

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Typizace amyloidních depozit pomocí hmotnostní
spektrometrie ve vzorcích aspirátu tukové tkáně**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Anna Bartáková
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Dušan Holub, Ph.D.
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala 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. Byla jsem seznámena 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 studenta

Děkuji panu Mgr. Dušanovi Holubovi, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost, ochotu, čas a věcné připomínky týkající se řešení mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala kolektivu Proteomické laboratoře Ústavu molekulární a translační medicíny, Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za ochotu a vstřícnost při řešení praktické části mé diplomové práce. Rovněž chci poděkovat za finanční podporu řešení práce z infrastrukturních grantů CZ-OPENSREEN (LM2023052) a EATRIS-CZ (LM2023053), z projektu Národního ústavu pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID Projektu Č. LX22NPO5102) a interní grantové agentuře Univerzity Palackého (IGA_LF_2023_025 a IGA_LF_2024_038).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Anna Bartáková
Název práce	Typizace amyloidních depozit pomocí hmotnostní spektrometrie ve vzorcích aspirátu tukové tkáně
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Dušan Holub, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Teoretická část předkládané diplomové práce pojednává o amyloidóze, vzácném onemocnění, charakterizovaném ukládáním patologických proteinů ve tkáních ve formě amyloidu, které vede k poškození a selhání orgánů. Dále poskytuje přehled o různých typech amyloidózy, laboratorních metodách průkazu amyloidu a jeho typizaci. Pro adekvátní léčbu je zapotřebí určit typ abundantního amyloidního fibrilárního proteinu tvořícího amyloidní depozita, nejčastěji pomocí imunohistochemie, nebo proteomické analýzy. Pro účely průkazu a typizace amyloidu se odebírají vzorky z postižených orgánů, jejichž tkáňové řezy se fixují formalínem a zalévají parafínem (FFPE), nebo z břišní tukové tkáně, která obsahuje depozita systémového amyloidu. Pokud jsou vzorky odebírány z tukové tkáně, je pacientům před aspirací tkáně injekčně aplikováno lokální anestetikum mesocain. Nicméně toto léčivo kontaminuje vzorek a při proteomické analýze způsobuje pokles intenzity peptidových signálů v čase své eluce.

Experimentální část této práce se zaměřuje na hledání vhodného protokolu pro zpracování proteomických vzorků tukové tkáně, který by odstranil externí kontaminaci mesocainem. Za tímto účelem byly testovány čtyři protokoly: „in StageTip“ protokol – protokol pro štěpení proteinů ve špičce (iST), protokol s proteinovou precipitací acetonem s následným zpracováním pomocí iST protokolu (A-iST), „single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation“ protokol – protokol pro štěpení proteinů na paramagnetických kuličkách (SP3) a „filter-aided sample preparation“ protokol – protokol pro štěpení proteinů na filtru (FASP) na modelových vzorcích plasmu s klesajícím množstvím mesocainu. Všechny testované protokoly vykazovaly srovnatelné a reprodukovatelné výsledky pro pět sledovaných parametrů: procentuální peptidový výtěžek, počet identifikovaných proteinů a peptidů, průměrné sekvenční pokrytí proteinů a relativní distribuce peptidů s vynechanými štěpnými místy po enzymovém štěpení. Nicméně žádný z testovaných protokolů nezajistil úplné odstranění mesocainu ze vzorku.

Klíčová slova	Amyloidóza, tuková tkáň, mesocain, proteomika
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Anna Bartáková
Title	Subtyping of the amyloid deposits by mass spectrometry in subcutaneous fat aspirate specimens
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Dušan Holub, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

The theoretical part of this diploma thesis deals with amyloidosis, a rare disease characterized by the deposition of pathological proteins in tissues in the form of amyloid, which leads to organ damage and failure. It also provides an overview of the different types of amyloidosis, laboratory methods of amyloid detection, and its subtyping. For adequate treatment, the type of abundant amyloid fibril protein forming amyloid deposits needs to be determined, mainly by immunohistochemistry or proteomic analysis. The samples for analysis are taken from affected organs, tissue sections of which are fixed with formalin and embedded in paraffin (FFPE), or from abdominal fat tissue containing systemic amyloid deposits. If the samples are collected from adipose tissue, patients are injected with the local anesthetic mesocain before the tissue aspiration. However, this drug contaminates the sample and causes a decrease in peptide signal intensity at the time of its elution during proteomic analysis.

The experimental part of this thesis focuses on the search for a suitable protocol for the processing of proteomic adipose tissue samples that would remove external contamination by mesocain. For this purpose, four protocols were tested: "in StageTip" protocol – a protocol for protein cleavage at the tip (iST), acetone protein precipitation protocol followed by iST protocol (A-iST), "single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation" protocol – a protocol for protein cleavage on paramagnetic beads (SP3) and "filter-aided sample preparation" protocol – a protocol for protein cleavage on a filter (FASP) on model plasma samples with decreasing amounts of mesocaine. All the tested protocols showed comparable and reproducible results for the five investigated parameters: percentage of peptides recovered, number of identified proteins and peptides, average sequence coverage of proteins and relative distribution of peptides with missed cleavage sites after enzymatic cleavage. However, no protocol was found in this thesis to ensure the complete removal of mesocain from the sample.

Keywords	Amyloidosis, adipose tissue, mesocain, proteomics
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Amyloidózy.....	3
2.1.1	Charakteristika amyloidu	3
2.1.2	Názvosloví amyloidóz.....	6
2.1.3	Typy amyloidóz	7
2.1.4	Léčba amyloidóz	13
2.2	Laboratorní diagnostika amyloidóz.....	14
2.2.1	Průkaz amyloidu.....	15
2.2.2	Typizace amyloidu	15
2.3	Zpracování vzorku pro LC-MS analýzu	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1	Materiál a přístroje	25
3.1.1	Chemikálie	25
3.1.2	Přístroje a vybavení.....	26
3.1.3	Použitý software.....	27
3.1.4	Biologický materiál.....	28
3.2	Metody	29
3.2.1	iST protokol	29
3.2.2	A-iST- protokol.....	31
3.2.3	SP3 protokol.....	31
3.2.4	FASP protokol.....	33
3.2.5	Stanovení peptidové koncentrace BCA metodou	35
3.2.6	LC-MS analýza	36
4	VÝSLEDKY	40
5	DISKUSE	47
6	ZÁVĚR	51
7	LITERATURA	52
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ ZKRATEK	56

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- Studium odborné literatury o metodách typizace amyloidních depozit.
- Sepsání teoretické části diplomové práce.

Praktická část

- Osvojení si základních pracovních postupů pro zpracování proteomických vzorků.
- LC-MS analýza.
- Zpracování dat a interpretace výsledků.
- Sepsání praktické části diplomové práce.

1 ÚVOD

Amyloidóza je vzácné onemocnění (Canneti et al., 2020) způsobené produkcí patologických proteinů a jejich následným ukládáním ve tkáních ve formě amyloidních depozit, což následně vede k poškození tkání a orgánů, až k selhání orgánů (Pinney & Hawkins, 2012). Existuje celkem 42 typů amyloidóz, které jsou typizovány podle abundantního amyloidního fibrilárního proteinu tvořícího amyloidní depozita. Amyloidózy mohou být lokalizované, nebo systémové (Buxbaum et al., 2022).

Léčba různých typů amyloidóz se značně liší, proto je nutné pro volbu správného léčebného postupu určit typ abundantního amyloidního fibrilárního proteinu, který tvoří amyloidní depozita (Desport et al., 2012; Píka et al., 2017; Teng et al., 2020). Pro účely diagnostiky se provádí biopsie postiženého orgánu, nebo v případě systémových amyloidóz biopsie břišní tukové tkáně (Dogan et al., 2017; Benson et al., 2022). V případě prokázání amyloidních depozit pomocí specifického barvení Kongo červení se následně provádí typizace amyloidních depozit nejčastěji imunohistochemickými nebo proteomickými postupy (Benson et al., 2022). Proteomická typizace amyloidních depozit spočívá v extrakci proteinů z tkáňových vzorků, štěpení proteinů enzymy a finálním přečištění peptidů pro LC-MS analýzu s cílem určit nejabundantnější amyloidní fibrilární protein ve vzorku (Holub et al., 2019).

Na samotnou LC-MS analýzu mohou mít vliv kontaminanty (interní, externí, biologické), které se mohou dostat do vzorku (Cornes, 2016; Dogan, 2017; Varnavides et al., 2022). Při odběru tukové tkáně hrozí kontaminace externí, např. použitými lokálními anestetiky (Benson et al., 2022), a biologická, např. kontaminace vzorku krví (Dogan, 2017). Kontaminanty mohou mít vliv na extrakci proteinů, štěpení proteinů, přečištění peptidů a na ionizaci peptidů (Furey et al., 2013; Varnavides et al., 2022). V průběhu LC-MS analýzy mohou způsobovat zvýšení, nebo snížení intenzity signálu pro peptidy v čase eluce kontaminanty (Furey et al., 2013). Pro přípravu vzorku na LC-MS analýzu jsou tedy naprosto klíčové kroky pro přečištění. V rámci bottom-up proteomiky existuje celá řada postupů pro zpracování vzorku, avšak neexistuje žádný univerzální postup pro odstranění kontaminace ze vzorku (Varnavides et al., 2022). Příkladem kontaminanty, která snižuje intenzitu signálu peptidů během LC-MS analýzy je mesocain (diethyl-[2-oxo-2-(2,4,6-trimethylanilino)ethyl]azanium;chlorid). Jedná se o lokální anestetikum používané v klinické praxi pro znecitlivění místa pro odběr tukové tkáně. Biopstický vzorek tukové tkáně tedy obsahuje i mesocain, jehož obsah ve vzorku

se může lišit mezi jednotlivými patientskými vzorky. Pokles intenzit signálu pro analyzované peptidy během LC-MS analýzy tukové tkáně se projevuje v čase eluce mesocainu.

Cílem této diplomové práce bylo najít vhodný postup pro odstranění nebo snížení obsahu mesocainu ve vzorku tukové tkáně, aby během LC-MS analýzy nedocházelo ke snížení intenzity signálu pro analyzované peptidy v čase eluce mesocainu.

Během biopsie tukové tkáně je odebráno poměrně malé množství nativní tkáně přibližně 5–40 mg a počet vzorků zaslaných k diagnostice se ročně pohybuje okolo deseti. Množství tukové tkáně, která by mohla být využita pro testování jednotlivých protokolů, je omezené. Obsah mesocainu se navíc může mezi jednotlivými vzorky lišit. Z těchto důvodů byly pro testování jednotlivých protokolů připraveny modelové vzorky plazmy o různé koncentraci mesocainu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Amyloidózy

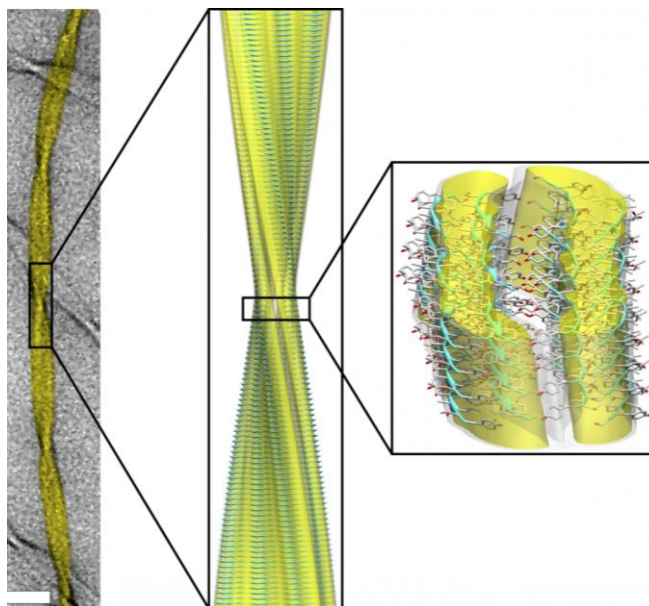
Amyloidózy představují různorodou skupinu onemocnění, pro které je charakteristické ukládání patologicky poskládaného amyloidního proteinu do extracelulárního prostoru v tkáni a orgánu. v případě systémové amyloidózy dochází k ukládání amyloidních depozit na různých místech v těle, kdežto u lokalizované amyloidózy dochází k jejich ukládání v určitém konkrétním orgánu. Amyloidní depozita mohou tvořit různé typy amyloidních proteinů. Na základě složení amyloidních depozit bylo dosud popsáno celkem 42 typů amyloidóz (Buxbaum et al., 2022). Amyloidózy jsou poměrně vzácnou skupinou onemocnění. Celosvětově postihují 1 z 10 000 obyvatel. Např. v Národním centru pro amyloidózu ve Spojeném království bylo evidováno 2 000 klinických vzorků mezi lety 2013–2020 (Canneti et al., 2020).

2.1.1 Charakteristika amyloidu

Amyloid je proteinový agregát s fibrilární strukturou, který je nerozpustný, odolává proteolýze a v organismu se ukládá do mezibuněčného prostoru (Píka et al., 2017). Hromadění amyloidních fibril v organismu může vést k narušení funkce, poškození až k úplnému selhání orgánů, ve kterých se amyloidní depozita nacházejí (Pinney & Hawkins, 2012). Amyloidní depozita mohou v organismu vznikat z nemutovaných, nebo z mutovaných proteinů (Buxbaum et al., 2022).

Amyloid je složený z amyloidních fibril v paralelním uspořádání (Benson et al., 2020). Amyloidní fibrily mají délku 1–3 μm a průměr 100–200 Å (Fitzpatrick et al., 2013). Jednotlivé fibrily jsou složeny z protofilamentů sestávajících z několika vrstev proteinů v antiparalelním uspořádání v konformaci β -skládaného listu (Obr. 1) (Benson et al., 2020).

