F.LGDGMGVPTVTATR.I byly pouze kratší variantou tryptických peptidů K.LGPETPLAMDQFPYVALSK.T a K.NVILFLGDGMGVPTVTATR.I. Kvůli této skutečnosti nemohly být ani kratší semitryptické, ani delší tryptické varianty těchto peptidů použity pro řádnou kvantifikaci.

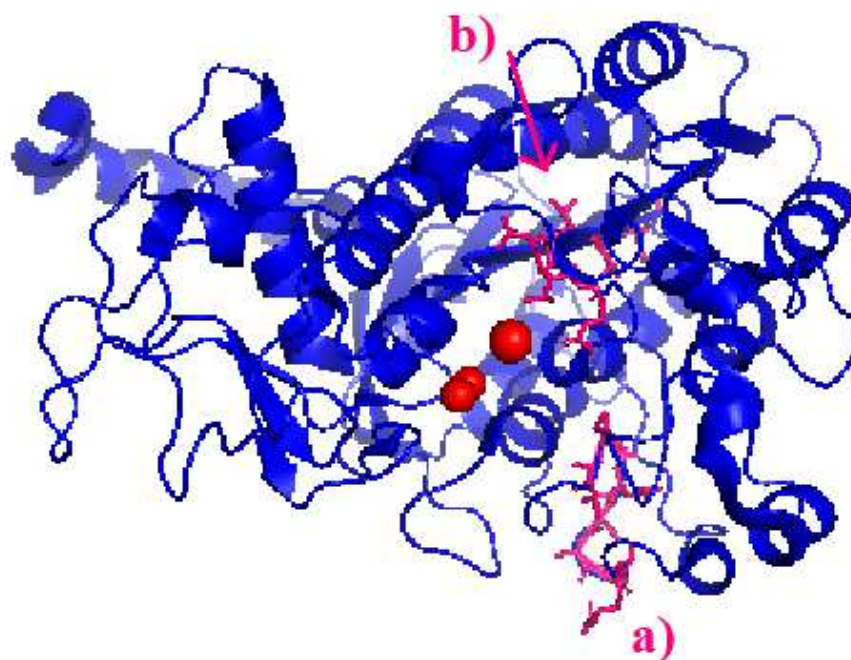
Pro ALP byly vybrány určité peptidy, jejichž aminokyselinové složení a délka napovídá jejich vhodnému chování při štěpení a dobré reprodukovatelnosti. Zároveň byly vybrány i některé peptidy s výskytem problémových aminokyselin (Met, Asn, Gln, Cys), či semitryptické peptidy. Po vyhodnocení dat pro jednotlivé peptidy v následujících experimentech bylo zjišťováno, zda výskyt problémových aminokyselin v sekvenci peptidu způsobí vždy konkrétní negativní projev v kvalitě získaných dat. Také bylo zjišťováno, zda peptidy s vhodným aminokyselinovým složením skutečně poskytují reprodukovatelnou odezvu. Nejhorších výsledků bylo dosaženo se dvěma peptidy R.QVPDSAGTATAY.L a K.LVTDLTKLGPETPLAMDQFPY.V z části štěpenými chymotrypsinem. Často tyto peptidy nebyly vůbec identifikovány a nevykazovaly lineární odezvu na změny koncentrace proteinu ve vzorku.

Tab 8. Srovnání procentuálního obsahu míst v sekvenci proteinů ALP, BSA a serotransferinu vhodných pro štěpení trypsinem či chymotrypsinem

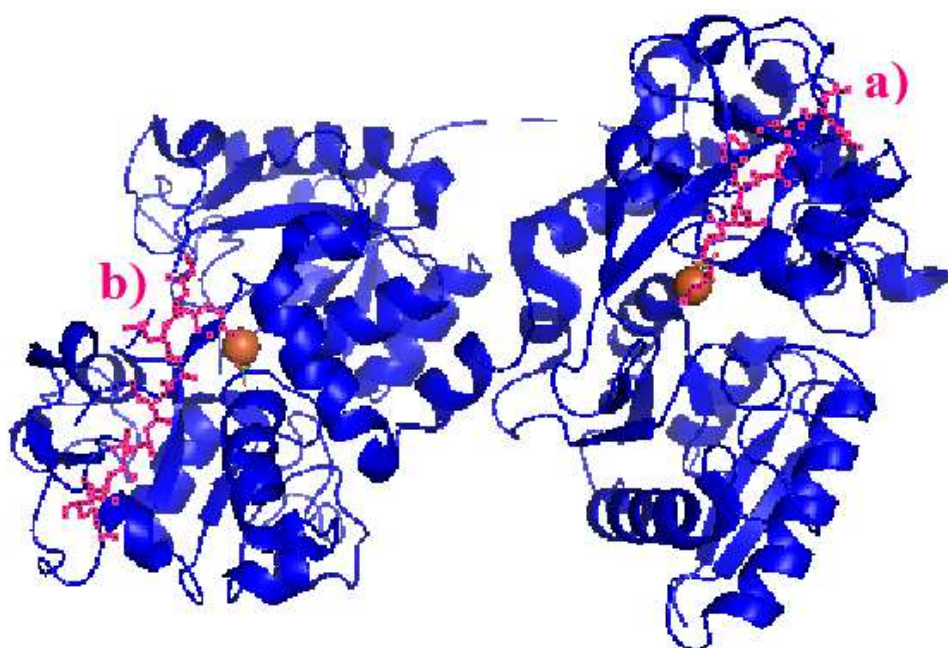
	AK pro štěpení trypsinem (%)	AK pro štěpení chymotrypsinem (%)
ALP	7,7	16,5
BSA	12,6	16,5
serotransferin	14,2	19,6

Tryptický peptid K.LQPIQTAAK.N byl z hlediska kvantifikace také problematický, jelikož získané výsledky měly vysokou variabilitu způsobenou pravděpodobně výskytem dvou Gln podléhajících deaminaci. Nejspokojivějších výsledků bylo dosahováno s peptidy R.TIGVSAAAR.Y a K.SVGVVTTTR.V. Zajímavé je, že oba z těchto peptidů mají ve své sekvenci Thr a Ser, druhý z peptidů dokonce tři Thr za sebou, s možnou tendencí k fosforylaci a přesto nedošlo k negativnímu ovlivnění jejich vlastností při kvantifikaci. Z toho je možné usuzovat, že tendence těchto aminokyselin podléhat fosforylaci nemá na experimentální chování peptidů natolik záporný dopad, jako výskyt aminokyselin, na kterých můžou probíhat jiné typy modifikací – deaminace a tvorba disulfidických můstků. Ovšem i pro tyto typy modifikací mohou nastat výjimky – např. peptid K.ELPDPQESIQR.A proteinu serotransferinu poskytoval i přes výskyt dvou Gln velmi reprodukovatelné výsledky s odpovídajícími poměry L:H. Pravděpodobně měl tento peptid velmi nízké sklony k deaminaci Gln, což dokazuje individualitu chování jednotlivých peptidů a roli mnoha dalších faktorů. Peptid K.GDVAFVK.D serotransferinu obsahoval ve své sekvenci Phe-chymotryptické štěpné místo. Pravděpodobně tak při jeho štěpení vznikaly peptidy naolik malé, že unikly detekci. Nejspíš z tohoto důvodu se peptid choval velmi variabilně a poměry L:H v krajních hodnotách koncentrací proteinu (1 μ g a 25 μ g) nebyly odpovídající.

Dále byly vybrané peptidy znázorněny v rámci prostorové struktury daného proteinu. K tomu byl využit program PyMOL 2.0 (Schrödinger LLC, USA). Bylo zhodnoceno, zda může mít prostorové uspořádání peptidu vliv na jeho chování při proteolytickém štěpení. Pro ALP byly ve 3D struktuře proteinu zobrazeny peptidy R.TIGVSAAAR.Y (Obr 8 a)) a K.SVGVVTTTR.V (Obr 8 b)), které spolehlivě reprezentovaly ALP při kvantifikaci. Peptid R.TIGVSAAAR.Y se nacházel na povrchu, byl tedy snadno dostupný pro štěpení trypsinem. Peptid K.SVGVVTTTR.V byl naopak lokalizován uvnitř struktury, jeho dostupnost byla tedy znesnadněná, přesto však jeho umístění nemělo negativní dopad na štěpení. Pro serotransferin byl zobrazen peptid K.GDVAFVK.D (Obr. 9 a)), který nevykazoval vhodné vlastnosti pro kvantifikaci. Bylo však zjištěno, že se stejně jako druhý zobrazený peptid K.GYLAVAVVK.T (Obr. 9 b)) nachází na povrchu struktury a důvodem k jeho nevhodnému chování při štěpení tedy pravděpodobně nebude jeho prostorové umístění, ale výskyt chymotryptické aminokyseliny Phe v sekvenci.



Obr. 8 Prostorová struktura alkalické fosfatasy. Červeně jsou vyznačeny dva atomy Zn a atom Mg reprezentující lokaci aktivního místa. Purpurově jsou vyznačeny dva peptidy a) R.TIGVSAAAR.Y a b) K.SVGVVTTTR.V.



Obr. 9 Prostorová struktura serotransferinu. Oranžově jsou vyznačeny dva atomy Fe reprezentující lokaci aktivních míst. Purpurově jsou vyznačeny dva peptidy a) K.GDVAFVK.D a b) K.GYLAVAVVK.T

Aminokyselinová sekvence či prostorové uspořádání daných peptidů nám může mnohé napovědět o jejich vlastnostech při štěpení a následné kvantifikaci, avšak

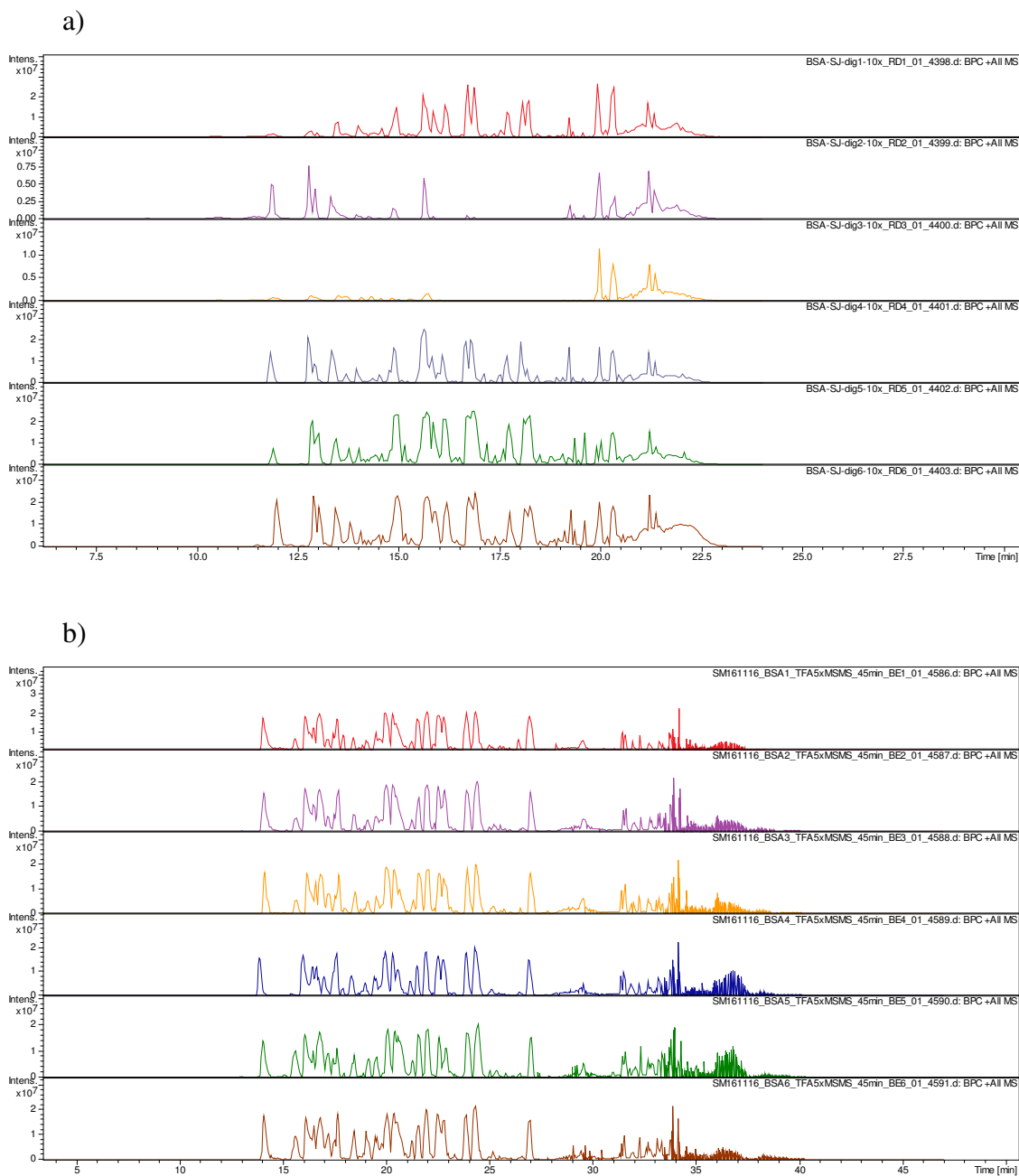
významnou roli hraje spousta dalších faktorů jako náboj, hydrofobicita, retenční koeficient, energetické vlastnosti či přítomnost okolních peptidů (Fusaro *et al.*, 2009). Možným zjednodušením výběru proteotypických peptidů je použití sofistikovaných nástrojů či programů vyvinutých k tomuto účelu, např. PeptidePicker (Mohammed *et al.*, 2014) či PeptideManager (Demeure *et al.*, 2014).

Manuální výběr peptidů pro kvantifikaci je tedy možný, avšak důležité je experimentálně ověřit, že se vybrané proteotypické peptidy s vhodnou délkou vyskytují pravidelně a reprodukovatelně s vysokou intenzitou.