Amyloid je tvořen jedním ze 42 amyloidních fibrilárních proteinů. Kromě amyloidních fibrilárních proteinů amyloid obsahuje další proteiny (Buxbaum et al., 2022). Jedná se o tzv. s amyloidem spojené proteiny. Řadí se zde P-komponenta sérového amyloidu (SAP), apolipoprotein A-IV (apoAIV) a apolipoprotein E (apoE), které jsou součástí „universálního molekulárního amyloidového podpisu“ (Dasari et al., 2020). Dále se mohou v amyloidních depozitech vyskytovat proteoglykan heparansulfát (Benson et al., 2020) a apolipoprotein A-I (ApoAI) (Vrana et al., 2014). Tyto proteiny mohou hrát



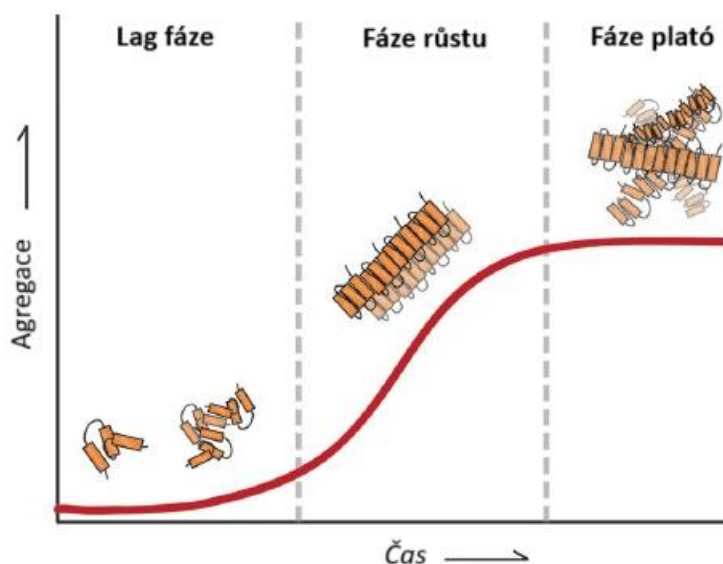
Obr. 1: Na obrázku vlevo pořízeném pomocí transmisní elektronové mikroskopie je zachycena a žlutě vyznačena amyloidní fibrila (měřítko 50 nm). Na prostředním obrázku je detailní pohled na strukturu amyloidní fibrily. Na obrázku vpravo jsou zobrazeny protofilamenty složené z jednotlivých vrstev proteinů v antiparalelním uspořádání v konformaci β -skládaného listu. Převzato od Fitzpatrick et al., 2013.

roli v patogenezi amyloidóz (Benson et al., 2020). Např. SAP je protein s vysokou afinitou k amyloidním fibrilám (Emdin et al., 2023). Jeho vazba na amyloidní fibrily je závislá na vápenatých iontech a je reverzibilní. SAP pravděpodobně inhibuje proteolytickou degradaci amyloidních fibril, ale mechanismus je zatím neznámý (Benson et al., 2020). Součástí amyloidních depozit nacházejících se v tukové tkáni může být i apolipoprotein A-I (ApoAI). ApoAI se nezařazuje mezi s amyloidem spojené proteiny, protože se jedná o běžnou součást zdravé tukové tkáně (Vrana et al., 2014).

Ke vzniku amyloidu v organismu může docházet v důsledku narušení proteostázy, což vede k hromadění patologicky složených proteinů v konformaci β -skládaného listu a jejich následné agregaci (Klaips et al., 2018; Benson et al., 2020). Proces agregace má 3 fáze (Obr. 2). V první lag fázi dochází ke shlukování proteinů v konformaci β -skládaného listu, což vede ke vzniku oligomerů, které se dále mohou šířit v organismu. Ve druhé růstové fázi se oligomery spojují a tvoří protofilamenty a filamenty. Ve třetí fázi plató se růst a vznik nových protofilamentů a filamentů zastaví v důsledku úbytku rozpuštěných proteinů se špatnou prostorovou orientací (Stroo et al., 2017).

Označení amyloid se v medicíně a v chemii používá odlišně (Benson et al., 2020). V medicíně jsou pojmem amyloid označována pouze patologická depozita, která mají charakteristickou mikroskopickou strukturu a po obarvení Kongo červení vykazují v polarizovaném světle dvojlom projevující se zeleným, červeným, nebo žlutým zbarvením (Desport et al., 2012; Benson et al., 2020). V chemii pojem amyloid označuje jakékoliv proteiny a proteinové fibrily v konformaci β -skládaného listu bez ohledu na jejich druh a původ. Někdy se v literatuře používá pro označení amyloidu pojem plak. Jedná se o literaturu týkající se Alzheimerovy choroby, kde se pojem plak používá k označení malých extracelulárních $A\beta$ depozit šířících se v cerebrálním kortexu. Toto označení je chybné, protože pojem plak označuje plochou strukturu, což neodpovídá globulární struktuře $A\beta$ depozit (Benson et al., 2020).

Lze se také setkat s pojmem funkční amyloid, který označuje nepatologické proteiny s fibrilární strukturou v konformaci β -skládaného listu, které se běžně vyskytují v organismu. Konformace β -skládaného listu je klíčová pro jejich úlohu v organismu (Benson et al., 2020). Funkční amyloidy mohou v organismu plnit mnoho funkcí (např. stavební a skladovací funkce), přičemž některé funkční amyloidy mohou plnit více funkcí zároveň (Otzen & Riek, 2019). Stavební funkci zajišťují přenašeče pro malé



Obr. 2: Proces agregace amyloidních proteinů probíhá ve třech fázích. V úvodní lag fázi vznikají oligomery z proteinů v konformaci β -skládaného listu. V druhé růstové fázi vznikají protofilamenty a filamenty. V poslední plató fázi dochází k zastavení růstu protofilamentů a filamentů. Převzato od Stroo et al., 2017.

molekuly (např. melanocytární protein (p-mel)), složky bakteriálních biofilmů a jiných struktur vyskytujících se u bakterií (např. hydrofobiny u bakterií rodu *Streptomyces*) (Otzen & Riek, 2019), vláknitých hub (např. hydrofobin EAS houby *Neurospora crassa*) a hmyzu (např. složky hedvábí) (Buxbaum et al., 2022). Amyloidní struktura některých peptidů/proteinů může sloužit jako jejich skladovací forma v organismu. Jedná se např. o peptidové hormony v sekrečních granulích u savců (Otzen & Riek, 2019), mezi které patří např. prolaktin, růstový hormon, β -endorfin, adrenokortikotropní hormon, insulin, kalcitonin, atriální natriuretický faktor, hormon uvolňující kortikotropin a somatostatin (Maji et al., 2009).

2.1.2 Názvosloví amyloidóz

Jednotlivé typy amyloidóz se od sebe liší proteinovým složením amyloidů, proto jejich názvy obsahují protein, ze kterého je amyloid nejvíce tvořen. Vždy je nejprve uveden název každého amyloidního proteinu, za kterým následuje označení onemocnění – amyloidóza. Název každého amyloidního fibrilárního proteinu začíná označením proteinu a (A), ke kterému je připojeno označení specifického proteinu – např.: AL (L – imunoglobulinové lehké řetězce – „immunoglobulin light chains“) nebo ATTR (TTR – transthyretin). Pro bližší specifikaci se používá přípona wt, nebo v, např.: ATTRwt nebo ATTRv (wt = nativní, nemutovaný typ proteinu – „wild type“; v = varianta – „variant“). Přípona v může být nahrazena označením specifické mutace, např.: ATTRV30M. Počet aminokyselinových residuí by měl být uváděn u zralých proteinů, tj. bez započtení aminokyselinových residuí v signální sekvenci. Číslování prekurzoru obsahujícího i signální sekvenci je možné uvádět pouze v závorce za názvem s počtem aminokyselinových residuí zralého proteinu – např.: TTRV30M (p. TTRV50M). Ve výjimečných případech je možné nahradit příponu v předponou h (h= dědičný – „hereditary“) např.: hATTR místo ATTRv, avšak nejedná se o název doporučený Mezinárodní komisí pro názvosloví amyloidóz (Benson et al., 2020).

2.1.3 Typy amyloidóz

Celkově bylo do dnešního dne popsáno 42 typů amyloidóz podle abundantního amyloidního fibrilárního proteinu tvořícího amyloidní depozita (Tab. 1) (Buxbaum et al., 2022). Nejčastěji se vyskytuje AL lambda, AL kappa, ATTR a amyloidóza odvozená od sérového amyloidu A (AA) (Ravichandran et al., 2020; Buxbaum et al., 2022).

Tab. 1: Amyloidní fibrilární proteiny a jejich prekurzory u člověka. Převzato a upraveno podle Buxbaum et al., 2022.

Fibrilární protein	Prekurzorový protein	Systémová (S), lokalizovaná (L) nebo iatrogenní (I) amyloidóza	Získaná(Z), vrozená (V) amyloidóza	Cílové orgány
AL	Imunoglobulinový lehký řetězec	S, L	Z, V	Všechny orgány, kromě centrální nervové soustavy (CNS)
AH	Imunoglobulinový těžký řetězec	S, L	Z	Všechny orgány kromě CNS
AA	(Apo) Sérový amyloid A	S	Z, V	Všechny orgány kromě CNS
ATTR	Transthyretin, nativní	S	Z	Srdce hlavně u mužů, plíce, vazy
	Transthyretin, varianty	S	V	Periferní nervová soustava (PNS), autonomní nervová soustava (ANS), srdce, oko, ledviny
A β ₂ M	β ₂ -mikroglobulin, nativní	S	Z	Muskuloskeletální systém
	β ₂ -mikroglobulin, varianty	S	V	ANS, jazyk, srdce
AApoAI	Apolipoprotein A I, varianty	S	V	Srdce, játra, ledviny, PNS, testis, larynx (C terminální varianty), kůže (C terminální varianty)
AApoAII	Apolipoprotein II, varianty	S	V	Ledviny
AApoAIV	Apolipoprotein A IV, nativní	S	Z	Ledviny a systémová amyloidóza
AApoCII	Apolipoprotein II, varianty	C S	V	Ledviny
AApoCIII	Apolipoprotein III, varianty	C S	V	Ledviny
AGel	Gelsolin, varianty	S	V	Ledviny, PNS, rohovka

Tab. 1: Amyloidní fibrilární proteiny a jejich prekurzory u člověka (*pokračování*). Převzato a upraveno podle Buxbaum et al., 2022.

Fibrilární protein	Prekurzorový protein	Systémová lokalizovaná (L), nebo iatrogenní (I) amyloidóza	(S), Získaná (Z), vrožená (V) amyloidóza	Cílové orgány
ALys	Lysozym varianty	C, S	V	Ledviny
ALECT2	Leukocytární chemotaktický faktor 2	S	Z	Ledviny, primárně
AFib	Fibrinogen varianty	α , S	V	Ledviny, primárně
ACys	Cystatin varianty	C, S	V	PNS, kůže
ABri	ABri protein, varianty	S	V	CNS
ADan*	ADan protein, varianty	L	V	CNS
A β	A β protein, nativní varianty	L	Z	CNS
A α Syn	α -synuklein	L	Z	CNS
ATau	Tau	L	Z	CNS
APrP	Prionový protein, nativní varianty	L	Z	Creutzfeldt-Jakobova choroba (CJD), fatální insomnie
	Prionový protein, varianty	L	V	CJD, Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom, fatální insomnie
ATMEM106 B	TMEM106B	L	Z	Onemocnění frontotemporální lobární degenerace
ACal	(Pro)kalcitonin	L	Z	C-buňky nádorů štítné žlázy
AIAPP	Amylin	S, L	Z, Z	Ledviny
AANP	Atriální natriuretický peptid	L	Z	Langerhansovy ostrůvky, insulinom
APro	Prolaktin	L	Z	Srdeční síň
ASom	(Pro)somatostatin	L	Z	Hypofyzární prolaktinemie, stárnoucí hypofýza
AGluc	Glukagon	L	Z	Somatostatinom
APTH	Parathyroidní hormon	L	Z	Glukagonom
AIns	Insulin	L	Z	Nádory příštítných tělísek, stárnoucí příštitná tělíska
				Iatrogenní, lokální injekce

Tab. 1: Amyloidní fibrilární proteiny a jejich prekurzory u člověka (*pokračování*). Převzato a upraveno podle Buxbaum et al., 2022.

Fibrilární protein	Prekurzorový protein	Systémová (S), lokalizovaná (L), nebo iatrogenní (I) amyloidóza	Získaná (Z), vrozená (V) amyloidóza	Cílové orgány
AEnf	Enfuvirtid	L	Z	Iatrogenní, lokální injekce
AGLP1	Glukagonu podobný peptid 1	L	I	Iatrogenní, lokální injekce
AIL1RAP	Antagonista receptoru pro interleukin-1	L		Iatrogenní, lokální injekce
ASPC [†]	Plicní surfaktantový protein C	L	Z	Plíce
ACor	Korneodesmosin	L	Z	Zrohovatělé epitel, vlasové folikuly
AMed	Laktadherin (MFG-E8)	L	Z	Senilní aorta, elastické tepny
AKer	Keratoepithelin	L	Z	Rohovka, vrozená
ALac	Laktoferin	L	Z	Rohovka
AOAAP	Odontogenní ameloblastický protein	L	Z	Odontogenní nádory
ASem1	Semenogelin 1	L	Z	<i>Vesicula seminalis</i>
ACatk [‡]	Katepsin K	L	Z	Spojený s nádory
AEFEMP1 [‡]	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)	L	Z	Žíly, spojené se stárnutím

* ADan je produktem stejného genu jako ABri.

† Nebylo ověřeno analýzou aminokyselinové sekvence.

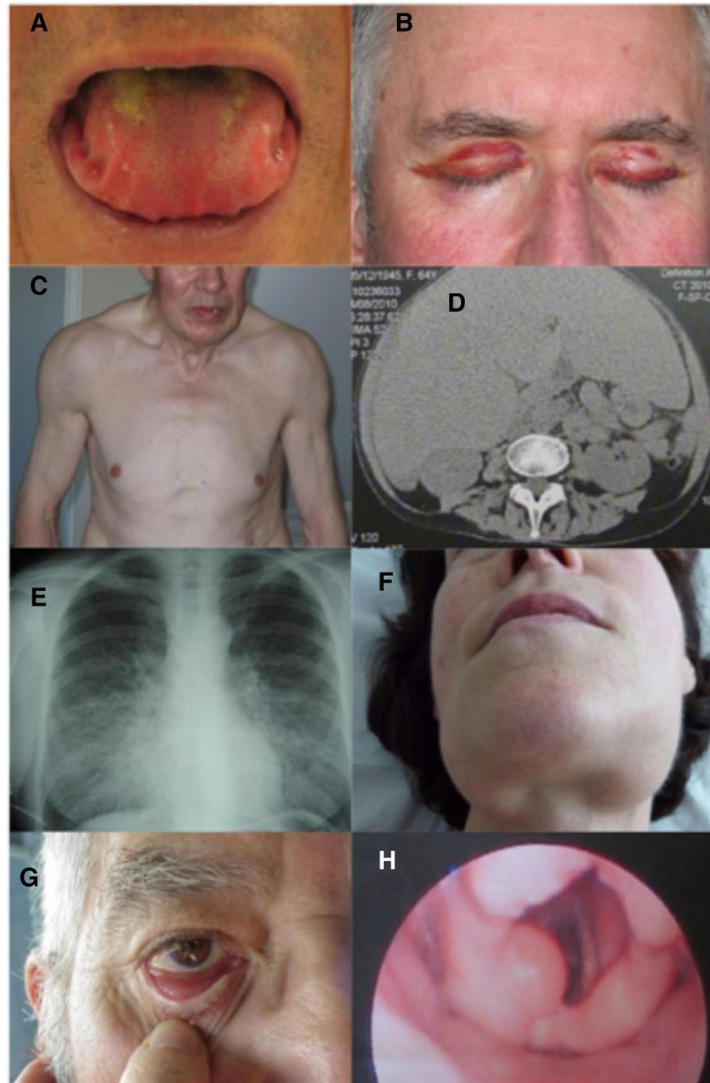
‡ Je potřebné stanovit úplnou aminokyselinovou sekvenci.