4.4 Zjištění optimálního objemu reakce pro štěpení

Objem reakce, ve které dochází ke štěpení proteinu trypsinem, je důležitým faktorem ovlivňujícím výslednou kvalitu získaných dat po provedení experimentu. Vzorky BSA byly štěpeny ve třech různých objemech – 200, 100 a 50 μ l. Předmětem vyhodnocení tohoto experimentu bylo srovnání kvality identifikace proteinů, množství uvolněných peptidů, jejich reprodukovatelnost a také kvalita získaných hmotnostních spekter pro jednotlivé varianty objemů štěpících roztoků ve vzorcích. Na Obr. 10 jsou chromatogramy vygenerované pro objem štěpícího roztoku 200 μ l (a) a pro objem štěpícího roztoku reakce 50 μ l (b). Při jejich srovnání je patrné, že v nižším objemu 50 μ l došlo k produkci většího množství peptidů díky účinnějšímu štěpení vstupního proteinu a k zajištění vysoké reprodukovatelnosti procesu proteolytického štěpení, což je patrné ze zobrazených chromatografických záznamů. Naopak u objemu 200 μ l byla vykazována vyšší variabilita mezi štěpenými vzorky, jak je vidět na variabilitě získaných chromatogramů. Pro další práci se tedy jevilo jako ideální štěpení proteinů v roztoku o co nejmenším objemu, tedy 50 μ l. Možným úskalím však může být nutnost pipetování nízkých objemů jednotlivých činidel a především proteinového roztoku, kdy může docházet k negativnímu ovlivnění analýzy vlivem počáteční chyby pipetování. Vzhledem k tomu, že množství proteinů v analyzovaných vzorcích bývá často menší než 100 ng, bývá koncentrace proteinů v celkovém objemu vzorku velmi nízká pro dosažení optimální účinnosti proteolytického štěpení. Již dříve tedy byly publikovány práce zabývající se snížením objemu pro reakci trypsinu s proteiny. Russel *et al.*, 2001 či Strader *et al.*, 2006 se rozhodli štěpit proteiny v pufrech s přidavkem acetonitrilu, který jakožto organické rozpouštědlo stlačil proteiny do menšího objemu a poskytl jim

tak lepší podmínky pro interakci. Organická rozpouštědla navíc pomáhají strukturu proteinu rozvolnit a rozpustit jej. Ve své práci prezentovali nejvyšší zvýšení množství peptidů a pokrytí proteinové sekvence při štěpení proteinů v 80 % acetonitrilu po dobu 1 h (Strader *et al.*, 2006). Tyto výsledky byly však následně vyvráceny tím a tím, kteří zjistili, že již s použitím ≥ 50 % acetonitrilu dochází k výraznému snížení trypsinové aktivity a precipitaci proteinů (Wall *et al.*, 2011). Proto nebylo použití organických rozpouštědel za účelem zvýšení účinnosti proteolýzy nadále doporučováno.

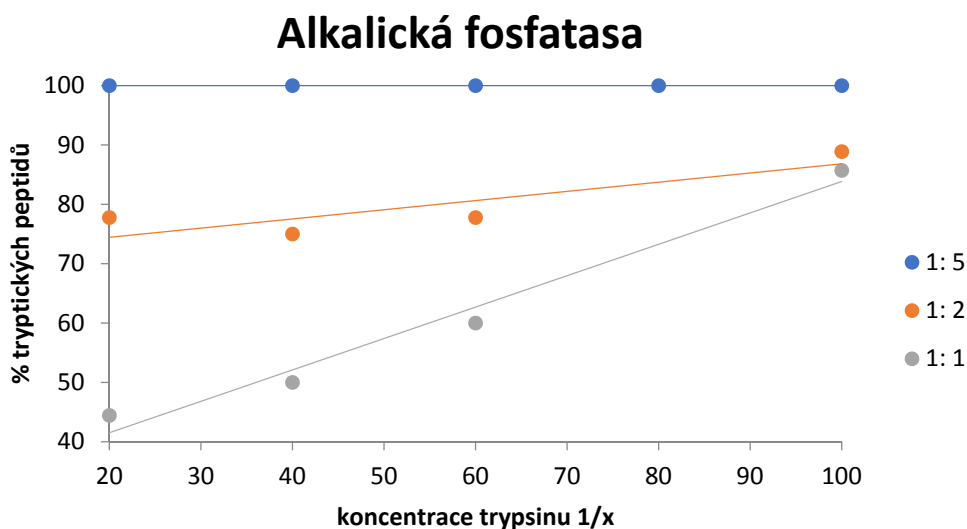


Obr. 10 Chromatogramy separace proteinového vzorku BSA štěpeného v objemu a) 200 μ l, b) 50 μ l.

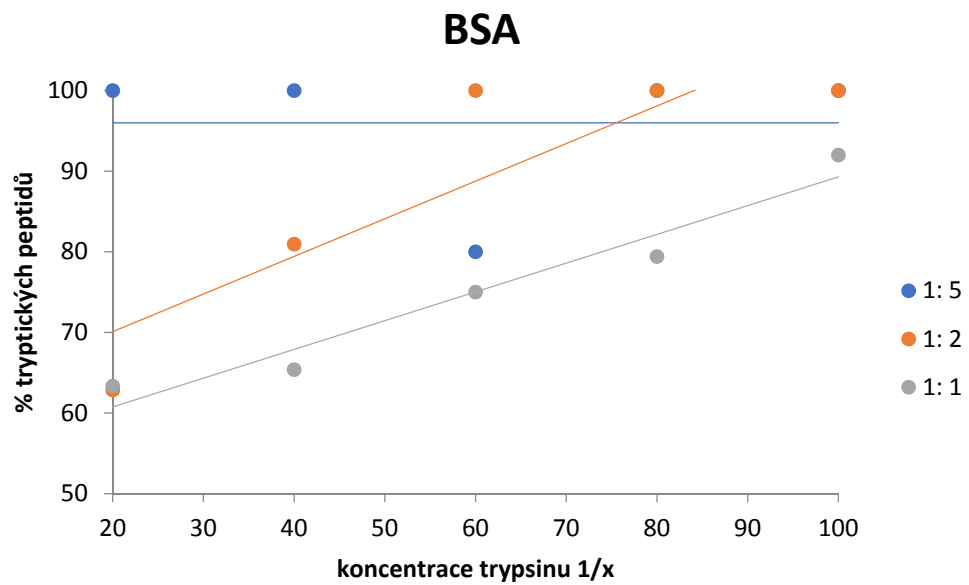
4.5 Zjištění optimální koncentrace trypsinu

Koncentrace trypsinu pro štěpení proteinů je dalším důležitým parametrem, který je vhodné optimalizovat pro dosažení maximálního výtěžku a úplnosti štěpení a opakovatelnosti map molekulových hmotností peptidových štěpů. Počet peptidů vzniklých trypsinací proteinu totiž pozitivně ovlivňuje statistické skóre při vyhodnocení identifikace (Shevchenko *et al.*, 2007). Velkým problémem spojeným s tryptickým štěpením proteinů je přidružená chymotryptická aktivita, která způsobuje výskyt chymotryptických štěpů. V případě snížení koncentrace trypsinu použité pro štěpení se úměrně sníží i koncentrace chymotrypsinu. Vzorky ALP a BSA tedy byly štěpeny různými koncentracemi trypsinu vzhledem k množství proteinu ve vzorku – 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 a 1:100. Vzorky byly štěpeny v objemu 50 μ l a obsahovaly 1 μ g, 2,5 μ g a 5 μ g BSA či ALP značené lehkou značkou a 5 μ g příslušného standardu značeného těžkou značkou. Pro jednotlivé varianty množství proteinu a koncentrace trypsinu byl vytvořen pouze jeden vzorek. Informace pro serotransferin byla získána z identifikace vzorků ALP. U získaných dat po LC-MS analýze bylo spočítáno množství tryptických a chymotryptických peptidů. Jejich procentuální poměr je vyneseno v níže uvedených grafech (Obr. 11) proti trypsinovým koncentracím. Získané závislosti ukazují, že nejlepšími výsledky bylo dosaženo u všech proteinů při největším ředění trypsinu 1:100. Pro vzorky s poměrem L:H 1:1 došlo u ALP ke zlepšení procentuálního množství tryptických peptidů až o 30 %. U vzorků s L:H 1:5 však k nárůstu % tryptických štěpů s rostoucím ředěním trypsinu nedošlo.

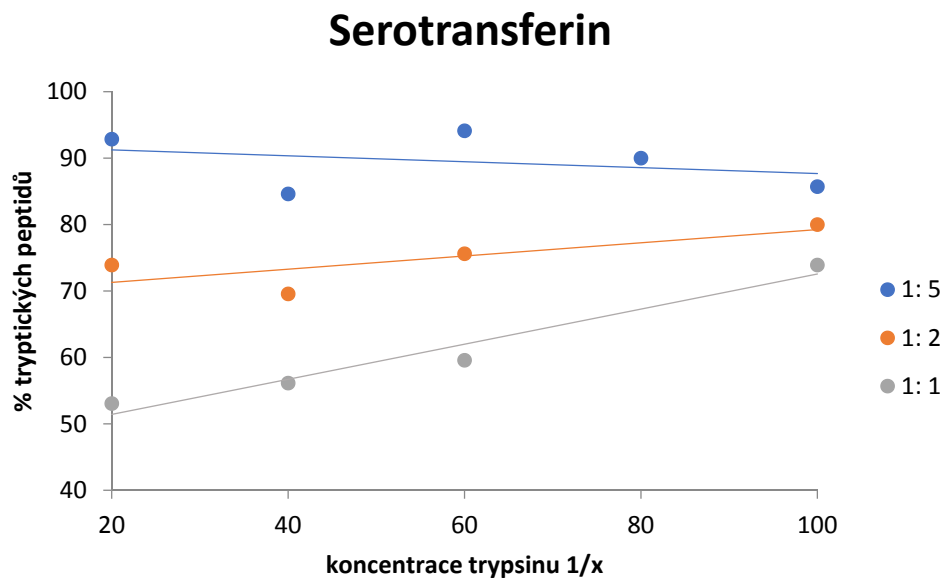
a)



b)



c)



Obr. 11 Závislost procentuálního množství tryptických peptidů na koncentraci trypsinu vztažené k množství proteinu ve vzorku. Měření bylo provedeno se sadami vzorků s poměrem L:H 1:5, 1:2 a 1:1. Výsledky byly zpracovány pro a) ALP, b) BSA a c) serotransferin.

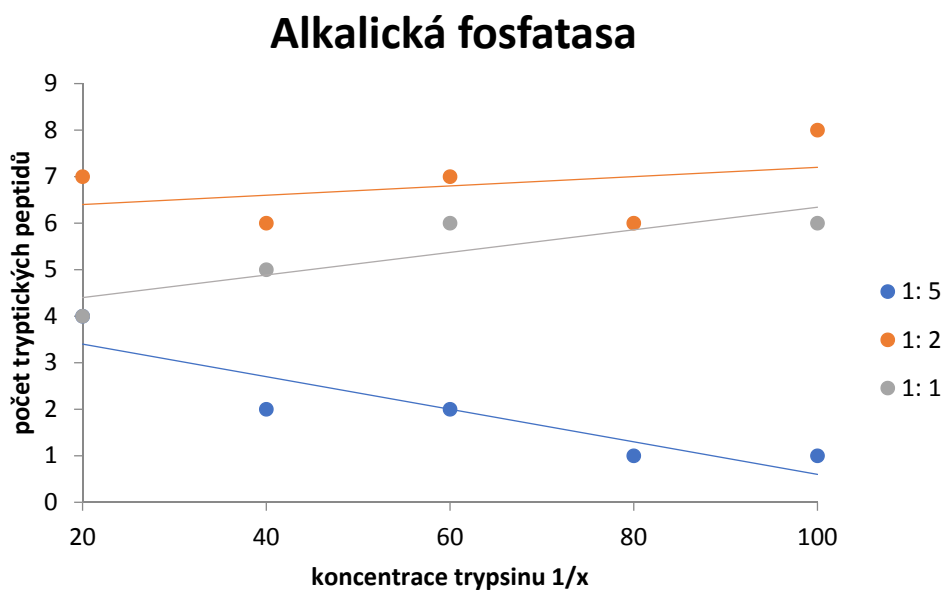
Dalším parametrem sledovaným v rámci tohoto experimentu byl počet a výskyt vhodných tryptických peptidů. Bylo zjištěno, že se snižující se koncentrací trypsinu počet peptidů štěpených trypsinem klesá (Obr 12). U ALP a BSA dokonce došlo k poklesu k nulovým hodnotám pro vzorky s L:H 1:5. Pro ALP se zdá patrný rostoucí trend u vzorků s poměrem L:H 1:2 a 1:1. Vzhledem k tomu jak nízké počty peptidů však vzorky ALP poskytovaly, je tento nárůst zanedbatelný. Pro BSA a serotransferin jsou proto získané závislosti směrodatnější.

Po zvážení výsledků týkajících se procentuálního množství a počtu tryptických peptidů bylo třeba nalézt kompromis pro výběr vhodné koncentrace trypsinu. Jako optimální tak byla vybrána koncentrace trypsinu 1:60 vzhledem k množství proteinu ve vzorku, jelikož dochází ke znatelnému snížení chymotryptické aktivity při zachování uspokojivého množství získaných peptidů.

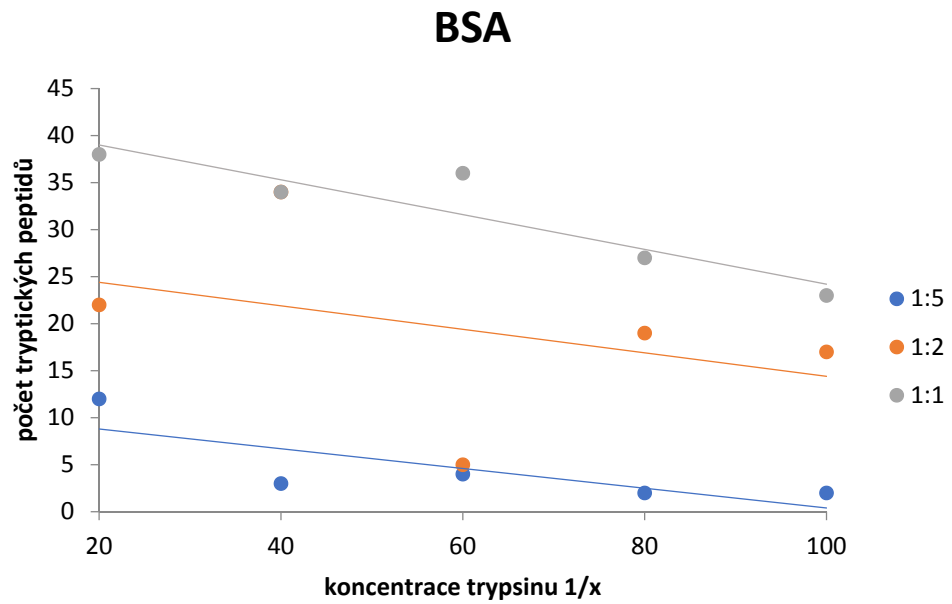
V případě, že by chymotryptická aktivita doprovázející použitý trypsin nebyla tak vysoká, tedy při použití trypsinu o vysoké čistotě, trypsinová koncentrace 1:40 by mohla být pro proteolýzu optimálnější.

Zajímavé je, že pro značení peptidů bylo nutné použití dvojnásobného množství lehké značky, než ve svém protokolu uvádějí Boersema *et al.*, 2009. Množství lehké značky bylo navýšeno, jelikož v opačném případě bylo identifikováno velké množství nedoznačených peptidů s negativním dopadem na jejich kvantifikaci.

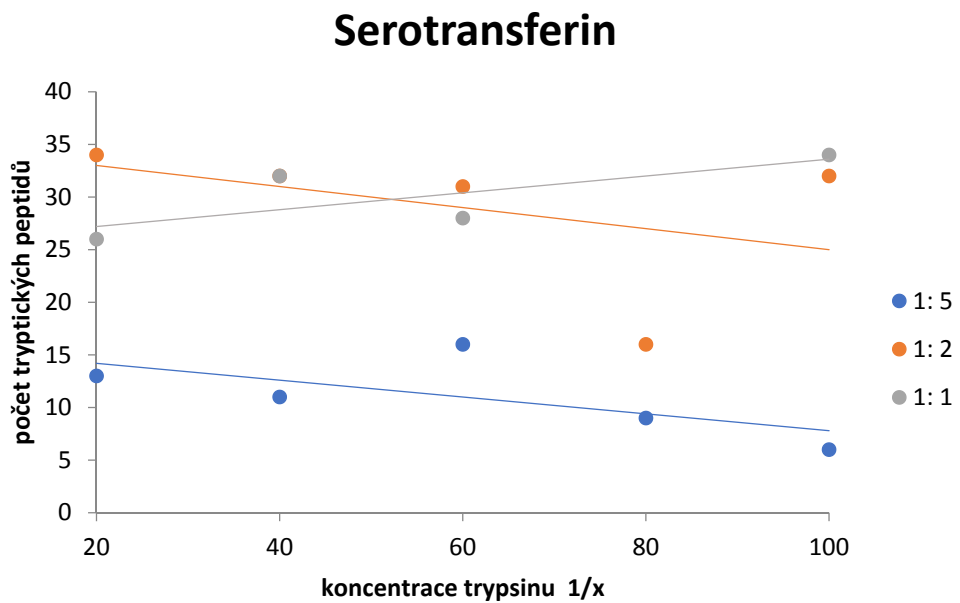
a)



b)



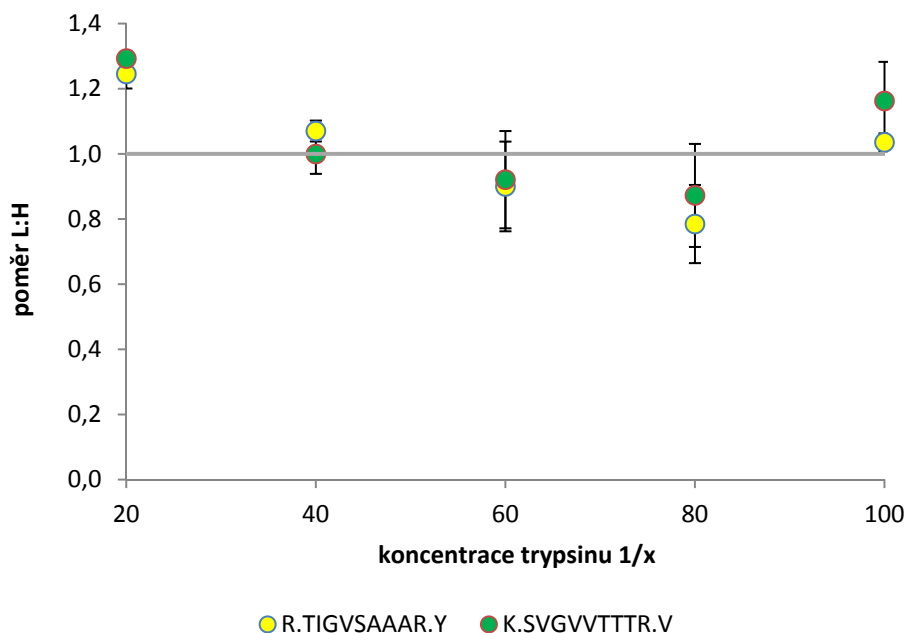
c)



Obr. 12 Závislost počtu tryptických peptidů na koncentraci trypsinu vztážené k množství proteinu ve vzorku. Měření bylo provedeno se sadami vzorků s poměrem L:H 1:5, 1:2 a 1:1. Výsledky byly zpracovány pro a) ALP, b) BSA a c) serotransferin.

4.6 Zjištění vlivu trypsinové koncentrace na dosažení odpovídajícího poměru L:H

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda má koncentrace trypsinu vliv na přesnost dosažení daného poměru lehké a těžké značky L:H ve vzorku. Pokus byl proveden se vzorky ALP s obsahem proteinu 5 μg ve vzorku. Tyto vzorky byly štěpeny v objemu 50 μl v triplicátech trypsinem v poměrech 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 a 1:100 vzhledem k obsahu ALP. Vzorky byly značeny lehkou značkou a smíchány s těžce značenými standardy v poměru 1:1. Pro vyhodnocení získaných dat byly použity dva peptidy R.TIGVSAAAR.Y a K.SVGVVTTTR.V, které při předchozích experimentech jako jediné poskytovaly vysokou intenzitu, reprodukovatelnost a kvantitativní odezvu na změny koncentrace vstupního proteinu. Oba sledované peptidy vykazovaly podobnou tendenci chování při různém ředění trypsinu (Obr. 13). Při nejvyšší koncentraci trypsinu 1:20 byl poměr L:H vysoký a směrem k ředění trypsinu 1:80 postupně klesal k naopak příliš nízkým hodnotám. Překvapivé bylo, že při koncentraci trypsinu 1:100 došlo ke zdatelnému nárůstu poměru L:H. Nejlepšího poměru bylo dosaženo při koncentraci trypsinu 1:40, nicméně pro další experimenty byla jako kompromis vzhledem k výsledkům v Kap. 4.5 vybrána koncentrace 1:60.



Obr. 13 Graf zobrazující dosažení správnosti poměru L:H 1:1 při měnící se koncentraci trypsinu použitého pro štěpení vzorků.

4.7 Štěpení s využitím komerčního purifikovaného trypsinu

Jak již bylo zmíněno, kvalita a čistota trypsinu použitého pro štěpení proteinů má zásadní vliv na výsledek provedených experimentů. Kvalita štěpení může být negativně ovlivněna jednak přítomností chymotrypsinu a jednak tvorbou autolytických peptidů samotného trypsinu. Podíl chymotrypsinu doprovázejícího trypsin může být snížen například afinitní purifikací trypsinu. Autolýzu trypsinu je možné eliminovat modifikací Arg a Lys zbytků v jeho molekule například alkylací (Rice *et al.*, 1977).

Účelem tohoto experimentu bylo zjistit, do jaké míry se bude odlišovat kvalita dat získaná pro vzorky štěpené dvěma trypsinu s různou kvalitou. První trypsin modifikovaný rafinosou byl připravovaný a běžně používaný na oddělení proteinů a proteomiky v Centru regionu Haná a druhý byl komerčně dostupný purifikovaný trypsin od firmy Promega upravený reduktivní metylací. Pro obě varianty trypsinu byly v triplicátech připraveny lehce značené vzorky s obsahem 1, 2,5, 5, 10 a 25 μg ALP a k nim těžce značené standardy 5 μg ALP. Koncentrace trypsinu byla v poměru 1:60 oproti množství proteinů ve vzorku. Po získání dat z hmotnostní analýzy byl vyhodnocován procentuální poměr tryptických a chymotryptických peptidů pro ALP, ale také pro BSA a serotransferin doprovázející alkalickou fosfátasu ve vzorcích (Tab. 9). Bylo zjištěno, že u BSA a serotransferinu došlo při použití čistějšího trypsinu k nárůstu množství tryptických peptidů asi o 30 %. Zároveň byl vyhodnocován počet identifikovaných tryptických peptidů. Ukázalo se, že u BSA a serotransferinu opět došlo ke zlepšení, přičemž se počet identifikovaných tryptických peptidů navýšil asi o 10 (Tab. 10). Překvapivé bylo, že u ALP nedošlo ke zlepšení žádného ze dvou parametrů. Na druhou stranu je počet dvanácti peptidů vzhledem k ne zcela ideální sekvenci ALP (Kap 4.3, Obr. 7) poměrně uspokojivý a i procentuální množství tryptických peptidů bylo oproti BSA a serotransferinu vyšší již s použitím rafinosovaného trypsinu.

Dále byly vytvořeny kalibrační křivky vybraných peptidů jednotlivých tří proteinů (Obr. 14). Pro ALP byly již během předchozích experimentů vybrány dva peptidy s vhodným aminokyselinovým složením poskytující vysokou intenzitu, reprodukovatelnost a lineární odezvu na změny koncentrace – R. TIGVSAAAR.Y a K.SVGVVTTTR.V. Podrobnější popis toho, co je považováno za vhodné či nevhodné aminokyselinové složení peptidové sekvence, je uveden v Kap 4.3.

Tab. 9 Procentuální zastoupení tryptických peptidů u proteinů ALP, BSA a serotransferinu ve vzorcích štěpených dvěma roztoky trypsinu s různou čistotou.

protein	% tryptických peptidů	
	rafinosovaný trypsin	Promega trypsin
ALP	79,5 ± 1,3	80,4 ± 3,3
BSA	61,7 ± 2,7	95,9 ± 0,3
serotransferin	65,5 ± 2,7	92,9 ± 1,3

Tab. 10 Množství identifikovaných tryptických peptidů u proteinů ALP, BSA a serotransferinu ve vzorcích štěpených dvěma roztoky trypsinu s různou čistotou.

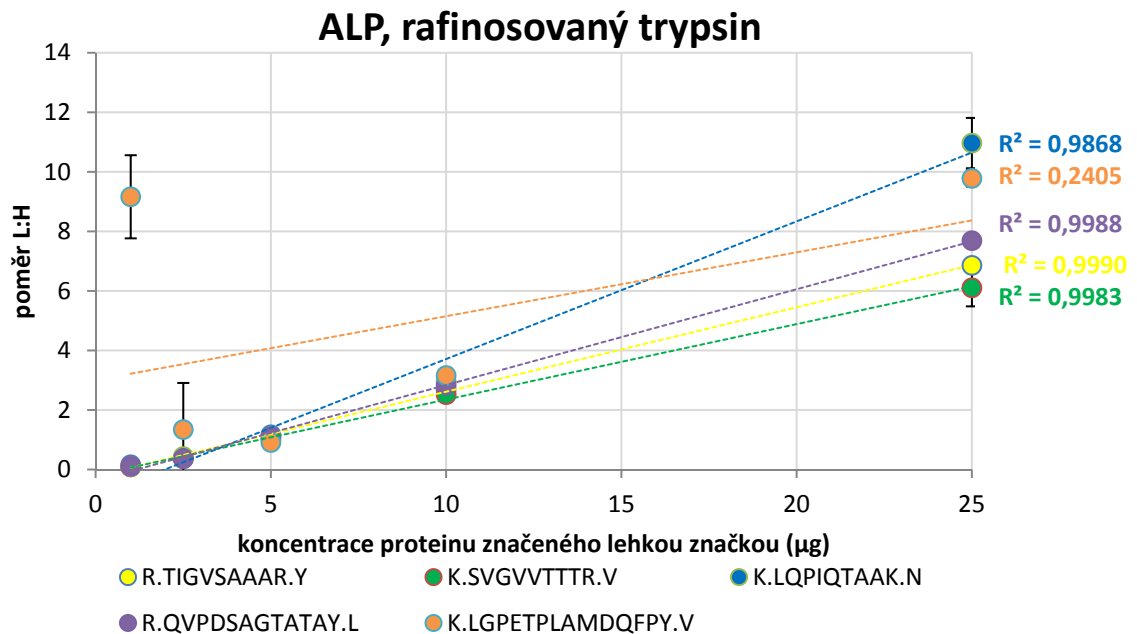
protein	počet tryptických peptidů	
	rafinosovaný trypsin	Promega trypsin
ALP	12 ± 1	12 ± 1
BSA	13 ± 0	23 ± 2
serotransferin	46 ± 3	35 ± 2

Také byl pro porovnání vybrán jeden peptid s nevhodným aminokyselinovým složením K.LQPIQTAALK.N a dva semitryptické peptidy R.QVPDSAGTATAY.L, K.LGPETPLAMDQFPY.V. Zhodnocení vlivu aminokyselinového složení na kvalitu získaných dat je předmětem následující kapitoly. Pro BSA a serotransferin byly peptidy vybrány náhodně.