2.1.3.1 AL amyloidóza

Nejčastějším typem amyloidózy je AL amyloidóza (Ravichandran et al., 2020). Je typická amyloidními depozity tvořenými imunoglobulinovými lehkými řetězci (Ig LC) se špatnou konformací, nebo jejich fragmenty. Ig LC jsou produkovány populací klonálních plazmatických buněk (Desport et al., 2012; Píka et al., 2017). Většinou se jedná o systémové onemocnění, kdy se amyloidní depozita mohou ukládat v celém organismu kromě centrální nervové soustavy (CNS), ojediněle může být AL amyloidóza lokalizovaná. Systémová AL amyloidóza nejčastěji postihuje ledviny, srdce, dále je často zasažen gastrointestinální trakt, méně často periferní nervy, jazyk, játra, slezina, plíce, kůže a exokrinní žlázy. Lokalizovaná AL amyloidóza nejčastěji postihuje močový měchýř, močové cesty, tracheobronchiální systém, plíce, hrtan, oční kouli a kůži. Typy symptomů a jejich závažnost u AL amyloidózy závisí na lokalizaci depozit (Obr. 3). U lokalizovaných AL amyloidóz bývají zpravidla mírnější příznaky, které jsou dobře léčitelné. U systémových amyloidóz bývají příznaky závažnější až život ohrožující a je volena agresivní léčba. Mezi běžné symptomy AL amyloidóz patří celková tělesná slabost (astenie) a dušnost. AL amyloidóza nejčastěji postihuje starší populaci – průměrný věk při stanovení diagnózy je 65 let (Desport et al., 2012). Průměrná délka dožití u pacientů s AL amyloidózou se zvýšila z 18 měsíců (před r. 2005) až na 5 let (r. 2019), nicméně i přesto je předčasná mortalita stále vysoká (Ravichandran et al., 2020).

2.1.3.2 ATTR amyloidóza

Druhým nejzastoupenějším typem amyloidózy je ATTR amyloidóza (Ravichandran et al., 2020). V případě ATTR amyloidózy dochází k agregaci defektního TTR se špatným prostorovým uspořádáním, který tvoří amyloidní depozita. TTR je transportní protein pro vitamín A a thyroxin vyskytující se v plazmě a mozkomíšním moku. Strukturně se jedná o tetramer složený ze dvou dimerů sestávajících ze čtyř oligomerů. K agregaci TTR dochází v případě, že je tetramer nestabilní a dojde k disociaci jednotlivých oligomerů, které vytvářejí amyloidní depozita. ATTR amyloidóza může být buď dědičná, anebo tzv. senilní (Teng et al., 2020). Udědičné amyloidózy je v játrech v důsledku genové mutace produkován mutovaný TTR, který je náchylný k agregaci. Existuje množství mutací TTR, z nichž jsou nejčastější ATTRV122I, ATTRV30M a ATTRT60A. Výskyt jednotlivých typů mutací je ovlivněn



Obr. 3: Mezi projevy systémové AL amyloidózy patří makroglosie s laterálním hřebíkováním jazyka (A), oboustranná periorbitální purpura (B), pseudoatletický vzhled sekundárně způsobený difúzní svalovou infiltrací (C), objemná hepatomegalie způsobená jaterní amyloidózou (D), difúzní oboustranné intersticiální plicní onemocnění (E), zvětšení podčelistní žlázy (F). Mezi projevy lokalizované AL amyloidózy se řadí nodulární amyloidóza spojivek (G) a laryngeální supraglottická amyloidní bulka (H). Převzato od Desport et al., 2012.

i geografickou lokalitou. Naopak u stařeckého typu ATTR amyloidózy (ATTR-wt) jsou amyloidní depozita tvořena nativním TTR, který zaujímá nesprávnou prostorovou konformaci v důsledku narušené proteostázy ve stáří. Dědičná forma amyloidózy se projevuje ve věku 30–80 let, kdežto ATTR-wt se projevuje u starších lidí (65 let a více) a častěji postihuje muže (Teng et al., 2020). Senilní typ ATTR amyloidózy se v populaci vyskytuje častěji, než její dědičná forma (Ravichandran et al., 2020). ATTR amyloidóza nejčastěji postihuje srdce, periferní nervovou soustavu (PNS) a autonomní nervovou soustavu (ANS). Dále mohou být zasaženy ledviny a gastrointestinální trakt. Klinické

projevy ATTR amyloidózy jsou nespecifické a neurčité. ATTR kardiomyopatie se projevuje dušností, únavou, bolestí hlavy a periferními otoky, což jsou typické projevy srdečního selhání. Dalšími příznaky, které mohou provázet ATTR amyloidózu, jsou fibrilace síní, synkopa, onemocnění převodního systému srdečního, cévní mozková příhoda, periferní neuropatie, autonomní dysfunkce, poruchy funkce střev a močového měchýře (Teng et al., 2020). U pacientů s dědičným typem ATTR amyloidózy je medián přežití 11,61 let pro neléčenou skupinu a 24,73 let pro skupinu po transplantaci jater. U skupiny pacientů, u které byl použit lék tafamidis nebyl medián přežití stanoven, nicméně bylo prokázáno, že léčba tafamidinem snížila riziko úmrtí o 91 % oproti neléčené skupině a o 63 % oproti skupině po transplantaci jater (Coelho et al., 2018). U pacientů s ATTR-wt amyloidózou je medián přežití od stanovení diagnózy 46,69 měsíců. Medián času od nástupu příznaků do stanovení diagnózy je 0,8 roku (Connors et al., 2016). Nejčastější příčinou úmrtí na ATTR amyloidózu je kardiomyopatie (Teng et al., 2020).

2.1.3.3 AA amyloidóza

Třetím nejčastějším typem amyloidózy je AA amyloidóza (Ravichandran et al., 2020). U AA amyloidóz jsou amyloidní depozita tvořena sérovým amyloidem A (SAA). SAA je apolipoprotein spojený s lipoproteinem s vysokou hustotou (HDL – „High-density lipoprotein“), který patří do skupiny nespecifických reaktantů akutní fáze zánětu. SAA v organismu zajišťuje transport HDL do jater, chemotaxi imunitních buněk do místa zánětu a indukci enzymů degradujících extracelulární matrix. Biosyntéza SAA probíhá v játrech a je regulována prozánětlivými cytokiny (tumor nekrotizující faktor, interleukin 1 a interleukin 6) (Píka et al., 2017). Hladiny SAA se u lidí pohybují od 1 do 3 000 mg·l⁻¹. Dlouhodobě zvýšené hladiny SAA u části pacientů vedou k rozvoji amyloidózy (Simons et al., 2013). SAA amyloidóza se vyskytuje u pacientů s chronickým zánětem provázejícím chronická autoimunitní onemocnění (revmatoidní artritida, Bechtěrevova choroba, nespecifické střevní záněty), chronická infekční onemocnění (osteomyelitida, tuberkulóza) a autoinflamatorní stavy (např. familiární středozevní horčeka), ale může provázet i nádorová onemocnění (Castlemanova choroba, lymfomy). Tento typ amyloidózy může postihovat celý organismus kromě CNS. Nejčastěji jsou zasaženy ledviny, slezina a nadledviny, naopak srdce je zasažené výjimečně. Zasažení ledvin se může projevovat proteinurií, nefrotickým syndromem a různým stupněm renální nedostatečnosti. Zasažení sleziny a nadledvin je obvykle bez příznaků (Píka et al. 2017). Celosvětově tvoří AA amyloidóza 40 % všech amyloidóz. V České republice

se jedná o 4–7 % všech potvrzených případů amyloidóz (Píka et al., 2017). Během posledních let podle Národního centra pro amyloidózu ve Spojeném království počet pacientů s AA amyloidózou klesl z 13 % všech amyloidóz (před r. 2010) na 3 % (r. 2016–2019). Tento pokles je způsobený díky účinné léčbě onemocnění, které provází chronický zánět (Ravichandran et al., 2020). Medián přežití u pacientů s AA amyloidózou je 11,9 let (Palladini et al., 2017).

2.1.3.4 Iatrogenní amyloidóza

Amyloidní depozita mohou vzniknout lokálně také v důsledku dlouhodobé léčby léky proteinové, polypeptidové, nebo peptidové povahy (tj. různé hormony, analogy hormonů, monoklonální protilátky), které jsou injekčně aplikované do podkoží. Takové amyloidózy nazýváme iatrogenní (Dogan, 2017). Řadí se zde např. amyloidóza odvozená od insulinu vzácně se vyskytující u pacientů s diabetem mellitu I. typu. Amyloidní depozita jsou v tomto případě tvořena insulinem, který si pacienti aplikují injekčně do podkoží, a vyskytují se v místě opakované aplikace insulinu. Kromě zvýšené rezistence vůči podávanému insulinu v důsledku snížené difúze do místa určení přes amyloidní masu nezpůsobuje pacientům žádné další komplikace (Vrana et al., 2014).

2.1.4 Léčba amyloidóz

Léčba amyloidóz se liší v závislosti na konkrétním typu amyloidního proteinu, tvořícího amyloidní depozita, proto je pro volbu vhodné léčby nezbytná správná diagnostika. Např. léčba AA amyloidózy spočívá ve snižování hladin SAA v cirkulaci a kontrole zánětu (Píka et al., 2017). Při léčbě AL amyloidóz se využívají léky a přístupy vedoucí ke snížení hladiny Ig LC se špatnou konformací v cirkulaci. Jedná se o chemoterapii a různé postupy využívané při léčbě mnohočetného myelomu a lymfoproliferativních onemocnění (Desport et al., 2012). U léčby ATTR amyloidózy jsou používány léky pro inhibici genové exprese TTR s patologickou konformací (např. patisiran) a stabilizaci tetrameru TTR (např. tafamidis). Při léčbě tohoto typu amyloidózy se může přistoupit i k transplantaci jater, která jsou zdrojem produkce patologického TTR, nebo ke kombinované transplantaci jater i srdce (Teng et al., 2020).

Běžná léčba amyloidóz spočívá v inhibici produkce amyloidního proteinu a v zabránění ukládání amyloidu v těle, ale neovlivňuje již vzniklá amyloidní depozita, která mají vliv na funkci orgánů, ve kterých se nacházejí. Proto byla vyvinuta protilátková léčba podporující degradaci amyloidních depozit, která je zatím ve fázi

klinických studií. Pro léčbu se používají protilátky – imunoglobuliny typu G (IgG). U léčby AL amyloidózy se používají IgG specifické pro lidské plazmatické buňky, které se váží na konkrétní typ povrchového antigenu na plazmatických buňkách (např. CD 38), což následně vede k indukci apoptózy plazmatických buněk. U léčby ATTR amyloidózy se používají IgG specifické pro lineární epitop EFPVA, který je typický pro amyloidní depozita u ATTR amyloidózy a pro patologicky složený TTR. Vazba IgG na epitop EFPVA vede k indukci fagocytózy amyloidních depozit a nesprávně složeného TTR. U všech typů systémových amyloidóz lze použít i IgG specifické pro SAP, protože se SAP vyskytuje ve všech typech amyloidů. Vazba anti-SAP protilátek na SAP vede k indukci fagocytózy, což vede k destabilizaci amyloidních depozit (Emdin et al., 2023). Při léčbě anti-SAP byla pozorována redukce amyloidních depozit v játrech, ledvinách a dalších orgánech (Richards et al., 2015).

2.2 Laboratorní diagnostika amyloidóz

Pro účely laboratorní diagnostiky amyloidóz je nutná biopsie tkáně zasaženého orgánu. V případě systémových amyloidóz se nejprve provádí biopsie břišní tukové tkáně, tkáně drobných slinných žláz, gastrointestinálního traktu, nebo kostní dřeně (Dogan et al., 2017; Benson et al., 2022). Odběr břišní tukové tkáně probíhá v lokální anestezii pomocí tlusté punkční jehly (Benson et al., 2022). Jako lokální anestetikum se běžně v klinické praxi používá mesocain (diethyl-[2-oxo-2-(2,4,6-trimethylanilino)ethyl]azanium;chlorid). Jedná se o malou molekulu s molekulovou hmotností $284,82 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (National Center for Biotechnology Information, 2024).

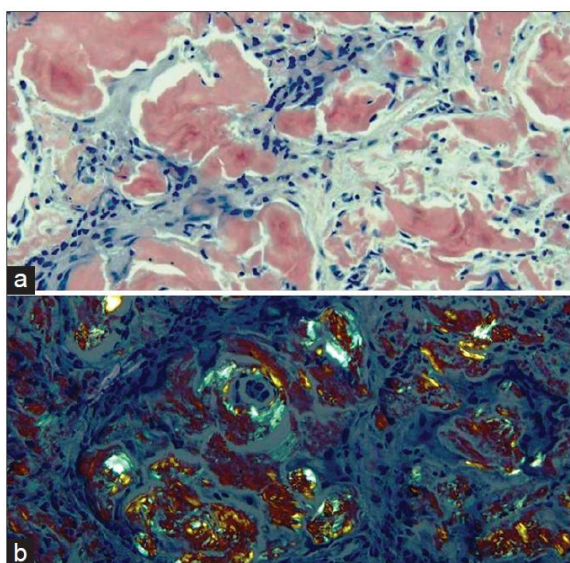
Biopsický vzorek tkáně odebraný z vyšetřovaného orgánu se před analýzou fixuje formalínem a zalévá se parafínem (FFPE). Nativní vzorek tukové tkáně se po odběru zamrazuje (Dogan et al., 2017). V tukové tkáni a FFPE vzorcích je zapotřebí prokázat přítomnost amyloidu pomocí specifického barvení Kongo červení (Dogan et al., 2017), nebo Saturnovou červení (Orłowska et al., 2019). V případě pozitivního nálezu se provádí LC-MS nebo imunohistochemická typizace amyloidního prekurzorového proteinu (Benson et al., 2022; Dogan et al., 2017).

2.2.1 Průkaz amyloidu

Amyloid lze ve vzorku identifikovat mikroskopicky. Amyloidní depozita mají pod mikroskopem amorfni strukturu (Desport et al., 2012). K průkazu amyloidu se provádí selektivní barvení amyloidních depozit Kongo červení (Obr. 4 (a)) (Desport et al., 2012), nebo Saturnovou červení (Orłowska et al., 2019). Obarvená depozita vykazují v polarizovaném světle charakteristický dvojlom projevující se jablkově zeleným (Obr. 4 (b)) (Desport et al., 2012; Orłowska et al., 2019), červeným, případně žlutým zbarvením v závislosti na typu tkáně a orientaci amyloidních fibril (Desport et al., 2012). Mikroskopický nálezn je zapotřebí řádně zaznamenat, aby se předešlo chybné interpretaci získaných výsledků (Desport et al., 2012; Benson et al., 2020).

2.2.2 Typizace amyloidu

Pro účely typizace amyloidního prekurzorového proteinu lze využít různé metody. Nejčastěji se používá imunohistochemická typizace (Benson et al., 2022) nebo proteomická typizace pomocí LC-MS analýzy (Canneti et al., 2020). Méně často se používá imunoelektronová mikroskopie, western blot a ELISA metoda (Benson et al., 2022). Sekvenační techniky se v klinické praxi nepoužívají, protože jsou zdlouhavé, finančně nákladné a vyžadují velké množství zmražené tkáně (v jednotkách mg) (Rezk et al., 2019; Canneti et al., 2020).

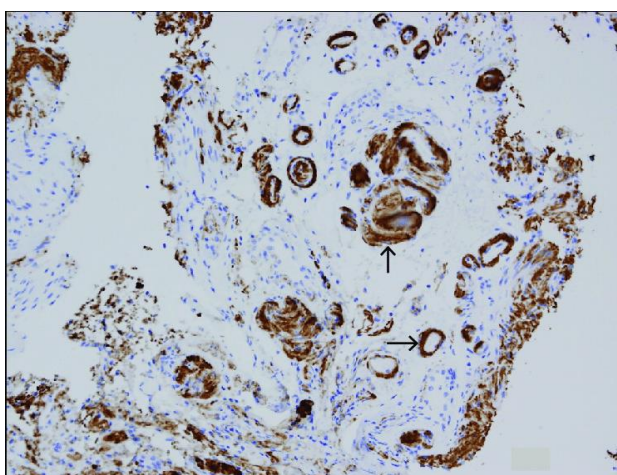


Obr. 4: K průkazu amyloidu v tkáňovém řezu se používá barvení pomocí Kongo červeně. Amyloidní depozita se barví červeně (a) a v polarizačním mikroskopu svítí jablkově zeleně díky charakteristickému dvojlomu (b). Převzato od Bajpai, 2018.

2.2.2.1 Imunohistochemická typizace

Imunohistochemická typizace (Obr. 5) amyloidních fibrilárních proteinů je založena na použití protilátek specifických pro konkrétní amyloidní protein (Benson et al., 2022). Použité protilátky jsou pro účely vizualizace značené enzymem (Benson et al., 2022), nebo fluorochromem v případě imunofluorescenční typizace (Píka et al., 2017). U protilátek značených enzymem se pro vizualizaci používá enzymová reakce, při níž dochází k přeměně rozpustné bezbarvé formy barviva na barevnou sraženinu (Katikireddy & O'Sullivan, 2011). Pro účely imunohistochemické typizace se používá barvivo 3, 3'-diaminobenzidin (Benson et al., 2022), které je substrátem křenové peroxidasy (Katikireddy & O'Sullivan, 2011) (HRP; EC 1.11.1.7) (Kyoto University Bioinformatics Center, b. r.). Pro imunihistochemickou typizaci lze použít jak zmražené vzorky, tak FFPE vzorky (Benson et al., 2022), kdežto pro imunofluorescenční typizaci se používají pouze zmražené vzorky (Píka et al., 2017).

Imunohistochemická typizace amyloidních proteinů je dostupná, na vybavení nenáročná a relativně levná metoda, jejíž výsledky lze přímo vyhodnotit. Avšak pro správnou diagnostiku je potřebné použití specifických protilátek, které se vážou i na proteiny se špatnou prostorovou orientací a agregované proteiny. To může být problém při použití komerčně dostupných protilátek, které nemusí být primárně vyvinuty pro účely typizace amyloidu (Benson et al., 2022). Navíc proti některým typům amyloidních proteinů nemusí být dostupné komerční protilátky (Dogan, 2017). Proto



Obr. 5: Pro typizaci amyloidních depozit se používá imunohistochemické barvení. Příklad pozitivního imunohistochemického barvení stěny cév pro amyloidní depozita AA-amyloidózy je uveden na obrázku. Převzato od Olmos-Martínez et al., 2017.

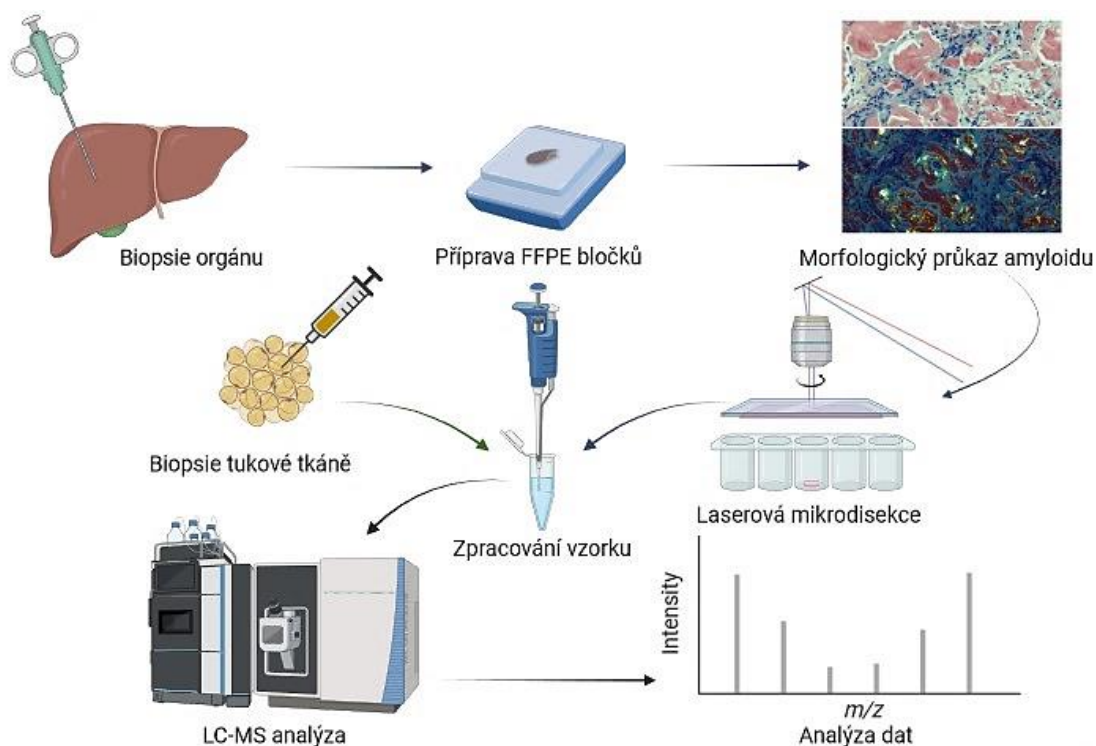
si některé laboratoře připravují své vlastní protilátky proti proteinům izolovaným z amyloidních depozit, nebo proti syntetickým peptidům, které strukturně odpovídají doménám proteinů v amyloidních fibrilách. Nicméně použití vlastních protilátek může být v akreditované laboratoři problematické (Benson et al., 2022). Imunohistochemickou typizaci může komplikovat obarvení pozadí kvůli kontaminaci sérem, nebo ztráta epitopů v důsledku vzniku vazeb mezi proteiny po fixaci formalínem v případě FFPE vzorků (Dogan, 2017).

Nevýhodou této metody je omezení typizace pouze na námi hledané amyloidní proteiny a různá úspěšnost typizace u odlišných typů amyloidóz. Imunohistochemická typizace amyloidních depozit se provádí pouze ve specializovaných centrech, protože je nutná určitá zkušenost pro vyhodnocování výsledků (Dogan, 2017; Benson et al., 2022).

2.2.2.2 Proteomická typizace

Pro účely proteomické typizace amyloidních depozit se používá LC-MS analýza, během které se identifikují všechny proteiny obsažené ve vzorku – tzv. „shotgun proteomika“. Pro tento typ typizace se používá FFPE, nebo tuková tkáň. Před samotnou analýzou jsou z FFPE tkáně po obarvení Kongo červení pomocí laserové mikrodisekce vyříznuty oblasti, ve kterých se nachází amyloidní depozita. Vyříznuté oblasti jsou následně analyzovány LC-MS. U břišní tukové tkáně se neprovádí barvení Kongo červení ani laserová mikrodisekce (Obr. 6) (Sethi et al., 2012; Vrana et al., 2014).

Z připravených vzorků se nejprve extrahují proteiny, které jsou následně enzymově rozštěpeny na peptidy – nejčastěji se používá enzym trypsin (Varnavides et al., 2022) (EC: 3.4.21.4) (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, b. r.), případně směs trypsinu a lysozymu C (Varnavides et al., 2022) (Lys-C, EC 3.4.21.50) (Sigma-Aldrich, c2014). Trypsin je serinová proteasa, která štěpí proteiny specificky na C-konci za argininem a lysinem (pokud není následující aminokyselinou prolin) za vzniku peptidů o přibližné velikosti 700–1 500 Da (Promega, c2023). Lys-C je serinová proteasa, která štěpí proteiny specificky za lysinem (a to i v případě, že je následující aminokyselinou prolin) (Thermo Fisher Scientific Inc., c2006–2023; Sigma-Aldrich, c2014).



Obr. 6: Pro proteomickou typizaci amyloidních depozit se nejprve odebírá vzorek tkáně ze zasaženého orgánu. Následně se tkáň fixuje formalínem a zalévá se do parafinových bločků. Poté se provádí morfologický průkaz amyloidu pomocí barvení Kongo červení. Obarvené oblasti obsahující amyloidní depozita se vyříznou pomocí laserové mikrodisekce. Vzorek se dále zpracovává pro LC-MS analýzu a získaná data jsou následně analyzována. Při odběru vzorku tukové tkáně se fixace, morfologický průkaz ani laserová mikrodisekce neprovádí. Vzorek tukové tkáně se rovnou zpracovává pro LC-MS analýzu. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

Vzniklé tryptické peptidy se následně separují pomocí LC na základě hydrofobních vlastností za použití gradientu mobilních fází. Následuje detekce pomocí MS. Pro MS detekci je zapotřebí získat nabité peptidy, k čemuž slouží ionizace elektrosprejem (ESI – „Electrospray Ionization“). Ionizované peptidy vstupují do hmotnostního spektrometru. Během tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) jsou v MS skenu měřeny hodnoty poměru hmotnosti iontu ku jeho náboji (m/z) a jejich intenzita (Dogan, 2017). Následuje fragmentace deseti nejintenzivnějších prekurzorových iontů (Holub et al., 2019) pomocí kolizního plynu – nejčastěji se používá helium. V MS/MS skenu se měří hodnoty m/z pro vzniklé fragmenty a jejich intenzita, čímž se získají fragmentační spektra vybraných prekurzorových iontů (Dogan, 2017). Každý tryptický peptid z lidského proteomu má své charakteristické fragmentační spektrum (Dogan, 2017), což může být využito pro identifikaci prekurzorových proteinů z experimentálně získaných fragmentačních spekter (Dasari et al., 2020). K průkazu amyloidních prekurzorových

proteinů se experimentálně získaná fragmentační spektra porovnávají s teoretickými fragmentačními spektry v databázi (např. Sequest, X!, Tandem, Mascot) (Dasari et al., 2020), která obsahuje sekvence proteinů z lidského proteomu ze SwissProt databáze, známé varianty lidských imunoglobulinových domén, známé mutace amyloidních fibrilárních proteinů získaných z literatury a běžné kontaminanty (Holub et al., 2019). Pro odhalení falešně identifikovaných proteinů se do databáze nahrává i reverzní sekvence proteinů. Identifikované proteiny, u kterých byl identifikován alespoň jeden unikátní peptid a alespoň pět naměřených fragmentačních spekter, mohou být použity pro účely diagnostiky (Dasari et al., 2020). Typ amyloidózy se určuje podle nejvíce abundantního amyloidního proteinu ve vzorku. Relativní zastoupení amyloidních proteinů ve vzorku se stanovuje z počtu fragmentačních spekter (Holub et al., 2019)

LC-MS metoda může sloužit k ověření negativních nebo nejasných výsledků jiných metod (Benson et al., 2022). Mezi hlavní výhody LC-MS typizace patří malé množství vzorku potřebného pro analýzu (prahová hodnota je 50 000 μm^2) a nezávislost analýzy na protilátkách (Dogan 2017). Mezi další výhody patří možnost identifikace amyloidního prekurzorového proteinu v rámci jedné analýzy na rozdíl od jiných metod, kde je zapotřebí více testů – např. u imunohistochemické typizace (Sethi et al., 2012). Vysoká senzitivita a specifita LC-MS analýzy umožňují získat přesné informace o proteinech, což může vést k detekci různých variant amyloidních proteinů při použití rozšířené databáze např. u obtížně diagnostikovatelných, genetických, vzácných, nebo nových typů amyloidóz (Sethi et al., 2012; Dogan et al., 2022) a lze ji potenciálně využít i v případě koexistence 2 různých typů amyloidóz (Sethi et al., 2012).

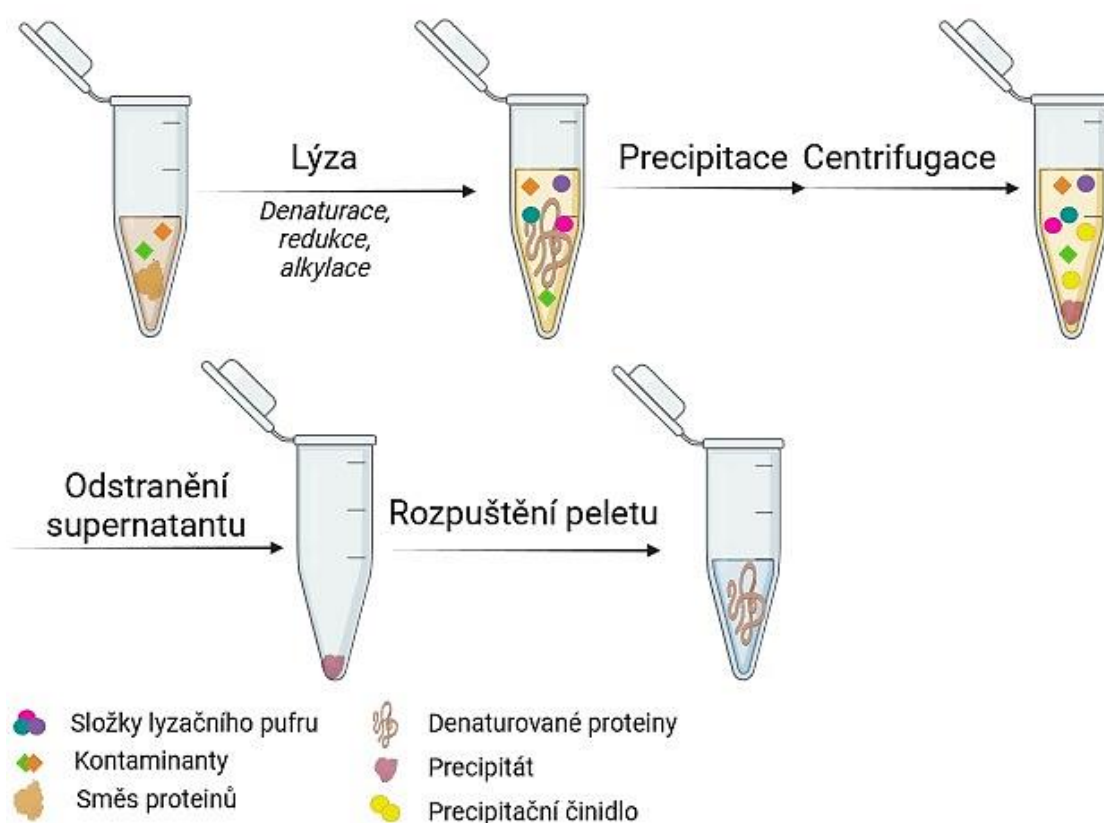
Mezi nevýhody LC-MS typizace patří drahé vybavení, potřeba odborného personálu, který má zkušenosti s vyhodnocováním výsledků, v některých případech obtížnost určení, zda se jedná o proteiny izolované z amyloidního depozita, nebo ne, horší identifikovatelnost některých proteinů podléhajících mutacím (např. Ig, TTR) a nutnost centralizace analýzy, která s sebou nese jak výhody, tak nevýhody (Benson et al., 2022).