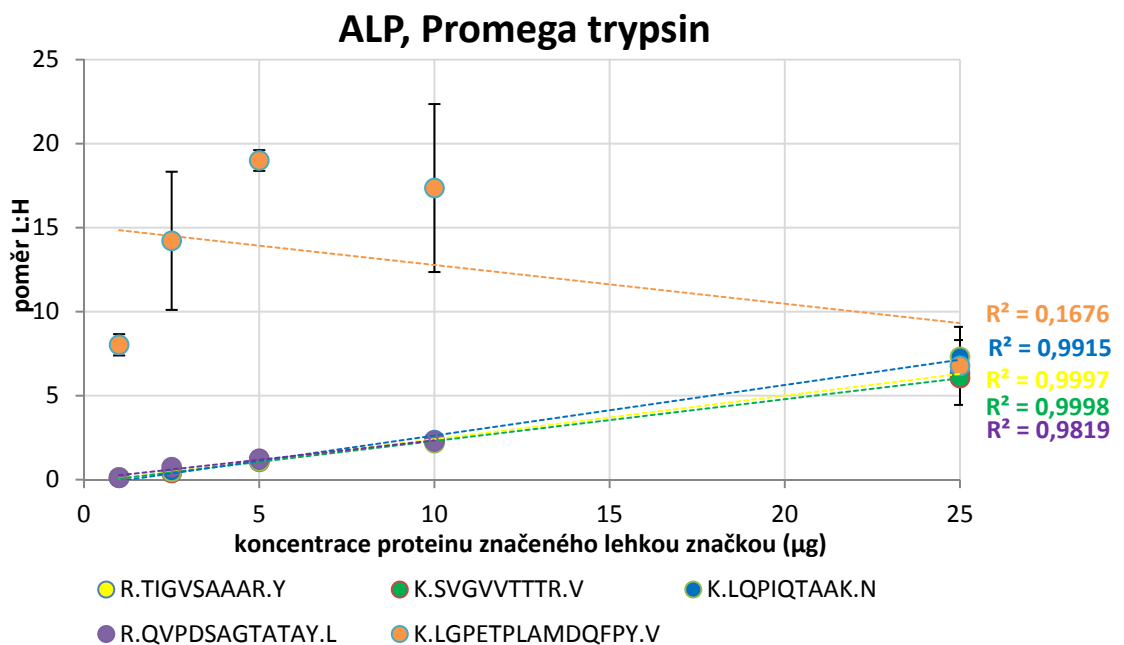
Při porovnání linearity získaných křivek peptidů jednotlivých proteinů u vzorků štěpených dvěma různými roztoky trypsinu jsou patrné určité změny. K pozitivnímu ovlivnění linearity kalibračních závislostí došlo u ALP však pouze v případě peptidů s vhodným aminokyselinovým složením, tedy peptidů R. TIGVSAAAR.Y a K.SVGVVTTTR.V. U serotransferinu došlo v případě peptidu K.GDVAFVK.D také ke zvýšení linearity. Hodnocení linearity u peptidů s nevhodným aminokyselinovým složením by vzhledem k jejich nízké reprodukovatelnosti nebylo relevantní, avšak i u některých těchto peptidů BSA a serotransferinu se linearita zvýšila v případě štěpení čistějším trypsinem. Především však došlo díky použití komerčně dostupného trypsinu k dosažení správnějších poměrů L:H. Při štěpení s využitím rafinosovaného bylo problémové dosažení optimálního poměru L:H pro krajní hodnoty sledovaných koncentrací proteinů, tedy vzorků s L:H 1:5 a 5:1. Použitím trypsinu od firmy Promega bylo dosaženo správnějšího poměru 1:5 u příslušných vzorků, především pro BSA. Promega trypsin byl proto používán i v následujících experimentech. Tento experiment ukázal, že komerčně dostupný trypsin o vyšší čistotě poskytuje větší procentuální

zastoupení a množství tryptických peptidů a hlavně přesnější hodnoty L:H, takže je vhodnější pro kvantitativní proteomické experimenty. Rafinosovaný trypsin, poskytující větší množství chymotrytických štěpů, je vhodný pro použití primárně v projektech zaměřených na identifikaci proteinů nebo štěpení proteinů s nižším obsahem vhodných tryptických míst (nižší obsah lysinu a argininu).

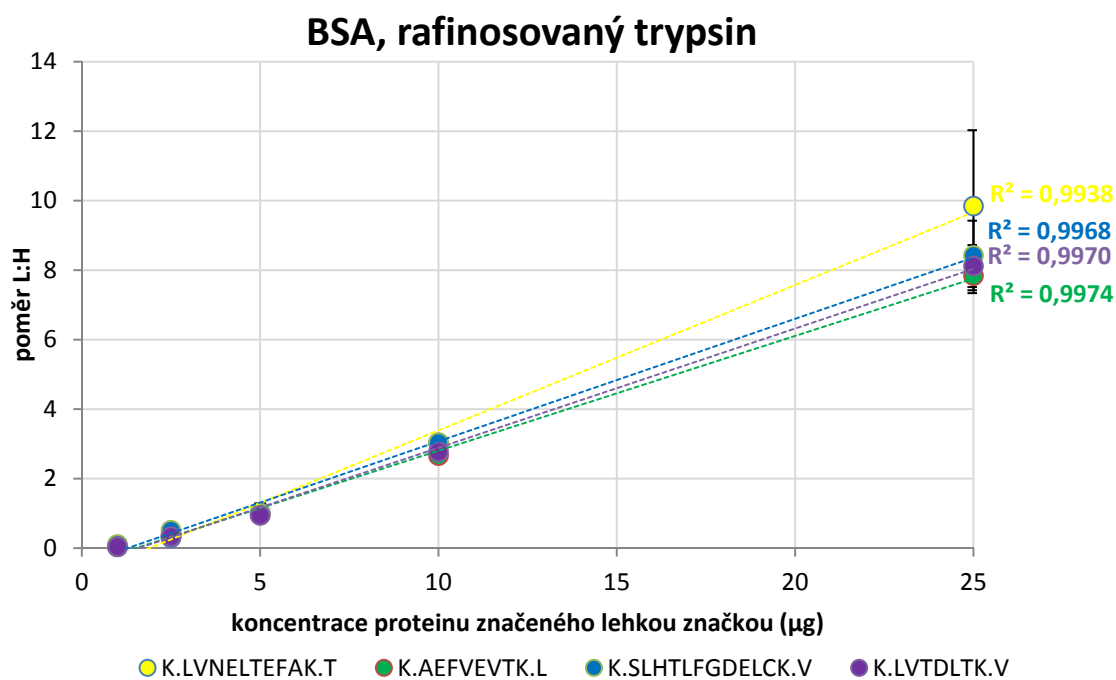
a)



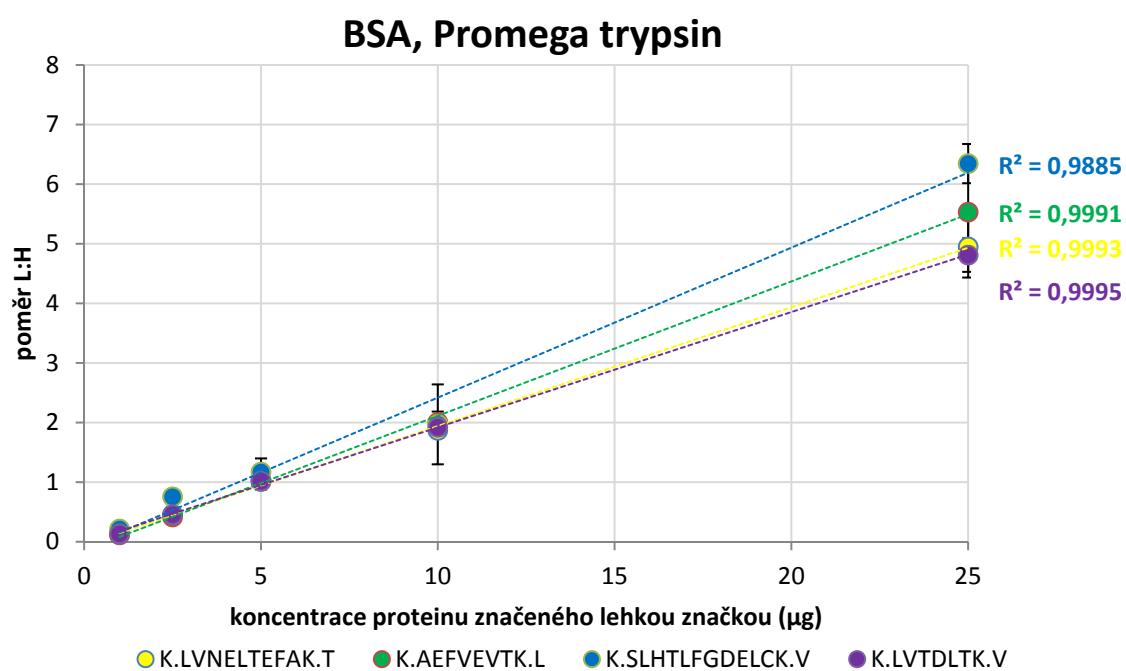
b)



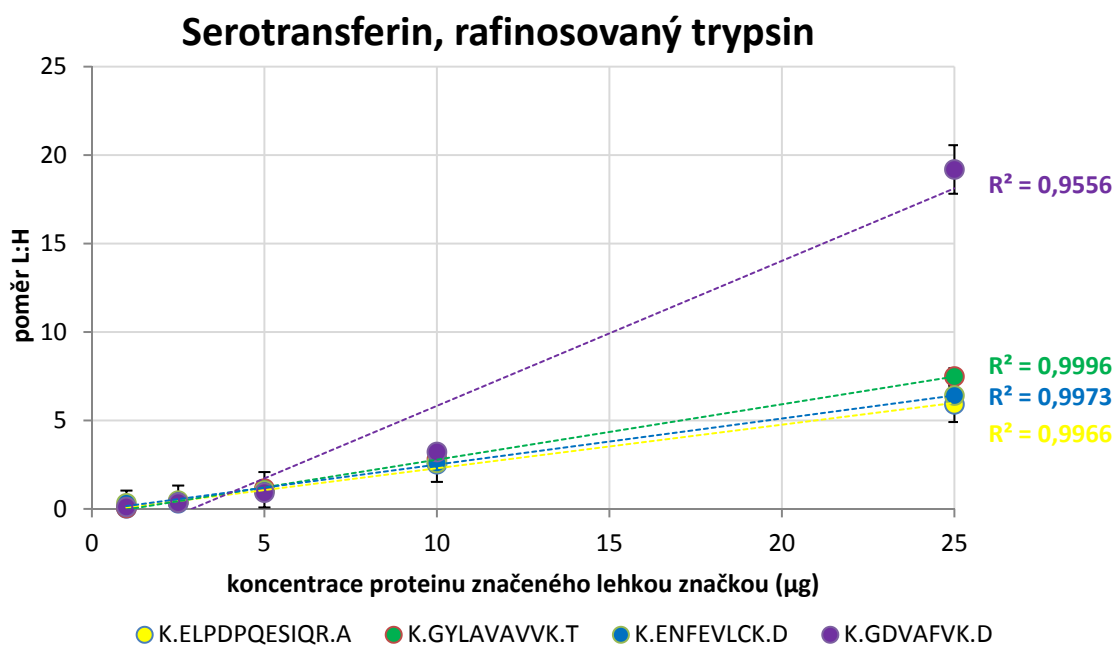
c)



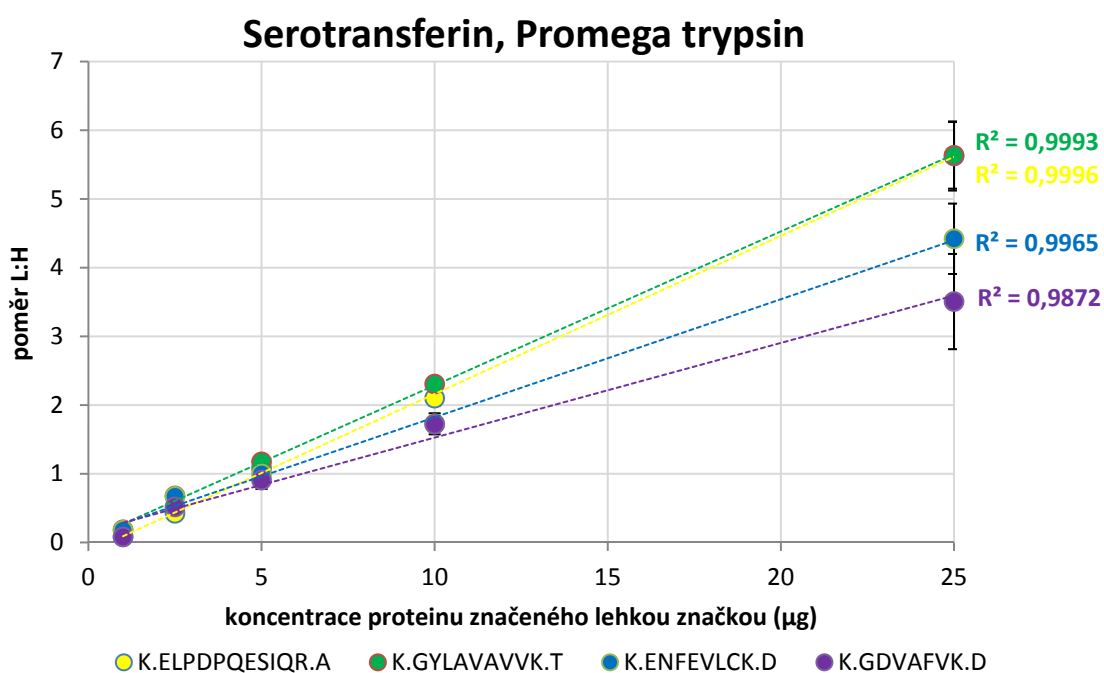
d)



e)



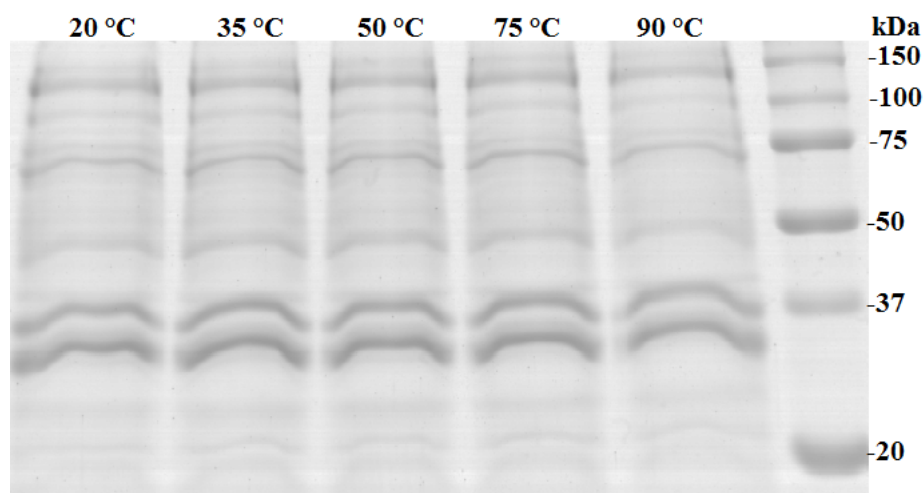
f)



Obr. 14 Kalibrační křivky vybraných peptidů získané štěpením vzorků s koncentrací 1-25 μg v poměru L:H 1:5 - 5:1a) pro ALP štěpenou méně čistým rafinosovaným trypsinem, b) pro ALP štěpenou trypsinem od firmy Promega, c) pro BSA štěpený méně čistým rafinosovaným trypsinem, d) pro BSA štěpený trypsinem od firmy Promega, e) pro serotransferin štěpený méně čistým rafinosovaným trypsinem, f) pro serotransferin štěpený trypsinem od firmy Promega.