2.3 Zpracování vzorku pro LC-MS analýzu

Příprava proteomického vzorku pro bottom-up proteomickou analýzu zahrnuje denaturaci proteinů, redukci disulfidových vazeb, následnou alkylaci vzniklých thiolových skupin, štěpení proteinů na peptidy a kroky pro přečištění, které zajišťují odsolení proteinů, nebo peptidů a odstranění kontaminant ze vzorku (Varnavides et al., 2022). Přečištění vzorků je pro LC-MS analýzu nezbytné, protože přítomnost kontaminant ve vzorku může výrazně ovlivňovat analýzu. Může docházet buď k poklesu intezity signálu pro sledované analyty vlivem iontové suprese, nebo naopak k jejímu zvýšení vlivem matricových efektů. Běžnější bývá snížení intezity signálu v důsledku iontové suprese. Kontaminanty mohou mít endogenní nebo exogenní původ. Endogenní kontaminanty jsou látky, které se vyskytují v samotné tkáni určené k odběru. Jedná se o anorganické elektrolyty a soli (Furey et al., 2013) a neproteinové organické molekuly, které jsou běžnou součástí buněk např. lipidy, nukleové kyseliny, ostatní metabolity (Varnavides et al., 2022). Exogenní kontaminanty jsou do vzorku vnesené v průběhu odběru vzorku a jeho zpracování např. složky pufrů, degradační produkty detergentů, rezidua plastů a polymerů a další (Furey et al., 2013).

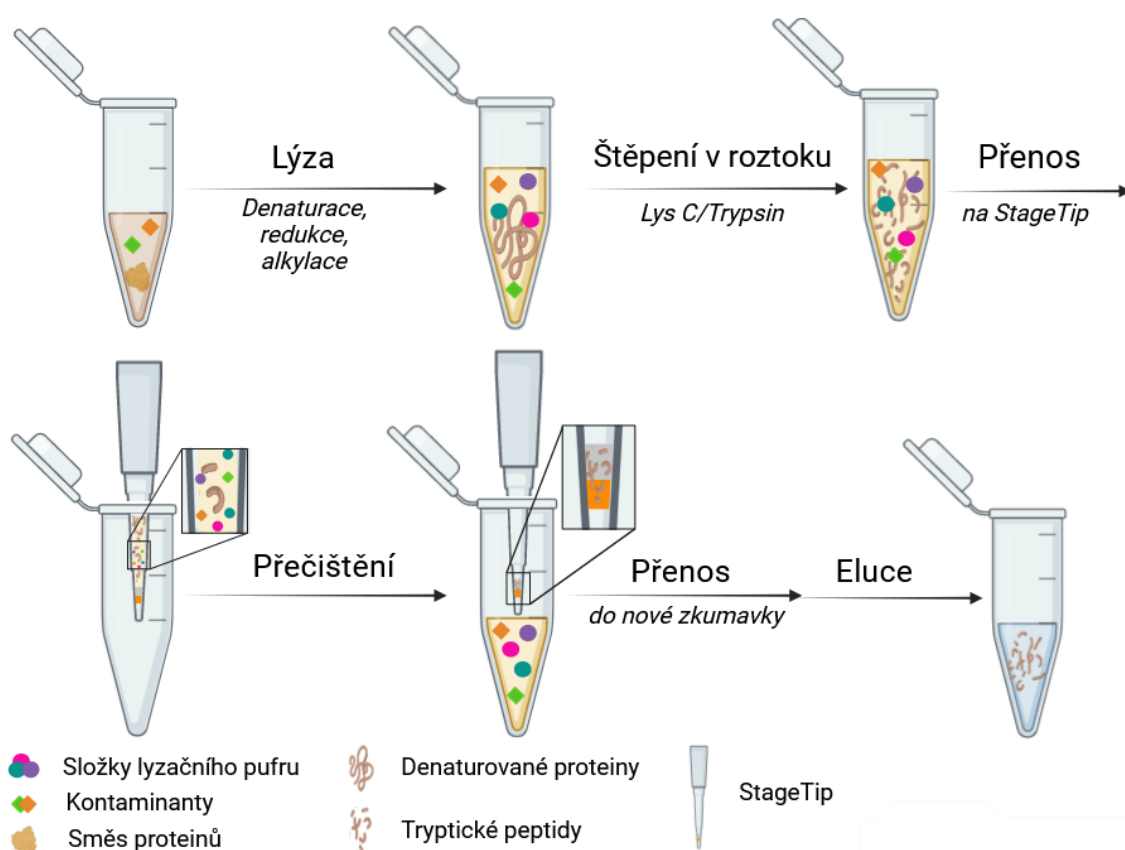
Pro přípravu proteomického vzorku existuje v rámci bottom-up proteomiky mnoho různých protokolů. Obecně se dají rozdělit do dvou přístupů: štěpení proteinů v roztoku, nebo štěpení již přečištěných proteinů. Do první uvedené skupiny patří různé protokoly zahrnující systémy pufrů založené na chaotropních denaturačních činidlech, jako jsou např. močovina a guanidin hydrochlorid, nebo na surfaktantech, mezi které se řadí např. detergent dodecylsulfát sodný (SDS) a žlučová sůl deoxycholát sodný (SDC). Do druhé uvedené skupiny patří např. „in StageTip“ protokol – protokol pro štěpení proteinů ve špičce (iST), „single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation“ protokol – protokol pro štěpení proteinů na paramagnetických kuličkách (SP3) a „filter-aided sample preparation“ protokol – protokol pro štěpení proteinů na filtru (FASP). Některé protokoly se používají v kombinaci s precipitací proteinů. Obecně lze říct, že neexistuje žádný univerzální postup pro přípravu proteomického vzorku, protože existuje mnoho typů vzorků o různém složení a jednotlivé protokoly se od sebe mohou lišit v účinnosti extrakce a přečištění (Varnavides et al., 2022).

Pro precipitaci proteinů (Obr. 7) se jako precipitační činidlo používá aceton, ethanol, směs chloroformu a fenolu, nebo ethylacetát. Neproteinové buněčné komponenty (lipidy, nukleové kyseliny, ostatní metabolity atd.) a detergenty zůstávají rozpuštěné v roztoku. Proteinový precipitát se po odstranění supernatantu rozpustí v pufru. Rozpuštění lze usnadnit sonikací, vortexováním, nebo protřepáváním (Feist & Hummon, 2015; Varnavides et al., 2022).



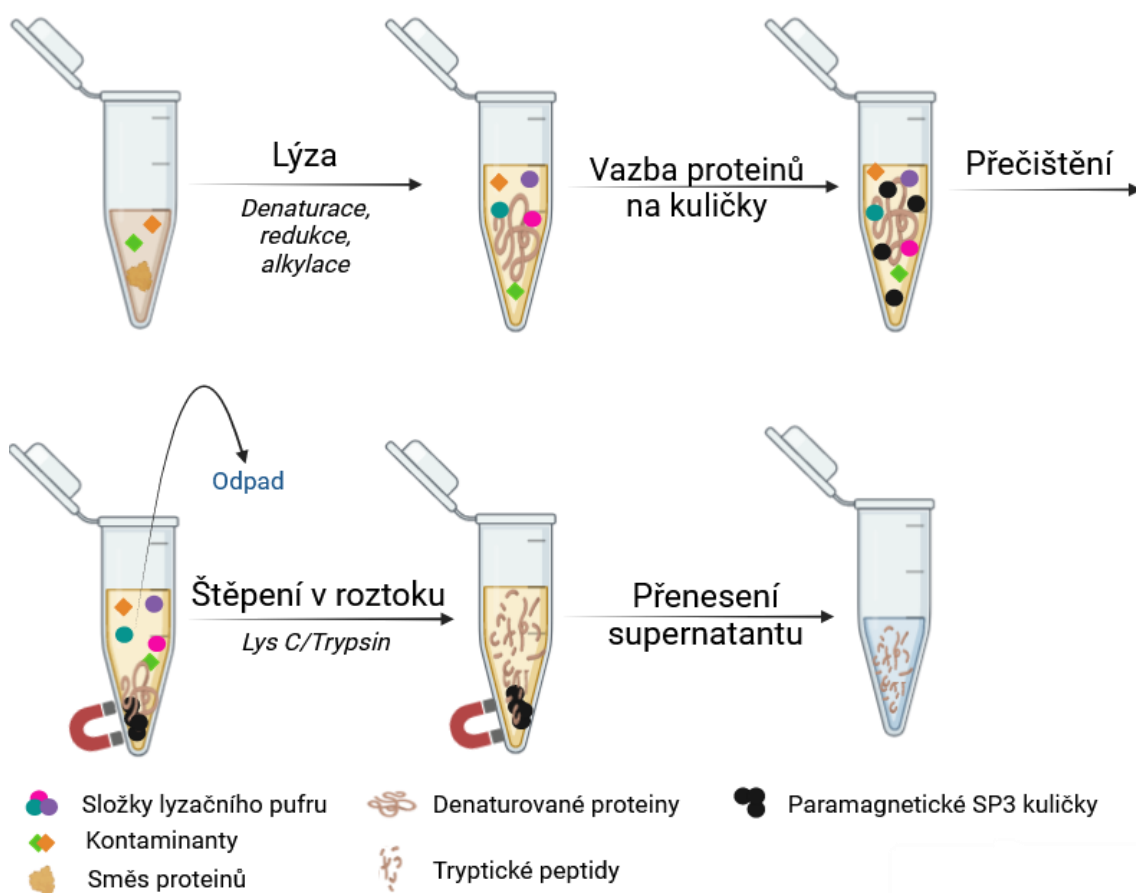
Obr. 7: Precipitační protokol pro přečištění proteinů zahrnuje několik kroků. Nejprve je provedena denaturace, redukce a alkylace proteinů. Denaturované proteiny se následně precipitují pomocí precipitačního činidla. Po centrifugaci a následném odstranění supernatantu se precipitát rozpustí v pufru. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

iST protokol (Obr. 8) zahrnuje lýzu buněk, denaturaci, redukci, alkylaci proteinů, jejich enzymové štěpení a následné přečištění vzniklých peptidů na pevné fázi ve špičkách (StageTipech) (Varnavides et al., 2022). Jako pevná fáze může být použita např. silica s navázanými oktadecyly (C18), nebo styren-divinylbenzenový kopolymer na membránovém disku (SDB-RPS) a další (Kulak et al., 2014). C18 i SDB-RPS na sebe ve vodném prostředí vážou hydrofobní peptidy. Následuje přečištění peptidů méně organickými roztoky. Po odstranění supernatantu je možné proteiny a peptidy z pevné fáze eluovat pomocí více organických roztoků (Kulak et al., 2014).



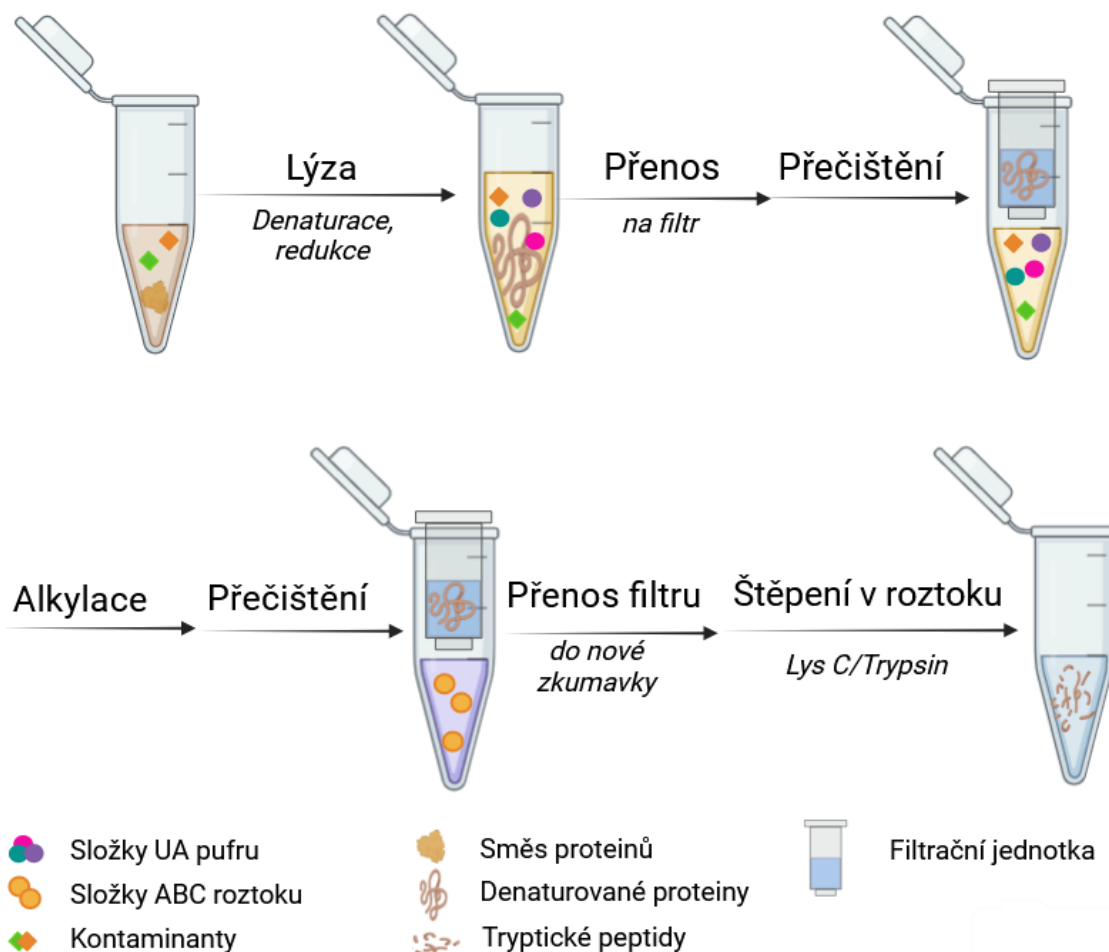
Obr. 8: iST protokol pro přípravu proteomických vzorků zahrnuje několik kroků. Nejprve je provedena denaturace, redukce a alkylace proteinů. Následuje štěpení proteinů v roztoku pomocí enzymu trypsinu, nebo enzymové směsi trypsin/ LysC. Přečištění vzniklých peptidů probíhá na Stage Tipu s C18, nebo SDB-RPS sorbentem. Použitý sorbent na sebe váže hydrofobní peptidy, které jsou přečištěny pomocí méně organických roztoků. Následuje přenesení StageTipu s přečištěnými peptidy do nové zkumavky, kde je provedena jejich eluce více organickým roztokem. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

SP3 protokol (Obr. 9) zahrnuje lýzu buněk, denaturaci, redukci, alkylnaci proteinů a jejich přečištění na paramagnetických kuličkách a následné enzymové štěpení (Moggridge et al., 2018). Povrch paramagnetických kuliček může být modifikovaný např. karboxylovými skupinami, na které se v prostředí organického rozpouštědla (acetonitril, ethanol, isopropanol, aceton) (Moggridge et al., 2018) díky hydrofilním interakcím vážou proteiny obsažené ve vzorku, které mohou být následně přečištěny (Hughes et al., 2019). Po přečištění je provedeno enzymové štěpení přímo na paramagnetických kuličkách, přičemž dochází k eluci vzniklých peptidů do roztoku (Moggridge et al., 2018).



Obr. 9: SP3 protokol pro přípravu proteomických vzorků zahrnuje několik kroků. Nejprve je provedena denaturace, redukce a alkylnace proteinů. Následně jsou ke vzorku přidány paramagnetické kuličky, na jejichž povrch se v prostředí organického rozpouštědla vážou proteiny obsažené ve vzorku díky hydrofilním interakcím. Poté jsou proteiny navázané na paramagnetických kuličkách přečištěny. Po odstranění supernatantu na magnetickém separátoru se provede štěpení proteinů v roztoku pomocí enzymu trypsinu, nebo enzymové směsi trypsin/ LysC, přičemž se vzniklé peptidy uvolní do roztoku. Po umístění zkumavky na magnetický separátor je supernatant s peptidy přenesen do nové zkumavky. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

FASP protokol (Obr. 10) zahrnuje lýzu buněk, denaturaci, redukci proteinů, jejich přečištění na filtru, alkylaci a následné štěpení a eluci z filtrační jednotky. Filtr zachycuje velké molekuly, kdežto malé molekuly přes něj prochází. Po nanesení vzorku jsou proteiny na filtru zachyceny, zatímco malé kontaminující molekuly prochází přes filtr do odpadu. Po promytí proteinů močovinovým pufrům a následné redukci a alkylaci se provádí jejich enzymové štěpení. Vzniklé peptidy prochází přes filtr, kdežto velké kontaminující molekuly zůstávají zachycené na filtru (Feist & Hummon, 2015).



Obr. 10: FASP protokol pro přípravu proteomických vzorků zahrnuje několik kroků. Nejprve je provedena denaturace a redukce proteinů. Vzorek se následně přenes na filtrační jednotku, na které se proteiny ze vzorku zachytí a menší molekuly projdou skrz. Následuje alkylace proteinů. Po ní jsou proteiny přečištěny. Poté je filtrační jednotka s přečištěnými proteiny přenesena do nové zkumavky a je provedeno štěpení v roztoku pomocí enzymu trypsinu, nebo enzymové směsi trypsin/ LysC. Vzniklé peptidy projdou přes filtr do sběrné zkumavky. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

25% vodný roztok hydroxidu amonného (NH₄OH) (Merck KGaA, Německo)

2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris) (Roche Diagnostic GmbH, Německo)

2-chloroacetamid (CAA) (Sigma-Aldrich, USA)

Aceton (Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril (ACN) (Merck KGaA, Německo)

Deoxycholát sodný (SDC) (Sigma-Aldrich, USA)

Dithiothreitol (DTT) (Roche Diagnostics GmbH, Německo)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol (EtOH) absolutní (> 99,7 %) (VWR Chemicals, Francie)

Ethylacetát (EtAc) (Sigma-Aldrich, USA)

Iodoacetamid (IAA) (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina močová (UA – „uric acid“) (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina mravenčí (FA) (ThermoScientific, USA)

Kyselina trifluoroctová (TFA) (Honeywell, Německo)

Mesocain (trimekain hydrochlorid) (Zentiva, Česká Republika)

Milli Q voda (dH₂O)

Předředěný proteinový standard (BSA – hovězí sérový albumin) (Thermo Scientific, USA)

Roztok A pro BCA metodu (Thermo Scientific, USA)

Roztok B pro BCA metodu (Thermo Scientific, USA)

SDB-RPS (3M, USA)

Sera-Mag Speedbeads carboxylate-modified [E3] magnetické kuličky
(65152105050250) (Cytiva, USA)

Sera-Mag Speedbeads carboxylate-modified [E7] magnetické kuličky
(45152105050250) (Cytiva, USA)

Tris(2-carboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP) (VWR Chemicals, USA)

Tris-HCl (Sigma-Aldrich, USA)

Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade (Promega Madison, USA)

3.1.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Scaltec instruments, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifuga 5810 R (Eppendorf, Německo)

Centrifuga mikro (Labnet, USA)

Centrifuga miniSpin (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Rotina 420R (Hettich, Německo)

Digitální pH metr (Systém Analytics Germany GmbH, Německo)

Hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA)

Hmotnostní spektrometr Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Inkubátor (MS Incubator, MS Major Science, USA)

Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific, USA)

Magnetická míchačka MSH 300 (Biosan, USA)

Magnetický separátor (Invitrogen, USA)

Microcon®-30 centrifugační fitry (Merck, Německo)

Mikrotitrační destička (TPP®, Švýcarsko)

Spektrofotometr EnSpire™ (PerkinElmer, Singapore)

Termoblok Bio TDB-100 (Biosan, USA)

Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)

Třepačka vortex REAX comfort (Heidolph, Německo)

Univerzální indikátorový papírek (UIP) pro pH 0–12 (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Vakuová odparka Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo)

Vodní lázeň SUB AQUA 12 (Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Anglie)

Vortex Genius 3 (IKA, Německo)

Výrobník dH₂O (Direct-Q 3 UV Water Purification System, Merck, Německo)

3.1.3 Použitý software

BioRender.com (© 2024, Kanada)

- Program byl použit pro vytvoření ilustračních obrázků.

Excel (verze 2403, Microsoft 365, USA)

- Program byl použit pro vyhodnocení dat z programu Perseus a Skyline.

MaxQuant (verze 2.5.1.0, Německo)

- Program byl použit pro identifikaci peptidů/proteinů z naměřených LC-MS dat.

Perseus (verze 2.0.11.0, Německo)

- Program byl použit pro zpracování dat z programu MaxQuant.

Skyline (verze 23.1.0.268, USA)

- Program byl použit pro extrakci celkové plochy píků pro peptidy/ proteiny a extrakci plochy píku pro mesocain.

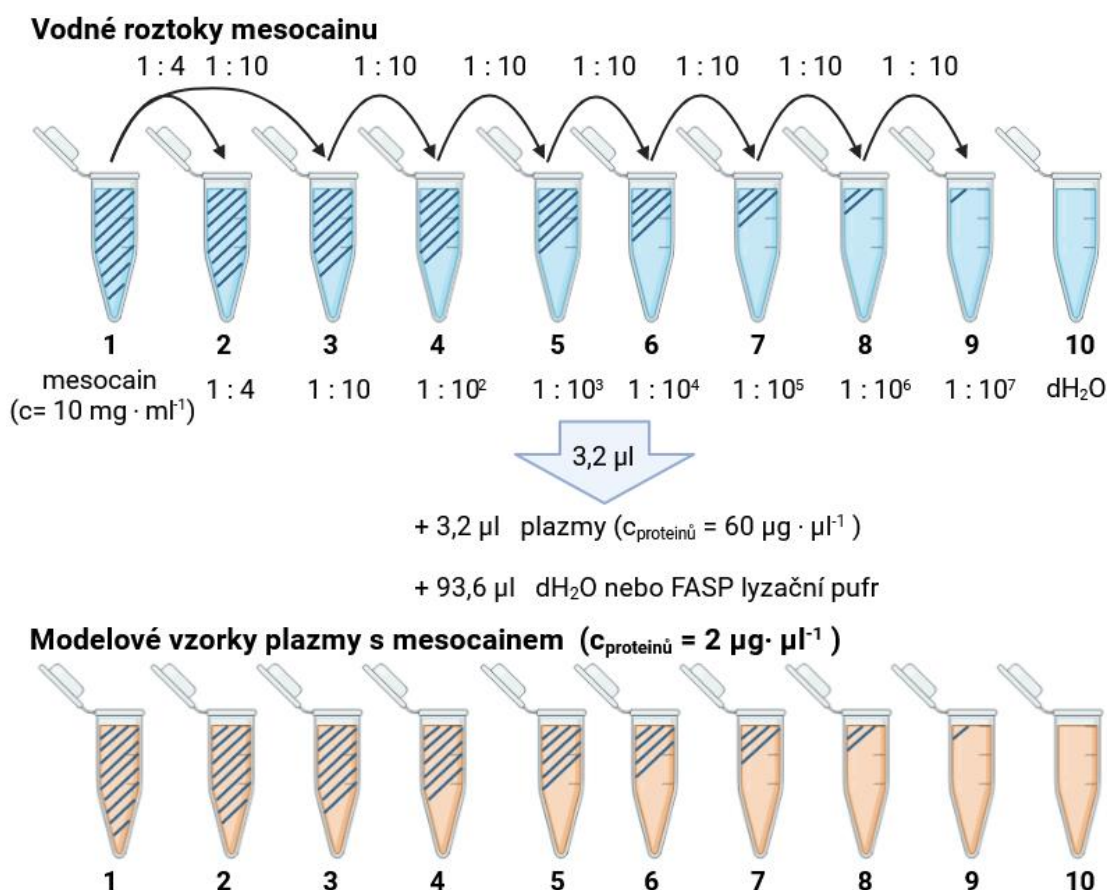
Word (verze 2403, Microsoft 365, USA)

- Program byl použit pro sepsání diplomové práce.

3.1.4 Biologický materiál

3.1.4.1 Modelové vzorky plazmy s mesocainem

Pro testování vybraných protokolů pro přípravu proteomických vzorků bylo nutné připravit modelové vzorky z důvodu malého množství vzorků tukové tkáně. Jako modelové vzorky byly použity vzorky plazmy s přidaným mesocainem. Nejprve byly připraveny vodné roztoky mesocainu ředěním (1 : 4; 1 : 10; 1 : 100; 1 : 10³; 1 : 10⁴; 1 : 10⁵; 1 : 10⁶; 1 : 10⁷) původního roztoku mesocainu o koncentraci 10 mg · ml⁻¹. Následně byly vytvořeny modelové vzorky (Obr. 11) plazmy s mesocainem smísením vodných roztoků mesocainu, plazmy o proteinové koncentraci 60 μg · μl⁻¹ a vody, nebo lyzačního pufru v případě vzorků pro FASP protokol.



Obr. 11: Pro přípravu modelových vzorků plazmy s mesocainem byla připravena koncentrační řada vodných roztoků ředěním původního roztoku mesocainu o koncentraci 10 mg · ml⁻¹ (1 : 4; 1 : 10; 1 : 100; 1 : 10³; 1 : 10⁴; 1 : 10⁵; 1 : 10⁶; 1 : 10⁷) a dH₂O. Následně bylo odebráno 3,2 μl připraveného roztoku mesocainu, ke kterému bylo přidáno 3,2 μl plazmy o koncentraci proteinů 60 μg · μl⁻¹ a 93,6 μl dH₂O. Výsledná koncentrace proteinů v modelových vzorcích plazmy byla 2 μg · μl⁻¹. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

3.2 Metody

Připravené modelové vzorky plasmy s mesocainem byly zpracovány čtyřmi testovanými protokoly: iST, protokol s proteinovou precipitací acetonem s následným zpracováním pomocí iST protokolu (A-iST), SP3 a FASP. Následně byla stanovena peptidová koncentrace pomocí bicinchoninové metdy (BCA). Poté byla provedena LC-MS analýza a vyhodnocení dat.

3.2.1 iST protokol

3.2.1.1 Roztoky

Tris pufr, 100 mmol · l⁻¹, pH 8,5

Navážka 484,4 mg Tris byla rozpuštěna v cca 35 ml dH₂O. Následně bylo upraveno pH roztoku pomocí HCl o koncentraci 2 mol · l⁻¹ na hodnotu 8,5 a roztok byl doplněn na výsledný objem 40 ml.

Lyzační pufr (1% SDC, 10 mmol · l⁻¹ TCEP, 40 mmol · l⁻¹ CAA, 100 mmol · l⁻¹ Tris pufr, pH 8,5)

Navážky 50 mg SDC, 14,3 mg TCEP a 18,7 mg CAA byly rozpuštěny ve 4 ml Tris pufru o koncentraci 100 mmol · l⁻¹, pH 8,5 a následně byl roztok doplněn na výsledný objem 5 ml.

Roztok 1% TFA v dH₂O

Objem 100 µl TFA byl přidán do 9 900 µl dH₂O.

Roztok 1% TFA v EtAc

Objem 100 µl TFA byl přidán do 9 900 µl EtAc.

Roztok 0,2% TFA v dH₂O

Objem 20 µl TFA byl přidán do 9 980 µl dH₂O.

Eluční roztok (80% ACN s 1% NH₄OH v dH₂O)

K 8 ml ACN bylo přidáno 1 600 µl dH₂O a 400 µl 25% NH₄OH.

LC-LOAD roztok (1% ACN s 0,05% TFA v dH₂O)

K 9 895 µl dH₂O bylo přidáno 100 µl ACN a 5 µl TFA.

Roztok enzymové směsi trypsin/ Lys-C

K 20 µg lyofilizované směsi enzymů trypsin/ Lys-C bylo přidáno 1 000 µl dH₂O.

3.2.1.2 Postup

Lýza

K 25 µl modelového vzorku bylo přidáno 50 µl lyzačního pufru. Vzniklý roztok byl promíchán a vložen na HEATING BLOCK (95 °C, 1 000 rpm; 10 min). Následně byla provedena centrifugace (135 rpm, 10 s).

Štěpení

Po ochlazení vzorku na laboratorní teplotu bylo přidáno 50 µl enzymové směsi trypsin/ Lys-C a roztok byl vložen na HEATING BLOCK (37 °C, 500 rpm; 3 h). Následně bylo pomocí UIP ověřeno pH roztoku (pH ≈ 8–9). Poté bylo přidáno 75 µl 1% TFA v dH₂O a roztok byl promíchán. Pomocí UIP bylo ověřeno pH roztoku (pH ≈ 2–3). Poté bylo přidáno 75 µl 1% TFA v EtAc. Roztok byl promíchán pomocí pipety a centrifugován (135 rpm, 10 s).

Přečištění peptidů

Vzorek o objemu 275 µl byl nanesen na StageTip SDB-RPS a centrifugován (2 000 g; 3 min). Poté bylo nanesen 200 µl 1% TFA v EtAc na StageTip SDB-RPS a opět byla provedena centrifugace. Dále bylo na StageTip SDB-RPS nanesen 200 µl 0,2% TFA v dH₂O a opět byla provedena centrifugace. StageTip SDB-RPS byl přenesen do eluční zkumavky. Poté na něj bylo nanesen 100 µl elučního roztoku a opět byla provedena centrifugace. Eluát byl odpařen ve vakuové odparce při teplotě 45 °C do kompletního odpaření. Odparek byl rozpuštěn v 50 µl LC-LOAD roztoku. Takto zpracovaný vzorek byl připraven na LC-MS analýzu.

3.2.2 A-iST- protokol

3.2.2.1 Roztoky

Roztoky pro iST protokol viz kapitola 3.2.1.1.