4.8 Studium míry agregace proteinového vzorku po tepelném ovlivnění

Pro tento experiment byly vytvořeny vzorky obsahující pouze ALP, či ALP a inhibitor. Vzorky byly zahřívány na různé teploty po dobu 5 min, centrifugovány a v odebraných alikvotech supernatantu byla sledována relativní změna proteinového profilu podle intenzity zbarvení jednotlivých proteinových pásů. Účelem zahřívání těchto vzorků na různé teploty bylo dosáhnout tepelné denaturace s následnou agregací proteinů. Vlivem rostoucí teploty mělo dojít k vysrážení proteinů z roztoku ve větší míře a tedy k jejich úbytku v odebraných alikvotech supernatantu. Ukázalo se, že doba zahřívání 5 min je pro agregaci proteinů a jejich vyloučení z roztoku zcela nedostačující. Intenzita proteinových pásů se totiž s rostoucí teplotou nezměnila (Obr. 15). Je také možné, že množství 5 μg proteinového vzorku bylo příliš vysoké pro rychlý průběh agregace. Bylo totiž zjištěno, že ačkoliv počáteční teplota agregace s rostoucí koncentrací proteinu klesá, tak zároveň klesá i rychlost agregace (Eronima *et al.*, 2011).

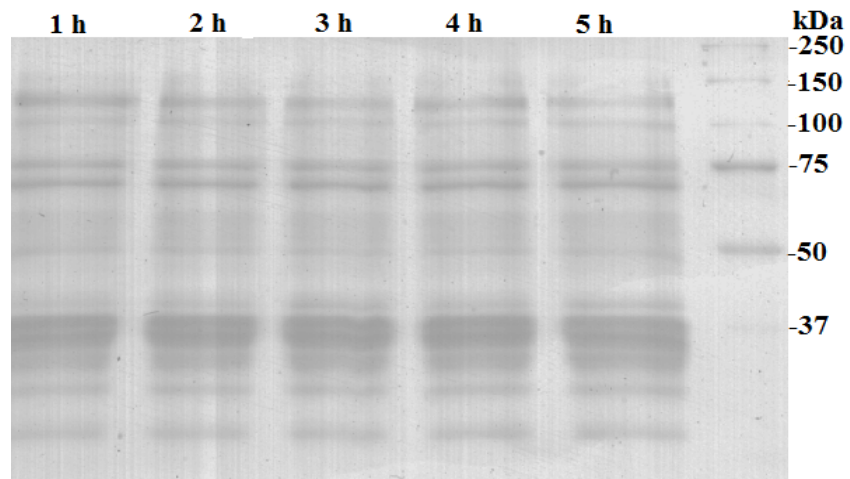


Obr. 15 Elektroferogram separace vzorků ALP inkubovaných 5 min při různých teplotách.

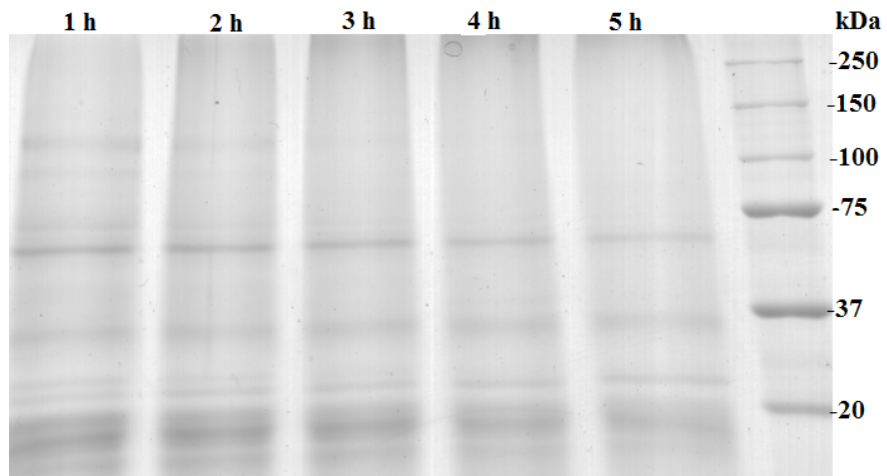
Na výše uvedeném elektroferogramu je pouze záznam separace vzorků s obsahem pouze ALP, pro ALP a inhibitor byl totiž získán zcela stejný výsledek. Odolnost proteinů vůči agregaci byla překvapivá, jelikož Martinez Molina *et al.*, 2013, Savitski *et al.*, 2014 i Huber *et al.*, 2015 při své práci zahřívali své vzorky na různé teploty pouze 3 min. Za tuto dobu dosáhli prokazatelné agregace proteinů. Martinez Molina *et al.*, 2013 a Huber *et al.*, 2015 dokázali, že úbytek proteinů po agregaci byl již za tak krátkou dobu zahřívání jasně patrný i na membráně po Western blotu. Ve zmíněných publikacích však byly jako vzorky využívány intaktní buňky či buněčné lyzáty, kdežto v této práci byla používána směs proteinů z již purifikovaného materiálu. V natolik komplexní směsi proteinů, která je v buňkách a buněčných lyzátech může být snazší dosáhnout agregace díky většímu množství proteinů a tedy větší šanci vytvoření počátečního agregačního centra, které podporuje agregaci dalších proteinů. Z tohoto důvodu jsou tedy pravděpodobně purifikované proteiny vůči teplotě a tedy i agregaci odolnější. Molina *et al.*, 2013 navíc po tepelné inkubaci provedli ultracentrifugaci vzorků při 100000 g, je tedy možné že v našem případě použitých 25000 g nebylo pro řádné oddělení precipitátu a supernatantu dostačující.

Za účelem zjištění, při jaké teplotě a její době působení dojde ke zdatelné agregaci proteinů ve vzorku, by proveden obdobný experiment s tím rozdílem, že tentokrát byly vzorky ALP a ALP s inhibitorem podrobeny zahřívání po dobu 1-5 h při třech různých teplotách. Na Obr. 16 a) byly vzorky zahřívány na teplotu 50 °C. Ani po pěti hodinách však nedošlo k úbytku proteinového množství ve vzorcích. Dále byly vzorky obdobně zahřívány na teplotu 75 °C (Obr 16 b)). Při této teplotě již byl patrný úbytek intenzity proteinových pásů jak při srovnání se zahříváním na 50 °C, tak při srovnání doby zahřívání na 75 °C. V případě zahřívání vzorků na 90 °C se z barvených gelů již vytratily pásy pro většinu proteinů detekovaných při nižších teplotách (Obr. 16 c)). Mezi záznamy barvených gelů opět nejsou uvedeny varianty se vzorky ALP s inhibitorem, jelikož mezi odpovídajícími si výsledky se vzorky ALP nebyly patrné žádné rozdíly.

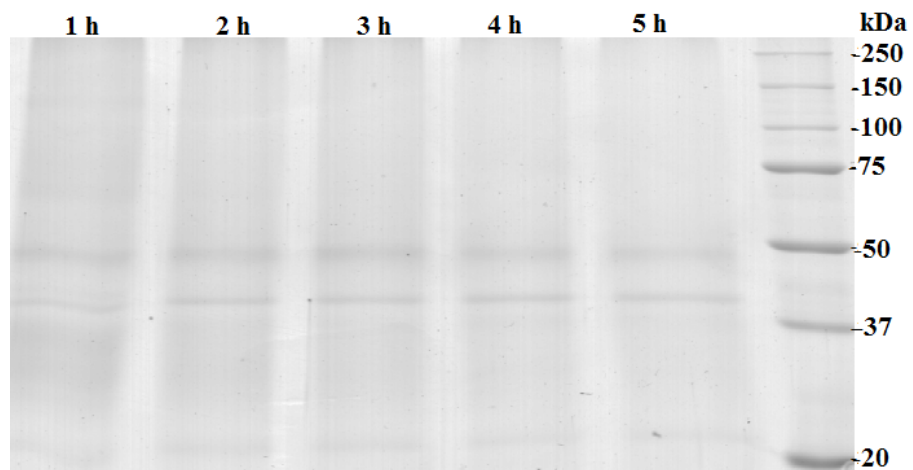
a)



b)

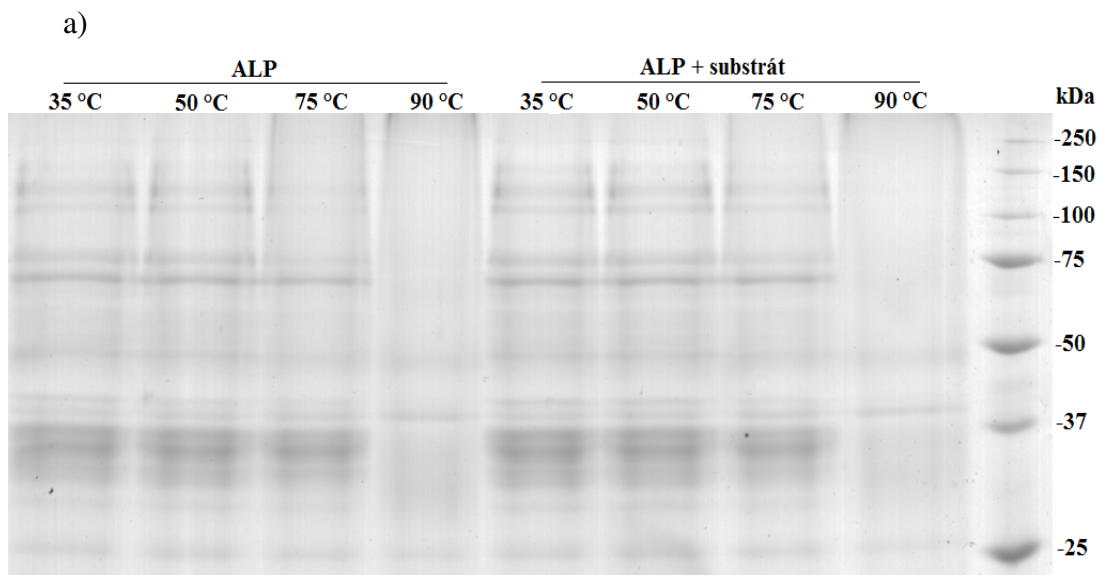


c)

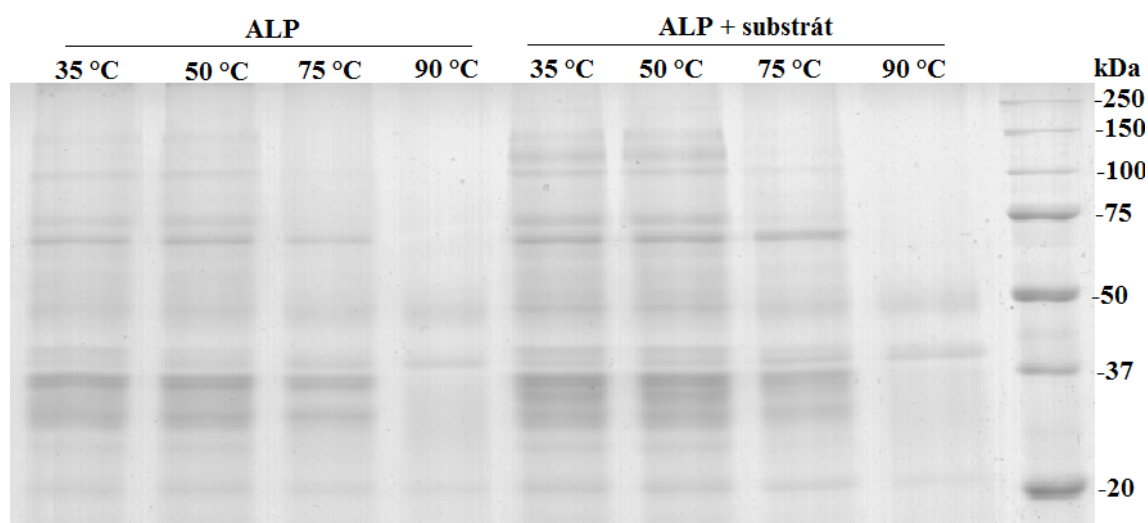


Obr. 16 Elektroferogramy separace vzorků ALP inkubovaných 1-5 h při teplotě a) 50 °C, b) 75 °C a za c) 90 °C.

Úbytek proteinů vlivem tepelné agregace pro různé teploty je v souladu s výsledky získanými v práci Yan *et al.*, 2004, kde bylo zjištěno pomocí metody dvojdimenzionální infračervené korelační spektroskopie s hemoglobinem, že při teplotě od 44-54 °C převažoval stav denaturační, kdy se rozvolňovala struktura proteinu. Teprve při teplotě od 54 -70 °C převažoval stav tepelné agregace doprovázený denurací. Ačkoliv při dvou nejvyšších použitých teplotách proteiny agregovaly, bylo nutné míru agregace zvýšit natolik, aby bylo možné získat určitý gradient nárůstu agregace i pro nižší teploty. Proto byla při následujícím experimentu po zahřívání část polovina vzorků ALP či ALP se substrátem okyselena na pH 5 za účelem snížení rozpustnosti proteinů. Na Obr. 17 a) je zachycena separace vzorků bez okyselení, přičemž je patrné, že k úbytku proteinů došlo při teplotě 75 °C a především při teplotě 90 °C, jak již znázorňovaly Obr. 16. Zároveň nebyl zřejmý žádný rozdíl mezi vzorky ALP a ALP se substrátem. U okyselených vzorků však byl patrný úbytek intenzity proteinových pásů již při nižších teplotách. Zároveň se ukázalo, že u vzorků ALP se substrátem se zachovalo větší množství proteinů a byl tak patrný určitý stabilizační efekt této interakce.



b)

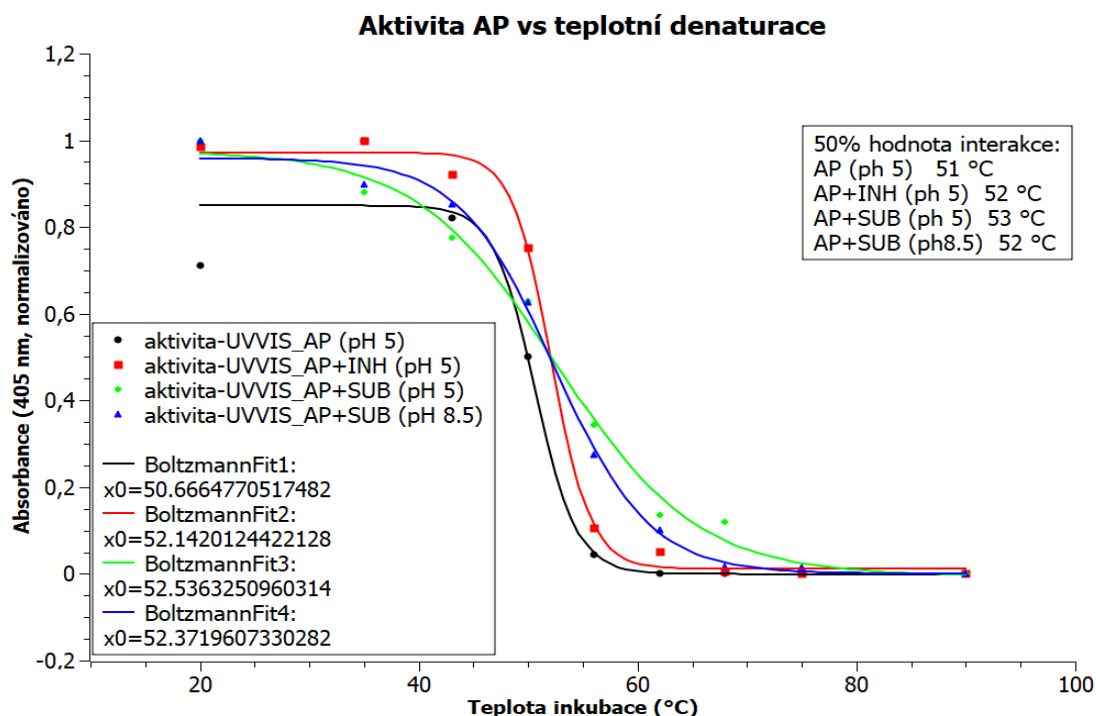


Obr. 17 Elektroferogramy separace vzorků ALP a ALP po interakci se substrátem inkubovaných 1 h při různých teplotách a) při pH 8,5 a za b) při pH 5.