3.2.2.2 Postup

K 90 μl modelového vzorku byl přidán čtyřnásobný objem acetonu vychlazeného na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obsah zkumavek byl promíchán pomocí vortexu a inkubován 60 min při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla provedena centrifugace roztoku ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 min; $15\,000 \times g$) a dekantace supernatantu. Peleta byla vysušena ve vakuové odparce (15 min; $45\text{ }^{\circ}\text{C}$). Odparek byl rozpuštěn v 50 μl dH_2O . Po promíchání bylo odebráno 25 μl a smíšeno s 50 μl lyzačního pufru pro iST protokol. Poté byl vzorek zpracován pomocí výše popsaného iST protokolu (viz kapitola 3.2.1.2.).

3.2.3 SP3 protokol

3.2.3.1 Roztoky

Tris pufr, $100\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8,5

Navážka 484,4 mg Tris byla rozpuštěna v cca 35 ml dH_2O . Následně bylo pomocí HCl o koncentraci $2\text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ upraveno pH roztoku na hodnotu 8,5. Poté byl roztok doplněn na výsledný objem 40 ml.

Lyzační pufr (1% SDC, $10\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ TCEP, $40\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CAA, $100\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris pufr, pH 8,5)

Navážky 50 mg SDC, 14,3 mg TCEP a 18,7 mg CAA byly rozpuštěny ve 4 ml Tris pufru o koncentraci $100\text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8,5 a následně byl roztok doplněn na výsledný objem 5 ml.

Roztok 1% TFA v dH_2O

Objem 100 μl TFA byl přidán do 9 900 μl dH_2O .

Roztok 1% TFA v EtAc

Objem 100 μl TFA byl přidán do 9 900 μl EtAc.

Roztok 80% EtOH v dH_2O

K 0,4 ml dH_2O bylo přidáno 1,6 ml 100% EtOH.

Roztok enzymové směsi trypsin/ Lys-C

K 20 µg lyofilizované směsi enzymů trypsin/ Lys-C bylo přidáno 1 000 µl dH₂O.

3.2.3.2 Postup

Příprava SP3 paramagnetických kuliček

SP3 kuličky byly promíchány na vortexu. Následně bylo odebráno 500 µl obou typů použitých paramagnetických kuliček (Sera-Mag Speedbeads carboxylate-modified [E3] magnetické kuličky (65152105050250) (Cytiva, USA) a Sera-Mag Speedbeads carboxylate-modified [E7] magnetické kuličky (45152105050250) (Cytiva, USA)) do nové zkumavky – celkem 1 000 µl paramagnetických kuliček. Zkumavka byla umístěna na magnetický separátor a po vytvoření peletu byl odstraněn supernatant. Mimo magnetický separátor byly SP3 kuličky promyty 500 µl dH₂O a promíchány pipetováním. Vzniklý supernatant byl odstraněn na magnetickém separátoru. Poté byly SP3 kuličky rozpuštěny v 200 µl dH₂O (20 µl dH₂O na jednu reakci) a promíchány pipetováním mimo magnetický separátor.

Lýza

K 25 µl vzorku bylo přidáno 50 µl lyzačního pufru. Vzniklý roztok byl vložen na HEATING BLOCK (95 °C, 1 000 rpm; 10 min). Následně byla provedena centrifugace (135 rpm, 10 s).

Vazba proteinů na kuličky

Připravený roztok SP3 kuliček byl řádně promíchán pipetováním. K jednotlivým vzorkům bylo přidáno 20 µl připravených kuliček a 95 µl 100% ACN. Obsah zkumavky byl opatrně protřepán a inkubován 15 min při 1 000 rpm.

Promytí kuliček

Zkumavka se vzorkem byla umístěna na magnetický separátor a následně byl odstraněn supernatant. Mimo magnetický separátor bylo přidáno 150 µl 80% EtOH a obsah zkumavky byl promíchán pipetováním. Poté byl opět supernatant odstraněn na magnetickém separátoru. Promytí se opakovalo ještě 2x.

Štěpení

Paramagnetické kuličky s navázanými proteiny byly rozpuštěny v 50 μl lyzačního pufru. Do roztoku bylo přidáno 50 μl enzymové směsi trypsin/ Lys-C a vzniklá směs byla vložena na HEATING BLOCK (37 °C, 1 000 rpm; 3 h). Poté bylo ověřeno pH roztoku pomocí UIP (pH \approx 8–9). Následovalo přidání 100 μl 1% TFA v dH₂O a promíchání. Pomocí UIP bylo ověřeno pH roztoku (pH \approx 2–3). Následně byl na magnetickém separátoru oddělen supernatant od paramagnetických kuliček a přenesen do nových zkumavek. K supernatantu bylo přidáno 100 μl 1% TFA v EtAc. Roztok byl promíchán pomocí pipety a centrifugován (135 rpm, 10 s). Veškerý vzorek (300 μl) byl nanesen na StageTip SDB-RPS. Poté bylo provedeno přečištění peptidů viz kapitola 3.2.1.2.

3.2.4 FASP protokol

3.2.4.1 Roztoky

Tris-HCl pufr, 50 mmol \cdot l⁻¹, pH 7,6

Navážka 394 mg Tris-HCl byla rozpuštěna ve 45 ml dH₂O. Následně bylo upraveno pH na 7,6 pomocí 2 mol \cdot l⁻¹ NaOH, následně byl roztok doplněn dH₂O na výsledný objem 50 ml.

Lyzační pufr (2% SDS (v/w), 50 mmol \cdot l⁻¹ DTT, 50 mmol \cdot l⁻¹ Tris-HCl pufr, pH 7,6)

Navážky 100 mg SDS a 38,56 mg DTT byly sesypány a rozpuštěny ve 4 ml Tris-HCl pufru o koncentraci 50 mmol \cdot l⁻¹, pH 7,6 a následně byl roztok doplněn na výsledný objem 5 ml.

Roztok 0,1 mol \cdot l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,5

Navážka 788 mg Tris-HCl byla rozpuštěna v 45 ml dH₂O. Následně bylo upraveno pH na 8,5 pomocí 2 mol \cdot l⁻¹ NaOH a roztok byl doplněn na výsledný objem 50 ml.

Roztok UA (8 mol \cdot l⁻¹ UA, 0,1 mol \cdot l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,5)

Navážka 7,2072 g UA byla rozpuštěna v cca 10 ml 0,1 mol \cdot l⁻¹ Tris-HCl pufru o koncentraci 0,1 mol \cdot l⁻¹, pH 8,5. Následně byl roztok doplněn na výsledný objem 15 ml.

Roztok IAA (50 mmol \cdot l⁻¹ IAA v roztoku UA)

Navážka 13,87 mg IAA byla rozpuštěna v 1,5 ml UA roztoku.

Pufr pro štěpení (DB – „digest buffer“) (50 mmol · l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,5)

Objem 25 ml 0,1 mmol · l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,5 byl smísen s 22 ml dH₂O. Následně bylo ověřeno a upraveno pH na 8,5 a roztok byl doplněn dH₂O na výsledný objem 50 ml.

Roztok enzymové směsi trypsin/ Lys-C (1:50 = enzym: proteiny)

K 20 µg směsi trypsin/ Lys-C bylo přidáno 800 µl DB.

Roztok 1% TFA v dH₂O

Objem 100 µl TFA bylo přidáno do 9 900 µl dH₂O.

Roztok 1% TFA v EtAc

Objem 100 µl TFA bylo přidáno do 9 900 µl EtAc.

3.2.4.2 Postup

Lýza v SDS

Zkumavky se vzorky s lyzačním pufrem byly umístěny na Heating block (99 °C; 10 min). Následně byly vzorky zchlazeny na pokojovou teplotu.

Přečištění proteinů

Proteinový extrakt o objemu 25 µl byl smíchán s 200 µl roztoku UA ve filtrační jednotce a centrifugován (10 000 g; 15 min) dokud na filtru nezůstalo méně než 10 µl vzorku (platí i pro další centrifugační kroky). Na filtrační jednotku bylo naneseno 200 µl roztoku UA a opět byla provedena centrifugace. Po odstranění supernatantu bylo na filtrační jednotku přidáno 100 µl roztoku IAA. Po promíchání byly filtrační jednotky inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 20 min. Po uplynutí inkubace byla provedena centrifugace (10 000 g; 10 min). Dále bylo na filtrační jednotku naneseno 100 µl roztoku UA a byla provedena centrifugace (10 000 g; 15 min). Tento krok byl proveden ještě dvakrát. Po odstranění supernatantu bylo na filtrační jednotku naneseno 100 µl DB a byla provedena centrifugace (10 000 g; 10 min). Tento krok byl proveden ještě dvakrát.

Štěpení a eluce peptidů

Poté bylo na filtrační jednotku přidáno 40 µl roztoku enzymové směsi trypsin/ Lys-C v DB a roztok byl promíchán v termomixéru (600 rpm; 1 min). Následně byly filtrační jednotky inkubovány na vodní lázni (37 °C; 18 h). Po ukončení inkubace byly filtrační

jednotky přeneseny do nových sběrných zkumavek a následně byly centrifugovány tak, aby veškerý roztok prošel přes filtrační membránu (10 000 g; 5 min). Dále bylo přidáno 100 μ l DB a byla provedena centrifugace (10 000 g; 10 min).

Zastavení reakce

Poté bylo pomocí UIP ověřeno pH roztoku ($\text{pH} \approx 8-9$) a následně bylo přidáno 75 μ l 1% TFA v dH_2O a promícháno. Pomocí UIP bylo ověřeno pH roztoku ($\text{pH} \approx 2-3$). Poté bylo přidáno 75 μ l 1% TFA v EtAc. Roztok byl promíchán pomocí pipety a centrifugován (135 rpm, 10 s). Veškerý vzorek (290 μ l) byl nanesen na StageTip SDB-RPS. Poté bylo provedeno přečištění peptidů viz kapitola 3.2.1.2.

3.2.5 Stanovení peptidové koncentrace BCA metodou

3.2.5.1 Roztoky

Pracovní roztok BCA

Pracovní roztok BCA byl připraven smísením reagentu A s reagentem B (50 : 1, Reagent A : B).

LC-LOAD roztok (1% ACN s 0,05% TFA v dH_2O)

K 9 895 μ l dH_2O bylo přidáno 100 μ l ACN a 5 μ l TFA.

Standardní roztoky BSA

Koncentrace komerčních standardních roztoků BSA jsou uvedeny níže (Tab. 2).

Tab. 2: Koncentrace standardních roztoků BSA

Standardní roztok	Koncentrace BSA [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
1	125
2	250
3	500
4	750
5	1000
6	1500
7	2000

3.2.5.2 Postup

Do jamek na mikrotitrační destičce bylo napipetováno 25 μl blanku (dH_2O pro standardy BSA a LC-LOAD roztok pro analyzované vzorky), standardu BSA v koncentračním rozpětí 125–2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Tab. 2) a analyzovaných vzorků. Blanky a roztoky standardů byly pipetovány v triplicátu, vzorky byly na destičku pipetovány jedenkrát. Následně bylo do každé jamky přidáno 200 μl pracovního roztoku BCA. Po promíchání byla mikrodestička přikryta a proběhla inkubace 30 min při 37 °C. Po uplynutí inkubace byla změřena absorbance roztoků při 562 nm na spektrofotometrickém mikrodestičkovém readeru. Stanovení bylo provedeno podle doporučení výrobce.

3.2.6 LC-MS analýza

3.2.6.1 Roztoky

Mobilní fáze A (0,1% FA v dH_2O)

Objem 300 μl FA byl rozpuštěn v 299,3 ml dH_2O .

Mobilní fáze B (0,1% FA v ACN)

Objem 300 μl FA byl rozpuštěn v 299,3 ml ACN.

Mobilní fáze pro nanášení vzorku (1 % ACN s 0,05 % TFA v dH_2O)

Pro přípravu tohoto roztoku byly smíseny 3 ml ACN, 0,15 ml TFA a 296,85 ml dH_2O .

3.2.6.2 Postup

Analýza vzorků z A-iST, iST a SP3 protokolů

Vzorky z A-iST, iST a SP3 protokolů byly analyzovány na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000 RSLCnano System ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite přes ionizační zdroj EASY-Spray.

Směs peptidů v množství 1 μg byla nanesena na trap kolonu (C18, 5 μm , 100 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$) o průtoku 6 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ pomocí mobilní fáze pro nanášení vzorku. Po 5 min byl přepnut ventil, peptidy byly eluovány z trap kolony a následně byly separovány na nanokoloně (EASYSpray kolona, C18, 3 μm , 75 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$) pomocí lineárního gradientu z 2 na 35 % mobilní fáze B o průtoku 300 $\text{nl} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 60 min. Poté bylo v průběhu 3 min zvýšeno zastoupení mobilní fáze B v mobilní fázi z 35 % na 90 %. Dále bylo po dobu 5 min udržováno zastoupení mobilní fáze B na 90 %.

Poté bylo v průběhu 2 min zastoupení mobilní fáze B sníženo na 2 %. Toto složení bylo udržováno dalších 20 min. Celková doba analýzy byla 95 min. Teplota na trap a nanokoloně byla nastavena na 35 °C.

Eluované peptidy byly ionizovány v ionizačním zdroji EASY-Spray na hmotnostním spektrometru Orbitrap Elite, který pracoval v data dependentním módu. MS1 sken byl analyzován v Orbitrapu (m/z 200–1 700) s rozlišením 60 000. Orbitrap byl plněn na hodnotu $4,0 \cdot 10^5$ iontů. Pro MS/MS sken v iontové pasti bylo postupně vybráno deset nejintenzivnějších iontů. Iontová past byla plněna na cílovou hodnotu $1,0 \cdot 10^4$ iontů, Izolační šířka byla 1,6 m/z a fragmentace prekurzorů proběhla pomocí kolizně indukované disociace (CID – „Collision-Induced Dissociation“) s 35% hodnotou normalizované kolizní energie. Q aktivace měla hodnotu 0,25 a aktivační čas byl 10 ms. Maximální akumulací čas byl pro MS1 50 ms a pro MS/MS sken 250 ms. Dynamické vyloučení mělo hodnotu 15 s. Napětí na ionizačním zdroji bylo 2 kV a trubice pro transport iontů byla vyhřívána na 200 °C.

Analýza vzorků z FASP protokolu

Vzorky z FASP protokolu byly analyzovány na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3 000 RSLCnano System ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exploris 480 přes ionizační zdroj EASY-Spray.

Směs peptidů v množství 1 µg byla nanášena na trap kolonu (C18, 5 µm, 100 µm × 20 mm) o průtoku $6 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ pomocí mobilní fáze pro nanášení vzorku. Po 5 min byl přepnut ventil, peptidy byly z trap kolony eluovány a následně byly separovány na nanokoloně (EASYspray kolona, C18, 3 µm, 75 µm × 250 mm) pomocí lineárního gradientu z 2 na 35 % mobilní fáze B o průtoku 300 nl/min po dobu 60 min. Poté bylo v průběhu 3 min zvýšeno zastoupení mobilní fáze B v mobilní fázi z 35 % na 90 %. Poté bylo v průběhu 2 min zastoupení mobilní fáze B sníženo na 2 %. Toto složení bylo udržováno dalších 20 min. Celková doba analýzy byla 95 min. Teplota na trap a nanokoloně byla nastavena na 35 °C. ca

Eluované peptidy byly ionizovány v ionizačním zdroji EASY-Spray na hmotnostním spektrometru Orbitrap Exploris 480, který pracoval v data dependentním módu. MS1 sken byl analyzován v Orbitrapu (m/z 200–1 500) s rozlišením 60 000. Orbitrap byl plněn na normalizovanou Automatic Gain Control (AGC) hodnotu $4,0 \cdot 10^5$ iontů. Pro MS/MS sken v Orbitrapu bylo postupně vybráno deset nejintenzivnějších iontů.