4.9 Studium změn aktivity alkalické fosfatasy po zahřívání a v přítomnosti substrátu a inhibitoru

Pro studium aktivitních změn enzymové aktivity ALP v závislosti na teplotě inkubace vzorků ALP, ALP a substrátu a ALP a inhibitoru byly vzorky zahřívány 1 h při teplotách 20, 35, 43, 50, 56, 62, 68, 75 a 90 °C. Po zahřívání a před centrifugací byly vzorky okyseleny na pH 5 a pro ALP a substrát byla připravena neokyselená sada vzorků pro porovnání vlivu na výslednou aktivitu. Všechny vzorky byly připraveny v duplikátech. K alikvotům supernatantů po zahřívání byl přidán roztok substrátu ALP *p*-nitrofenylfosfátu. Následně byla měřena absorbance vzniklého barevného produktu reakce. Získané hodnoty absorbance byly normalizovány na výchozí hodnotu 1 pro 20 °C a na hodnotu 0 pro 90 °C. Data relativní ztráty aktivity enzymu ALP v závislosti na teplotě inkubovaných vzorků byla vynesena do grafu a proložena sigmoidní funkcí (Boltzmann-sigmoid fit, SciDAVis v1.D005; Obr. 18). Je patrné, že přítomnost vhodného substrátu pozitivně ovlivnila termostabilitu ALP, jelikož došlo k mírnému posunu zachování enzymové aktivity ALP u vyšší teploty. ALP bez substrátu ztratila 50 % aktivity v oblasti 51 °C, kdežto v přítomnosti inhibitoru k této ztrátě došlo při 52 °C a vlivem přítomnosti substrátu přišla ALP o 50 % své aktivity při 52-53 °C. Zároveň bylo zjištěno, že okyselení vzorků na pH 5 po tepelné inkubaci nemělo zásadní

vliv na změnu aktivity ALP, jelikož křivky získané pro ALP + substrát měly velmi podobný průběh při pH 5 (křivka zelená; Obr. 18) i 8,5 (křivka modrá).



Obr. 18 Relativní pokles aktivity ALP vyjádřený jako závislost absorbance na inkubační teplotě. ALP byla inkubována samotná, po interakci s inhibítorem a po interakci se substrátem. Absorbance byly normalizovány na hodnotu 1 pro 20 °C a na 0 pro 90 °C. Součástí grafu jsou hodnoty 50 % ztráty enzymové aktivity ALP samotné či po inkubaci s interakčním partnerem.

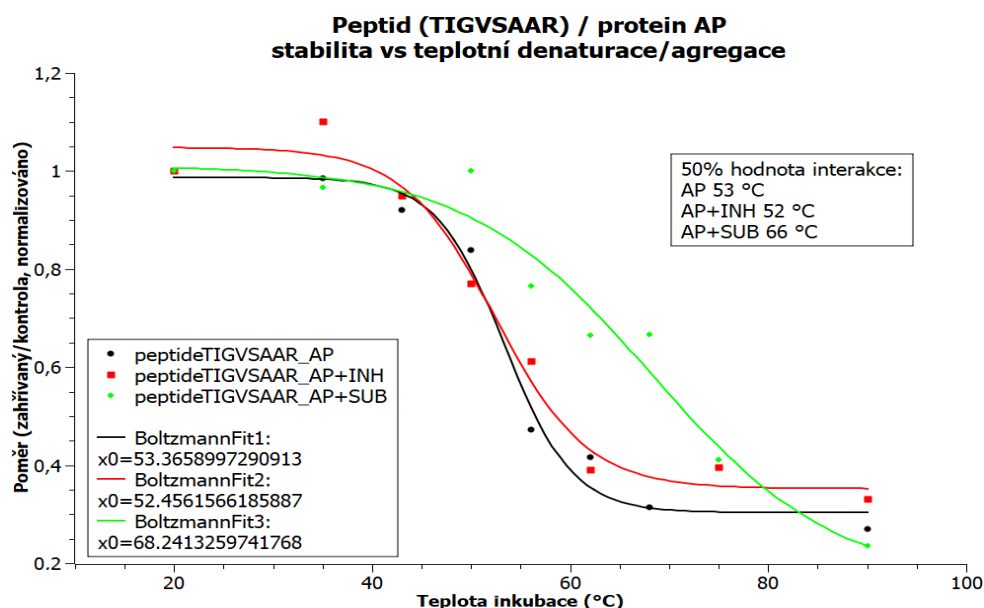
4.10 Úbytek ALP vlivem agregace ve vzorcích po tepelném ovlivnění a v přítomnosti substrátu a inhibitoru

Stabilizace proteinu ALP vlivem interakce se substrátem a inhibítorem byla sledována také pomocí metod kvantitativní proteomiky s využitím značení technikou reduktivní dimethylace a následné LC-MS/MS analýzy proteolyticky štěpených vzorků. Tyto vzorky byly připraveny stejně jako vzorky použité ke studiu závislosti stability enzymové aktivity, přičemž pro tuto analýzu byl použit další alikvot odebrané rozpustné frakce vzorků po zahřívání a následném okyselení na pH 5. Z Obr. 19 a) je patrný rozdíl teplotního posunu mezi křivkami pro vzorky ALP (černá křivka) a vzorky inkubovanými v přítomnosti substrátu (zelená křivka). Hodnota 50% stability se mezi těmito vzorky změnila o 13 °C ve prospěch vzorků inkubovaných se substrátem, což svědčí o poměrně účinném vlivu substrátu *p*-NPP na tepelnou stabilizaci ALP. Pro peptid K.SVGVVTTTR.V (Obr. 19 b)) bylo dosaženo obdobných výsledků

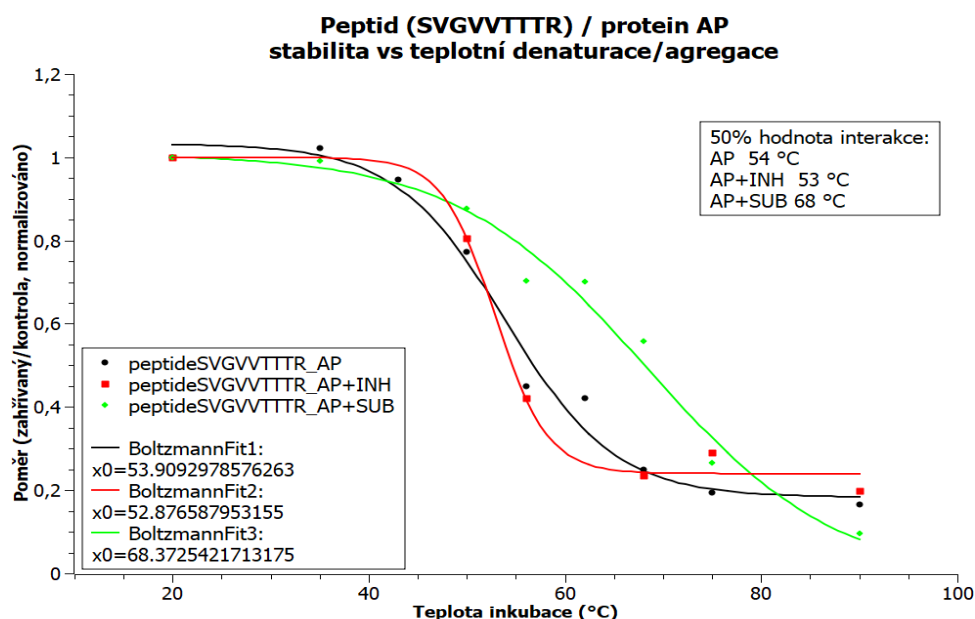
se substrátem *p*-NPP, který při 50% úbytku stability navýšil odolnost ALP vůči agregaci o 12 °C. Velmi podobného výsledku dosáhli Molina *et al.*, 2013 s použitím antimetabolitem raltitrexed vázajícího se na thymidilátsynthasu. Buněčný lyzát s obsahem thymidilátsynthasy vykazoval při 50% relativní intenzitě proteinových pásů po Western blotu teplotní posun o ± 12 °C v případě přítomnosti látky raltitrexed. Pro intaktní buňky došlo ve zmíněné práci k teplotnímu posunu za stejných podmínek o 9 °C. V jiné publikaci (Huber *et al.*, 2015) ovšem nebyly teplotní posuny mezi kontrolními vzorky a vzorky s přítomností interagující látky tak výrazné. Například pro inhibitor Nudix hydrolasy MTH1 (S)-crisontinib byl teplotní posun při 50% abundanci proteinů ± 5 °C oproti kontrolnímu vzorku intaktních buněk s MTH1. V tomto případě však byly křivky teplotních závislostí získány s využitím metod kvantitativní proteomiky.

Menšího teplotního posunu bylo dosaženo se vzorky ALP inkubovanými s inhibitorem L-fenylalaninem (Obr. 19 a), b), červená křivka), přičemž byl teplotní posun při 50% úbytku stability dokonce o 1 °C nižší v případě obou sledovaných peptidů, než pro vzorky samotné ALP. Nicméně při vyšších teplotách – 75 až 90 °C je patrné, že i v přítomnosti inhibitoru došlo k mírné stabilizaci ALP vůči tepelné agregaci vzhledem k tomu, že při těchto vyšších teplotách byl poměr vyjadřující množství rozpustné frakce proteinů ve vzorcích vyšší, než v případě vzorků samotné ALP. L-fenylalanin měl na stabilizaci proteinu pravděpodobně menší účinky než substrát *p*-NPP, jelikož inhibuje ALP nekompetitivně (Ghosh a Fishman, 1966) a neváže se tedy na rozdíl od substrátu přímo do aktivního místa.

a)



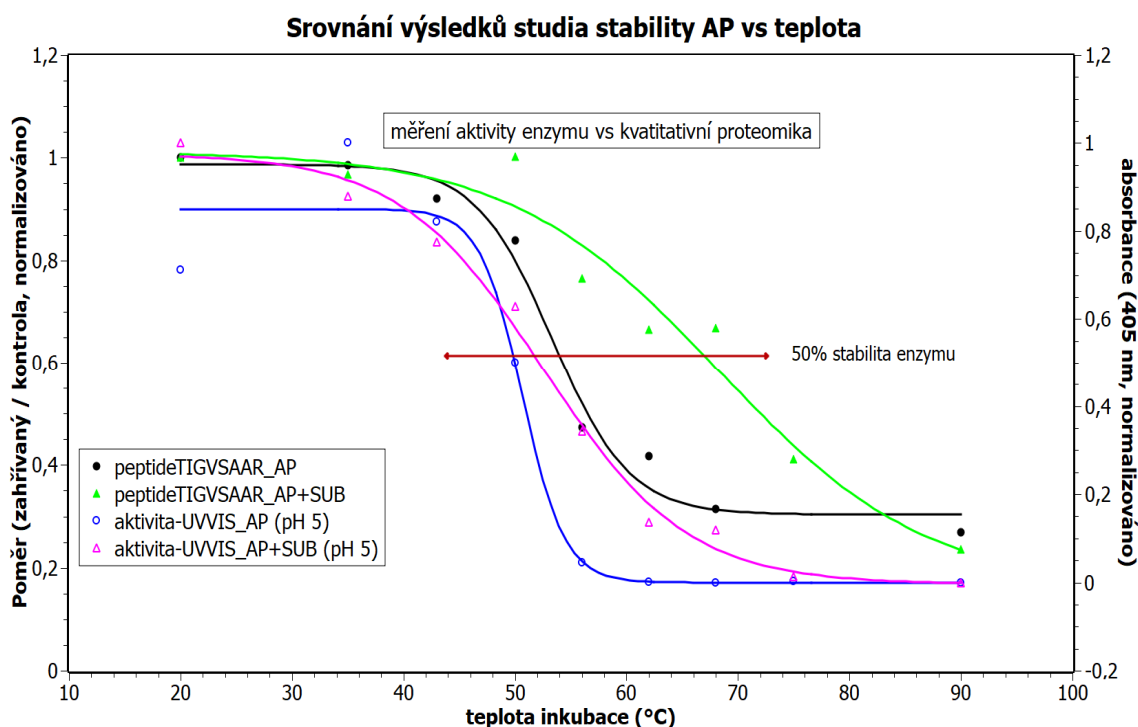
b)



Obr. 19 Relativním poklesem proteinového množství ve vzorku vlivem tepelné agregace pro peptid a) R.TIGVSAAR.Y a za b) K.SVGVTTR.V Křivky byly získány pro vzorky ALP, ALP po interakci se substrátem a ALP po interakci s inhibitorem. Inkubace vzorků probíhala 1 h při 20-90°C. Hodnoty byly normalizovány na výchozí poměr 1 pro 20 °C. Součástí grafu jsou hodnoty 50 % interakce pro odečtení rozdílů stability ALP samotné či po inkubaci s interakčním partnerem.

Na následujícím obrázku (Obr. 20) je zobrazeno srovnání výsledků týkajících se tepelné stability ALP detekovaných pomocí spektrofotometrického měření aktivity a získaných pomocí metod kvantitativní proteomiky. Toto srovnání zároveň

pravděpodobně odpovídá rozdílům mezi teplotou denaturace ALP detekované ztrátou aktivity a teplotou agregace sledované proteomickou metodou pomocí detekce zbytku nevysrážené ALP v supernatantu. Je patrné, že denaturace a agregace jsou procesy teplotně oddělené. Borzova *et al.*, 2016 navíc při studiu BSA pomocí DSC potvrzuje, že jsou tyto procesy odděleny v čase díky rozdílné rychlosti těchto procesů. Rychlost procesu tepelné denaturace spojená s rozvolňováním struktury proteinu je přibližně shodná s rychlostí procesu agregace při 60 °C. Pro ALP bylo při 50 % hodnotách stability enzymu zjištěno, že teplotní posun mezi denaturací, zastupovanou měřením aktivity (modrá křivka) a agregací, zastupovanou úbytkem množství proteinu v supernatantu (černá křivka), byl 3 °C. Pro ALP inkubovanou společně se substrátem *p*-NPP činil teplotní posun mezi denaturací (purpurová křivka) a agregací (zelená křivka) 13 °C. Přítomnost substrátu *p*-NPP měla tedy pozitivní vliv na stabilizaci ALP jak proti ztrátě aktivity, tak proti tepelné agregaci, přičemž agregace byla z hlediska teplotního posunu omezena ve větší míře, než ztráta aktivity.



Obr. 20 Porovnání relativní poklesu aktivity ALP vyjádřený jako závislost absorbance na inkubační teplotě měřený spektrofotometricky (pravá osa) s relativním poklesem proteinového množství ve vzorku vlivem tepelné agregace pro peptid R.TIGVSAAR.Y měřeným metodami kvantitativní proteomiky. Pro názornost byly zobrazeny křivky pro vzorky ALP a ALP po interakci se substrátem. Inkubace vzorků probíhala 1 h při 20-90°C. Hodnoty absorbance byly normalizovány na 1 pro 20 °C a 0 pro 90 °C. Hodnoty vyjadřující úbytek množství proteinu ve vzorcích byly normalizovány na výchozí poměr 1 pro 20 °C.

5 ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo optimalizovat metody pro kvantitativní analýzu tepelné stability proteinu. K tomu byl využíván protein alkalická fosfatasa. Díky skutečnosti, že výchozí materiál tohoto enzymu obsahoval proteinovou směs, bylo ověřeno, že je zvolená metodika vhodná pro studium cílového proteinu v komplexnějším proteinovém vzorku. V rámci optimalizace bylo zjištěno, že se snižujícím se objemem roztoku pro štěpení dochází k zisku většího množství peptidů a zajištění větší reprodukovatelnosti proteolytického štěpení díky zahuštění a snadnějšímu kontaktu štěpených proteinů s trypsinem v prostoru. Se snižující se koncentrací trypsinu roste procentuální množství tryptických peptidů oproti semitryptickým, ale zároveň dochází ke snižování počtu celkového množství tryptických peptidů. Pozitivně však lze množství získaných tryptických peptidů ovlivnit použitím purifikovaného kvalitního trypsinu s vyšší odolností proti autolýze. Ve vzorcích štěpených takovým trypsinem od firmy Promega se také zvýšil procentuální obsah tryptických peptidů a bylo dosaženo lineárnější odezvy peptidů po MS/MS analýze na vstupní množství proteinu oproti použití rafinosovaného trypsinu štěpícího častěji na chymotryptických místech peptidů. Výběr optimální kvality použitého trypsinu je vhodné přizpůsobit tomu, zda budou štěpené proteiny pouze identifikovány, nebo i kvantifikovány. Pro účely kvantitativní proteomiky v této práci byl tedy dále využíván purifikovaný komerčně dostupný trypsin o koncentraci v poměru 1:60 vzhledem k množství proteinu ve vzorku. Dalším cílem byla kvantitativní analýza stability vybraného proteinu po ovlivnění teplem a v přítomnosti, či nepřítomnosti vhodného interakčního partnera. K tomu bylo zapotřebí zajistit optimální podmínky pro tepelnou agregaci proteinů. Bylo zjištěno, že purifikované proteiny jsou vůči agregaci pravděpodobně mnohem odolnější, než proteiny v komplexní směsi buněčných lyzátů a buněk. Zároveň však lze podpořit proces agregace proteinů snížením hodnoty pH, která, jak bylo ověřeno, neměla zásadní vliv na zachování aktivity ALP během teplotní inkubace. Pro studium interakce proteinu s ligandem byly využívány vzorky ALP se substrátem *p*-NPP a inhibitorem L-fenylalaninem. Spektrofotometricky bylo zjištěno, že přítomnost těchto interakčních partnerů měla pozitivní vliv na zachování aktivity ALP při zahřívání. Výsledky kvantitativní proteomické analýzy ukázaly, že použité ligandy taktéž zvýšily odolnost ALP vůči tepelné denaturaci a následné agregaci. Ze změn závislosti aktivity a agregace na teplotě inkubace bylo zároveň patrné, že v případě interakce substrátu *p*-NPP byla

ALP odolnější proti ztrátě aktivity a agregaci, než v případě interakce ALP s inhibitorem L-fenylalaninem. Tento rozdíl si lze vysvětlit tím, že L-fenylalanin je nekompetitivní inhibitor ALP a na rozdíl od substrátu *p*-NPP tedy nezasahuje přímo do aktivního místa ALP a neovlivňuje jeho vlastnosti v takové míře. Po vyhodnocení získaných výsledků tato práce prokázala, že navržené spojení metod kvantitativní proteomiky lze využít pro studium proteinových interakcí intaktních proteinů v komplexních proteinových směsích.

6 LITERATURA

- Aebersold R. (2003): Constellations in a cellular universe. *Nature* **422**, 115-116.
- Aebersold R., Mann M. (2003): Mass spektrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198-207.
- Aizawa M. (1994): Immunosensors for Clinical Analysis. *Advances in Clinical Chemistry* **31**, 247-275.
- Altun Z., Skoglund C., Abdel-Rehim M. (2010): Monolithic methacrylate packed 96-tips for high throughput bioanalysis. *Journal of Chromatography A* **1217**, 2581-2588.
- Alwael H., Connolly D., Clarke P., Thompson R., Twamley B., O'Connor B., Paull B. (2011): Pipette-tip selective extraction of glycoproteins with lectin modified gold nano-particles on a polymer monolithic phase. *Analyst* **136**, 2619-2628.
- Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007): Quantitative mass spektrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1017-1031.
- Besman M., Coleman J. E. (1985): Isozymes of Bovine Intestinal Alkaline Phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 11190-11193.
- Blagoev B., Kratchmarova I., Ong S. E., Nillesen M., Foster L. J., Mann M. (2003): A proteomic strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nature Biotechnology* **21**, 315-318.
- Blagoev B., Ong S. E., Kratchmarova I., Mann M. (2004): Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling network by quantitative proteomics. *Nature Biotechnology* **22**, 1139-1145.
- Boersema P. J., Aye T. T., Van Veen T. A. B., Heck A. J. R., Mohammed S. (2008): Triplex protein quantification based on stable isotope labeling by peptide dimethylation applied to cell and tissue lysates. *Proteomics* **8**, 4624-4632.
- Boersema P. J., Raijmakers R., Lemeer S., Mohammed S., Heck A. J. R. (2009): Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nature Protocols* **4**, 484-494.
- Bondarenko P. V., Chelius D., Shaler T. A. (2002): Identification and relative quantification of protein mixtures by enzymatic digestion followed capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **74**, 4741-4749.
- Borzova V. A., Markossian K. A., Chebotareva N. A., Kleymenov S. Y., Poliansky N. B., Muranov K. O., Stein-Margolina V. A., Shubin V. V., Markov D. I., Kurganov B. I. (2016): Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin. *PLoS One* **11**, 1-29.
- Brandts J. F., Lin L. N. (1990): Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **29**, 6927-6940.
- Celej M. S., Montich G. G., Fidelio G. D. (2003): Protein stability induced by ligand binding correlates with ganges in protein flexibility. *Protein Science* **12**, 1496-1506.
- Coleman J. E. (1992): Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **21**, 441-483.
- Creighton T. E. (1993): *Proteins*. 2nd ed., W. H. Freeman and Company, New York, 507.
- Creighton T. E. (1997): *Protein function: A practical approach*. Oxford University Press, Oxford, Anglie. 334.
- Cuatrecasas P. (1970): Protein Purification by Affinity Chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beat. *The Journal of Biological Chemistry* **245**, 3059-3065.
- Daniel R. M. (1996): The upper limit sof enzyme thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 74-79.
- Dass C. (2007): *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, U.S.A, New Jersey, 608.
- Davis B. G. (2003): Chemical modification of biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 379-386.
- De Las Rivas J., Fontanillo C. (2010): Protein-Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. *PLOS Computational Biology* **6**, 1-8.

- Demeure K., Duriez E., Domon B., S. P. Niclou (2014): PeptideManager: a peptide selection tool for targeted proteomic studies involving mixed samples from different species. *Frontiers in Genetics* **5**, 305.
- Du X., Li Y., Xia Y. L., Ai S. M., Liang J., Sang P., Ji X. L., Liu S. Q. (2016): Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1-34.
- Ens W., Standing K. G. (2005): Hybrid quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. *Methods in Enzymology* **402**, 49-78.
- Eronima T., Borzova V., Maloletkina O., Kleymenov S., Asryants R., Markossian K., Kurganov B. (2011): A protein aggregation based test for screening of the agents affecting thermostability of proteins. *PLoS One* **6**, 1-14.
- Fagain O. (1995): Understanding and increasing protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1252**, 1-14.
- Feist P., Hummon A. B. (2015): Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 3537-3563.
- Fernley H. N., Walker P. G. (1970): Inhibition of Alkaline Phosphatase by L-Phenylalanine. *Biochemical Journal* **116**, 543-544.
- Fields D., Song O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fishman W., Sie H. G. (1970): L-homoarginine; an inhibitor of serum "bone and liver" alkaline phosphatase. *Clinica Chimica Acta* **29**, 339-341.
- Fosset M., Chappelet-Tordo D., Lazdunski M. (1974): Intestinal Alkaline Phosphatase. Physical Properties and Quarternary Structure. *Biochemistry* **13**, 1783-1788.
- Fusaro V. A., Mani D. R., Mesirov J. P., Carr S. A. (2009): Prediction of high-responding peptides for targeted protein assays by mass spektrometry. *Nature Biotechnology* **27**, 190-198.
- Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P. (2003): Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **100**, 6940-6945.
- Ghosh N. K., Fishman W. H. (1966): On the Mechanism of Inhibition of Intestinal Alkaline Phosphatase by L-Phenylalanine. *The Journal of Biological Chemistry* **241**, 2516-2522.
- Gilar M., Belenky A., Wang B. H. (2001): High-throughput biopolymer desalting by solid-phase extraction prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* **921**, 3-13.
- Goshe M. B., Conrads T. P., Panisko E. A., Angell N. H., Veenstra T. D., Smith R. D. (2001): Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses. *Analytical Chemistry* **73**, 2578-2586.
- Granvogel B., Ploscher M., Eichacker L. A. (2007): Sample preparation by in-gel digestion for mass spektrometry-based proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 991-992.
- Guisan J., Fernandez-Lafuente R., Rodriguez V., Bastida A., Alvaro G. (1993): Enzyme stabilization by multipoint covalent attachment to activated pre-existing supports. *Studies in Organic Chemistry* **47**, 55-62.
- Gundry R. L., White M. Y., Murray C. I., Kane L. A., Fu Q., Stanley B. A., Van Eyk J. E. (2009): Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomic Workflow. *Current Protocols in Molecular Biology* **88**, 1-29.
- Gygi S. P., Rist B., Gerber S. a., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R. (1999): Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **17**, 994-999.
- Holtz K. M., Kantrowitz E. R. (1999): The mechanism of the alkaline phosphatase reaction : insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Letters* **462**, 7-11.
- Huber K. V., Olek K. M., Muller A. C., Tan C. S., Bennett K. L., Colinge J., Superti-Furga G. (2015): Proteome-wide drug and metabolite interaction mapping by thermal-stability profiling. *Nature Methods* **12**, 1055-1057.

- Huber R., Bennett W. S. (1983): Functional significance of flexibility in proteins. *Biopolymers* **22**, 261-279.
- Chahrour O., Cobice D., Malone J. (2015): Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **113**, 2-20.
- Chelius D., Bondarenko P. V. (2002): Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **1**, 317-323.
- Ishihama Y., Oda Y., Tabata T., Sato T., Nagasu T., Rappsilber J., Mann M. (2005): Exponentially modified protein abundance index (EmPI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular and Cellular Proteomics* **4**, 1265-1272.
- Iyer P. V., Ananthanarayan L. (2008): Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* **43**, 1019-1032.
- Janin J. (1995): Protein-protein recognition. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **64**, 145-166.
- Karas M., Bahr U., Dulcks T. (2000): Nano-electrospray ionization mass spectrometry: Addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **366**, 669-676.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons. *Analytical Chemistry* **60**, 2299-2301.
- Karp N. A., Huber W., Sadowski P. G., Charles P. D., Hester S. V., Lilley K. S. (2010): Addressing accuracy and precision issues in iTRAQ quantitation. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 1885-1897.
- Kay H. (1935): Some Results of the Application of a Simple Test for Efficiency of Pasteurisation. *The Lancet* **225**, 1516-1518.
- Kim E. E., Wyckoff H. W. (1991): Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *Journal of Molecular Biology* **218**, 449-464.
- Klibanov A. M. (1983): Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology* **29**, 1-28.
- Kurganov B. I. (2013): Thermal Denaturation and Aggregation Assays in Analytical Biochemistry. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* **2**, 1-4.
- Krishnan K. S., Brandts J. F. (1978): Scanning calorimetry. *Methods in Enzymology* **49**, 3-14.
- Ladero M., Sants A., Garcia J. L., Carrascosa A. V., Pessela B. C., Garcia-Ochoa F. (2002): Studies on the activity and the stability of β -galactosidases from *Thermus* sp strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 392-405.
- Larsen M. R., Cordwell S. J., Roepstoff P. (2002): Graphite powder as an alternative or supplement to reversed-phase material for desalting and concentration of peptide mixtures prior to matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics* **2**, 1277-1287.
- Lau H., Suh H. W., Golkowski M., Ong S. (2014): Comparing SILAC- and Stable Isotope Dimethyl-Labeling Approaches for Quantitative Proteomics. *Journal of Proteome Research* **13**, 4164-4174.
- Lee C (2007): Coimmunoprecipitation assay. *Methods in Molecular Biology* **362**, 401-406.
- Li N., Shaw A. R. E., Zhang N., Mak A., Li L. (2004): Lipid raft proteomics: Analysis of in-solution digest of sodium dodecyl sulfate-solubilized lipid raft proteins by liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 3156-3166.
- Lin Y., Liu Y., Li J., Zhao Y., He Q., Han W., Chen P., Wang X., Liang S. (2010): Evaluation and optimization of removal of an acid-insoluble surfactant for shotgun analysis of membrane proteome. *Electrophoresis* **16**, 2705-2713.
- Liu H., Sadygov R. G., Yates J. R. 3rd (2004): A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical Chemistry* **76**, 4193-4201.

- Lo M. C., Aulabaugh A., Jin G., Cowling R., Bard J., Malamas M., Ellestad G. (2004): Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical Biochemistry* **332**, 153-159.
- Mamyrin B. A., Shmikk D. V. (1979): The linear mass reflectron. *Soviet Journal of Experimental and Theoretical Physics* **49**, 762-764.
- McAlister G. C., Huttlin E. L., Haas W., Ting L., Jedrychowski M. P., Rogers J. C., Kuhn K., Pike I., Grothe R. A., Blethrow J. D., Gygi S. P. (2012): Increasing the multiplexing capacity of TMTs using reporter ion isotopologues with isobaric masses. *Analytical Chemistry* **84**, 7469-7478.
- McComb R. B., Bowers G. N., Posen S. (1979): *Alkaline Phosphatase*. 1st ed., Plenum Press, New York, U.S.A., 986.
- McMurry J. (2007): *Organická chemie*. 1st ed., Vysoké učení technické v Brně/Nakladatelství VUTIUM, ČR, Brno, 1176.
- Menéndez-Arias L., Argos P. (1989): Engineering protein thermal stability: Sequence statistics point to residue substitutions in α -helices. *Journal of Molecular Biology* **206**, 397-406.
- Millán J. L. (2006): Alkaline Phosphatases. Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling* **2**, 335-341.
- Modzel M., Plóciennik H., Kielmas M., Szewczuk Z., Stefanowicz P. (2014): A synthesis of new, bi-labeled peptides for quantitative proteomics. *Journal of Proteomics* **115C**, 1-7.
- Mohammed Y., Domanski D., Jackson A. M., Smith D. S., Deelder A. M., Palmblad M., Borchers C. H. (2014): PeptidePicker: a scientific workflow with web interface for selecting appropriate peptides for targeted proteomics experiments. *Journal of Proteomics* **106**, 151-161.
- Martinez Molina. D., Jafari R., Ignatushchenko M., Seki T., Larsson E. A., Dan C., Sreekumar L., Cao Y., Nordlund P. (2013): Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science* **341**, 84-87.
- Monod J., Wyman J., Changeux J. P. (1965): On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology* **12**, 88-118.
- Morris H. R., Paxton T., Dell A., Langhorne J., Berg M., Bordoli R. S., Hoyes J., Bateman R. H. (1996): High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **10**, 889-896.
- Mozhaev V. V., Martinek K. (1984): Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* **6**, 50-59.
- Niesen F. H., Berglund H., Vedadi M. (2007): The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* **2**, 2212-2221.
- Oda Y., Huang K., Cross F. R., Cowburn D., Chait B. T. (1999): Accurate quantification of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **96**, 6591-6596.
- O'Neil M. J. (1964): The Analysis of a Temperature-Controlled Scanning Calorimeter. *Analytical Chemistry* **36**, 1238-1245.
- Ong S. E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002): Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**, 376-386.
- Phizicky E. M., Fields S. (1995): Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis. *Microbiological Reviews* **59**, 94-123.
- Poltorak O. M., Chukhrai E. S., Kozlenkov A. A., Chaplin M. F., Trevan M. D. (1999): The putative common mechanism for inactivation of alkaline phosphatase isoenzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **7**, 157-163.
- Privalov P. L. (1979): Stability of proteins: small globular proteins. *Advances in Protein Chemistry* **33**, 167-241.

- Ranish J. A., Yi E. C., Leslie D. M., Purvine S. O., Goodlett D. R., Enq J., Aebersold R. (2003): The study of macromolecular complexes by quantitative proteomics. *Nature Genetics* **33**, 349-355.
- Rappsilber J., Yasushi I., Mann M. (2003): Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Analytical Chemistry* **75**, 663-670.
- Reinhard F. B., Eberhard D., Werner T., Franken H., Childs D., Doce C., Savitski M. F., Huber W., Bantscheff M., Savitski M. M., Drewes G. (2015): Thermal proteome profilig monitors ligand interactions with cellular membráně proteins. *Nature Methods* **12**, 1129-1131.
- Reynolds K. J., Yao X., Fenselau C (2002): Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: evaluation of endoprotease Glu-C as the catalytic agent. *Journal of Proteome Research* **1**, 27-33.
- Rigaut G., Schevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., Séraphin B. (1999): A generic protein purification method for protein komplex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology* **17**, 1030-1032.
- Ross P. L., Huang Y. N., Marchese J. N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha., Juhasz P., Martin S., Bartlet-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D. J. (2004): Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisce* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**, 1154-1169.
- Russell W. K., Park Z. Y., Russell D. H. (2001): Proteolysis in mixed organic-aqueous solvent systems: applications for peptide mass mapping using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **73**, 2682-2685.
- Savitski M. m., Reinhard F. B., Franken H., Werner T., Savitski M. F., Eberhard D., Martinez Molina D., Jafari R., Dovega R. V., Klaeger S., Kuster B., Nordlund P., Bantscheff M., Drewes G. (2014): Tracking cancer drugs in living cells by thermal profilig of the proteome. *Science* **346**, 1-10.
- Senisterra G. A., Finerty P. J. Jr (2009): High throughput methods of assessing protein stability and aggregation. *Molecular BioSystems* **5**, 217-223.
- Senisterra G. A., Hong B. S., Park H. W., Vedadi M. (2008): Application of high-throughput isothermal denaturation to assess protein stability and screen for ligands. *Journal of Biomolecular Screening* **13**, 337-342.
- Senisterra G. A., Markin E., Yamazaki K., Hui R., Vedadi M., Awrey D. E. (2006): Screening for ligands using a generic and high-throughput light-scattering-based assay. *Journal of Biomolecular Screening* **11**, 940-948.
- Sharma U., Pal D., Prasad R (2014): Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **29**, 269-278.
- Shevchenko A. Tomas H., Havlis J., Olsen J. V., Mann M. (2007): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**, 2856-2860.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**, 850-858.
- Schlag E. W. (2012): *Time-of-Flight Mass Spectrometry and its Applications*. Newnes, England, Oxford. 424
- Schmid R. (1979): Stabilized soluble enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **12**, 41-118.
- Schmidt A., Kellermann J., Lottspeich F. (2005): A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **5**, 4-15.
- Schnölzer M., Jedrzejewski P., Lehmann W. D. (1996): Protease-catalyzed incorporation of 18O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spektrometry. *Electrophoresis* **17**, 945-953.
- Schuette J. M., Pieleus U., Maleknia S. D., Srivatsa G. S., Cole D. L., Moser H. E., Afeyan N B. (1995): Sequence analysis of phosphorothioate oligonucleotides via matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spektrometry. *Journal of Pharmaceutival and Biomedical Analysis* **13**, 1195-1203.

- Steinbrecher T., Labahn A. (2010): Towards Accurate Free Energy Calculations in Ligand Protein-Binding Studies. *Current Medicinal Chemistry* **17**, 767-785.
- Stetter K. O., König H., Stackenbrandt E. (1983): *Pyrodictium* gen. Nov; A new species of suberine disc-shaped sulphur-reducing Archaeobacteria growing optimally at 105°C. *Systematic and Applied Microbiology* **4**, 535-551.
- Steward I., Thompson T., Figeys D. (2001): ¹⁸O Labeling: a tool for proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**, 2456-2565.
- Strader M. B., Tabb D. L., Hervey W., J., Pan C., Hurst G. B. (2006): Efficient and Specific Trypsin Digestion of Microgram to Nanogram Quantities of Proteins in Organic-Aqueous Solvent Systems. *Analytical Chemistry* **78**, 125-134.
- Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Shevchenko A. (2006): Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959-2963.
- Štosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebela M. (2005): Proteolytické enzymy: Význam pro proteomiku. *Chemické listy* **99**, 896-905.
- Thompson A., Schäfer J., Kuhn K., Kienle S., Schwarz J., Schmidt G., Neumann T., Johnstone R., Mohammed A. K., Hamon C. (2003): Tandem mass tags: a novel quantification strategy for komparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry* **75**, 1895-1904.
- Thomson J. J. (1913): *Rays of Positive electricity and their application to chemical analysis*. Longmans. Greens and Co, England, London, 163.
- Traut R. R., Casiano C., Zecherle N. (1989): Crosslinking of protein subunits and ligands by the introduction of disulfide bonds. In: *Protein function: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, Anglie, 101-133.
- Vincent J. P., Lazdunski M. (1972): Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association. Dynamics of the interaction and role of disulfide bridges. *Biochemistry* **11**, 2967-2977.
- Viner R. I., Zhang T II., Zabrouskov V. (2009): Quantification of post-translationally modified peptide sof bovine alpha-crystallin using tandem mass tags and elektron transfer dissociation. *Journal od Proteomics* **72**, 874-885.
- von Hagen J. (2008): *Proteomics Sample Preparation*. Wiley-Blackwell, New Jersey, U.S.A., 485.
- Wall M. J., Crowell A. M. J., Simms G. A., Liu F., Doucette A. A. (2011): Implications of partial tryptic digestion in organic-aqueous solvent systems for botám-up proteome analysis. *Analytica Chimica Acta* **703**, 194-203.
- Washburn M. P., Wolters D., Yates III J. R. (2001): Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* **19**, 242-247.
- Weber J., Lee R. S., Wilke-Mounts S., Grell E., Senior A. E. (1993): Combined application of site-directed mutagenesis, 2-azido-ATP labeling, and lin-benzo-ATP binding to study the noncatalytic sites of Escherichia coli F1-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 6241-6247.
- Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B. (1985): Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry* **57**, 675-679.
- Wiener M. C., Sachs J. R., Deyanova E. G., Yates N. A. (2004): Differential mass spektrometry: a label-free LC-MS method for fading signifiant differences in complex peptide and protein mixtures. *Analytical Chemistry* **76**, 6085-6096.
- Wilchek M., Bayer E., Livnah O. (2006): Essentials of biorecognition: The (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. *Immunology Letters* **103**, 27-32.
- Xiong L., Darwanto A., Sharma S., Herring J., Hu S., Filippova M., Filippov V., Wang Y., Chen C. S., Duerksen-Hughes P. J., Sowers L. C., Zhang K. (2011): Mass spectrometric studies on epigenetic interaction network in cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 13657-13668.
- Yamashita M., Fenn J. B. (1984): Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry* **88**, 4451-4459.

- Yan Y. B., Wang Q. I., He H. W., Zhou H. M. (2004): Protein Thermal Aggregation Involves Distinct Regions: Sequential Events in the Heat-Induced Unfolding and Aggregation of Hemoglobin. *Biophysical Journal* **86**, 1682-1690.
- Ye X., Luke B., Andresson T., Blonder J. (2009): ¹⁸O stable isotope labeling in MS-based proteomics. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* **8**, 136-144.
- Yeh A. P., McMillan A., Stowell M. H. B. (2006): Rapid and simple protein-stability screens: application to membrane proteins. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* **62**, 451-457.
- Yost R. A., Enke C. G. (1978): Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *Journal of the American Chemical Society* **100**, 2274-2275.
- Zamboni N., Fendt S. M., Ruhl M., Sauer U. (2009): ¹³C-based metabolite flux analysis. *Nature Protocols* **4**, 878-892.
- Zhang Y., Fonslow B. R., Shan B., Baek M. C., Yates J. R. 3rd (2013): Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews* **113**, 2343-2394.
- Zhu W., Smith J., Huang C. M. (2009): Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 1-6.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALP	alkalická fosfatasa
APS	adenosin-5'-fosfosulfát
AQUA	absolutní kvantifikace
BSA	hovězí sérový albumin
CETSA	cellular thermal shift assay
C18	oktadecylsilan
DDA	data-dependent analysis
DSC	diferenční kompenzační kalorimetrie
DSF	diferenční kompenzační fluorimetrie
DSL	diferenční statický rozptyl světla
DTT	dithiotreitol
ESI	ionizace elektrosprejem
ETD	fragmentace přenosem elektronu
FA	kyselina mravenčí
HCD	fragmentace indukovaná kolizí při vyšší energii
IAA	jodacetamid
ICAT	izotopově kódované afinitní značení
ICPL	izotopově kódované afinitní značení
ITD	izotermická denaturace
iTRAQ	izobarické značení pro relativní a absolutní kvantifikaci
K _m	Michaelisova konstanta
L:H	poměr lehké a těžké značky při reduktivní dimethylaci
LC	kapalinová chromatografie
m/z	poměr hmotnosti a náboje iontů
MALDI	laserová desorpční ionizace se spoluúčastí matrice
MeOH	metanol
MS	hmotnostní spektrometrie
PAI	index proteinové abundance
PhIAT	izotopově kódované afinitní značení fosfoproteinů
pNPP	p-nitrofenylfosfát
Q	kvadrupólový analyzátor
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíránem sodným
SILAC	inkorporace aminokyselin značených stabilními izotopy
SPE	extrakce na pevné fázi
StageTips	Stop-and-go extrakční špičky
T _{agg}	teplota agregace
TEAB	triethylaminbikarbonátový pufr
TEMED	N, N, N', N' - tetrametylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
T _m	teplota tání
TMT	tandemová hmotnostní značka
TOF	analyzátor doby letu
Tris	2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol
ΔG	volná Gibbsova energie