Orbitrap pro MS/MS sken byl nastaven na rozlišení 15 000 a byl plněn na normalizovanou 100% AGC cílovou hodnotu, izolační šířka byla 2 m/z a fragmentace prekurzorů proběhla pomocí vysokoenergetické kolizní disociace (HCD – „Higher-Energy Collisional Dissociation“) s 27% hodnotou normalizované kolizní energie. Q aktivace byla 0,25 a aktivační čas byl 10 ms. Maximální akumulací čas byl pro MS1 sken 110 ms a pro MS/MS sken byl nastaven na hodnotu „Auto“. Dynamické vyloučení bylo 50 s. Napětí na ionizačním zdroji bylo 2 kV a trubice pro transport iontů byla vyhřívána na 275 °C.

3.2.6.3 Zpracování a vyhodnocení dat

Raw soubory byly zpracovány v programu MaxQuant (verze 2.5.1.0). Vyhledávání bylo provedeno proti lidské UniProt databázi (20230109_Uniprot_homo_sapiens_canonical_reviewed; 20365 záznamů) pomocí vyhledávacího nástroje Andromeda. Jako enzym byl nastaven trypsin/P a bylo umožněno vynechání maximální dvou štěpných míst. Karbamindometylace cysteinu byly nastaveny jako fixní modifikace a jako variabilní modifikace byla nastavena oxidace methioninu a acetylace N-koncové části proteinu. Peptidové a proteinové hity byly filtrovány s 1% korekcí typu „false-discovery rate“ (FDR) a minimální délka peptidu byla nastavena na 7 aminokyselin. Opačně čtené sekvence z původní databáze byly použity jako opačná (decoy) databáze. Všechny ostatní parametry byly ponechány v původním nastavení.

Vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Perseus (verze 2.0.11.0). Soubory „proteinGroups.txt“ a „peptides.txt“, které vznikly po provyhledání v programu MaxQuant, byly importovány do programu Perseus, kde z nich byly následně extrahovány informace o počtu identifikovaných proteinů, počtu identifikovaných peptidů, sekvenčním pokrytí proteinů, relativní distribuci peptidů s vynechanými štěpnými místy po enzymovém štěpení v jednotlivých vzorcích napříč testovanými protokoly.

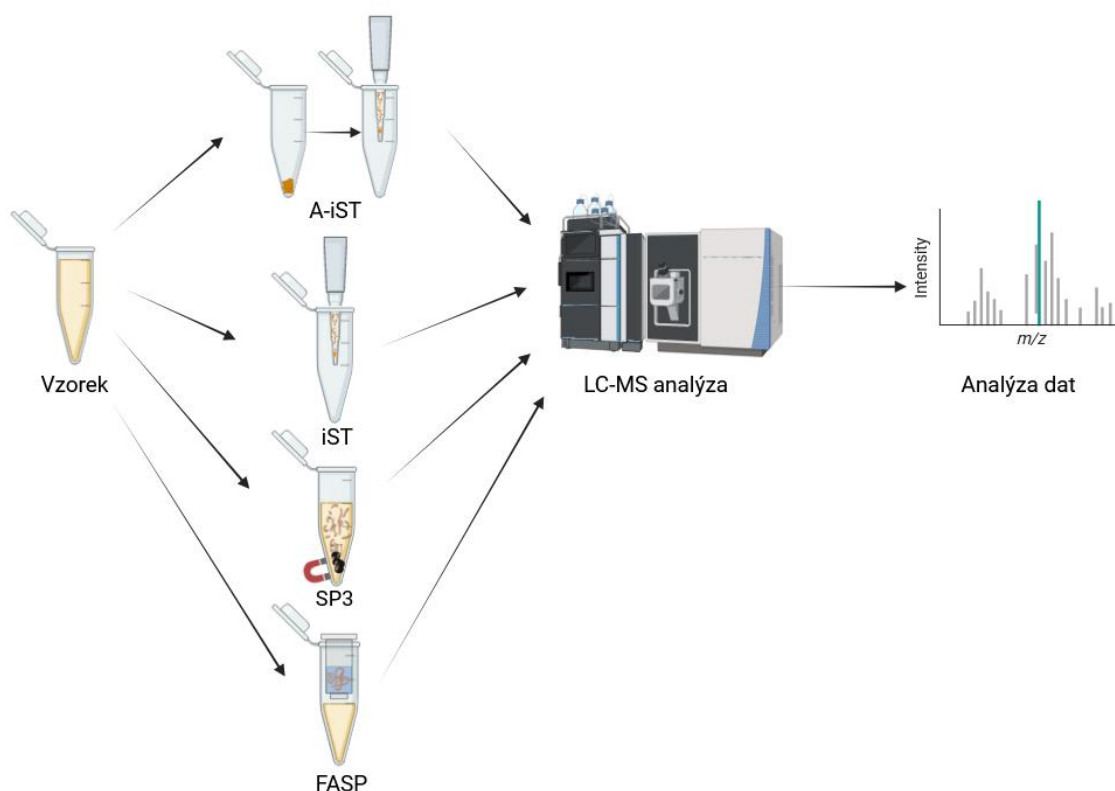
Soubor „msms.txt“, který vznikl po provyhledání v programu MaxQuant, byl importován spolu se všemi raw daty do programu Skyline, za účelem zjištění relativního množství mesocainu ve vzorku. Z programu byly exportovány plochy pod křivkou pro

mesocain a pro všechny identifikované peptidy a mesocain (celková intenzita ve vzorku). Relativní množství mesocainu bylo určeno z poměru plochy pod křivkou pro mesocain a celkové intenzity ve vzorku.

Extrahovaná data byla nakonec přenesena do programu Excel, kde byla následně zpracována.

4 VÝSLEDKY

Pro testování jednotlivých protokolů pro zpracování vzorků bylo připraveno 10 modelových vzorků plazmy se snižující se koncentrací mesocainu (Obr. 11). Tyto vzorky byly zpracovány pomocí čtyř různých protokolů: A-iST, iST, SP3 a FASP. Následně byla provedena LC-MS analýza, během které byl každý vzorek analyzován dvakrát. Vzorky z A-iST, iST a SP3 protokolů byly analyzovány na LC-MS sestavě s Orbitrapem Elite. Vzorky z FASP protokolu byly nakonec analyzovány na LC-MS sestavě s Orbitrapem Exploris 480 z důvodu řešení opravy Orbitrapu Elite. Získaná data byla dále zpracována a analyzována v programech MaxQuant, Perseus, Skyline a Excel (Obr. 12).

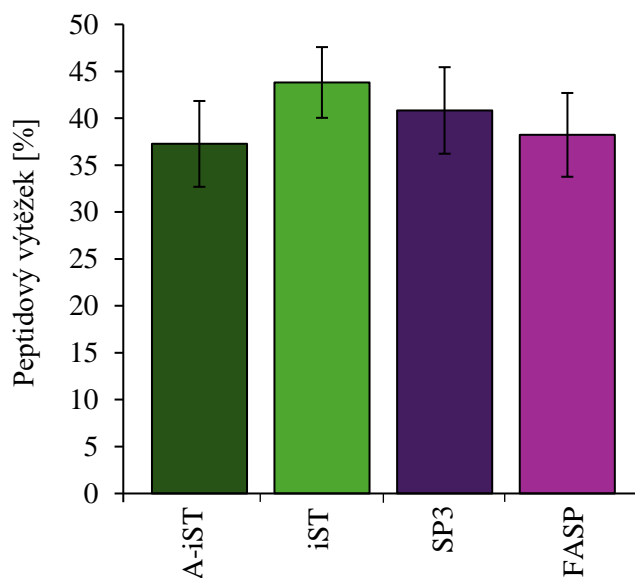


Obr. 12: Modelové vzorky plazmy se snižující se koncentrací mesocainu byly zpracovány pomocí čtyř různých protokolů. První protokol zahrnoval precipitaci proteinů acetonem a jejich následné štěpení ve špičkách (A-iST). Druhý protokol zahrnoval štěpení proteinů ve špičkách (iST). Třetí protokol zahrnoval přečištění proteinů a jejich štěpení na paramagnetických kuličkách (SP3). Čtvrtý protokol zahrnoval přečištění proteinů a jejich následné štěpení na filtru (FASP). Zpracované vzorky byly podrobeny LC-MS analýze. Získaná data byla dále zpracována a analyzována. Vytvořeno pomocí BioRender.com.

Jednotlivé vzorky z protokolů byly vyhodnoceny a porovnány na základě následujících parametrů: procentuální peptidový výtěžek, počet identifikovaných proteinů a peptidů, průměrné sekvenční pokrytí proteinů, relativní distribuce peptidů s vynechanými štěpnými místy po enzymovém štěpení. Pro tyto parametry byla vyhodnocena reprodukovatelnost na základě variačního koeficientu. Jako poslední byla vyhodnocena přítomnost a relativní množství mesocainu ve zpracovaných vzorcích.

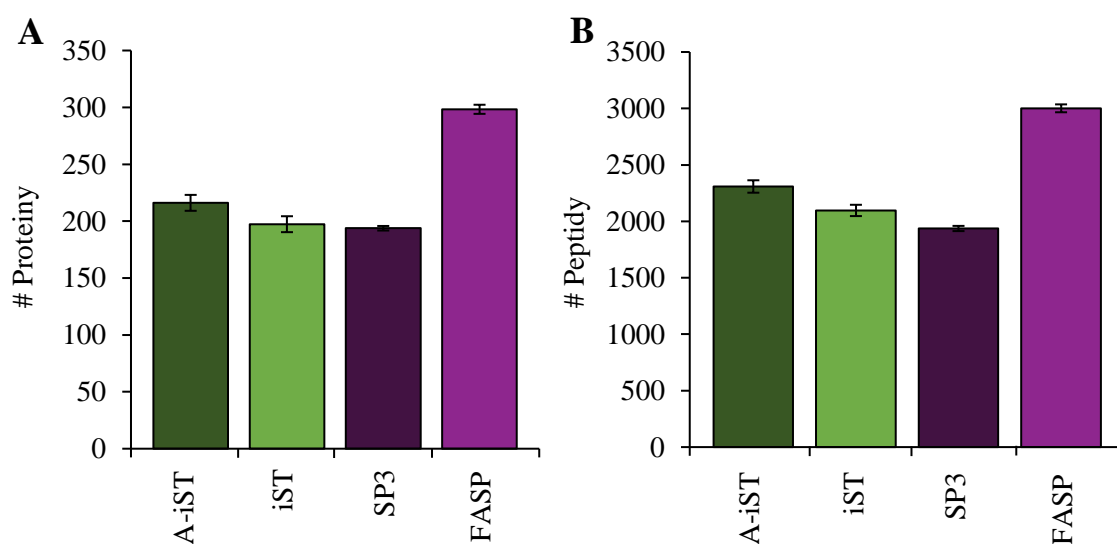
Během přípravy vzorků došlo ke ztrátě vzorku 6 u FASP protokolu a vzorku 10 u iST a SP3 protokolu, proto nebyla data z těchto vzorků zahrnuta do vyhodnocení výsledků.

Jako první parametr byl vyhodnocen procentuální peptidový výtěžek (Obr. 13), který byl určen z poměru množství peptidů ve vzorku získaných po přečištění a vstupního množství proteinů přítomného v původním vzorku (50 µg). Peptidové množství bylo stanoveno pomocí BCA metody. Tento parametr vycházel srovnatelně u všech protokolů okolo 40 %. Nejvíce získaných peptidů a nejnižší variabilita byla u iST protokolu (44,0 % a 7,9 %). Nejméně získaných peptidů a nejvyšší variabilita byla u A-iST protokolu (37,3 % a 11,8 %). U SP3 a FASP protokolů bylo získáno 40,8 % a 38,5 % peptidového výtěžku a jejich variabilita byla 10,9 % a 10,6 %.



Obr. 13: Nagrafu je vynesena procentuální peptidový výtěžek, který byl určen z poměru množství peptidů ve vzorku získaných po přečištění a vstupního množství proteinů přítomného v původním vzorku (50 µg) napříč testovanými protokoly (A-iST, iST, SP3, FASP). Počet vzorků u A-iST protokolu bylo 10 a u iST, SP3 a FASP protokolů bylo 9. Chybové úsečky představují hodnotu SD.

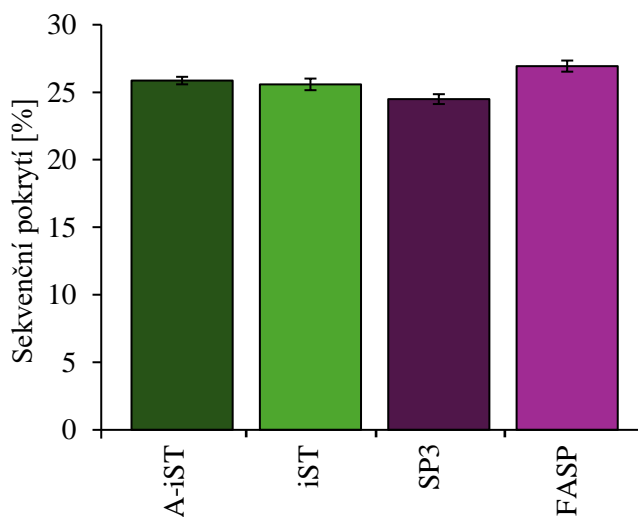
Dále byl vyhodnocen počet identifikovaných proteinů (Obr. 14 A) a peptidů (Obr. 14 B). Proteiny a peptidy nacházející se ve zpracovaných vzorcích byly identifikovány z dat získaných během LC-MS analýzy, které byly provyhledány v programu MaxQuant. Výsledky z provyhledání ve formě textových souborů byly nahrány do programu Perseus. Pro informace o počtu identifikovaných proteinů byl nahrán soubor proteinGroups.txt. Pro informace o počtu identifikovaných peptidů byl nahrán soubor peptides.txt. Získané hodnoty byly následně zprůměrovány pro každý protokol a vyneseny do grafu (Obr. 14). Počet identifikovaných proteinů se ve vzorcích pohyboval v rozmezí 190–300. Nejvíce proteinů bylo identifikováno ve vzorcích zpracovaných FASP protokolem s druhou nejnižší variabilitou (298, 1,4 %), zatímco u ostatních protokolů bylo identifikováno okolo 200. Nejméně proteinů a s nejnižší variabilitou bylo identifikováno ve vzorcích zpracovaných SP3 protokolem (193, 1,2 %). U A-iST a iST protokolů bylo identifikováno 216 a 197 proteinů s variabilitou 3,2 % a 3,4 %. Počet identifikovaných peptidů se ve vzorcích pohyboval v rozmezí 1900–3100. Podobně jako v případě předchozího parametru i zde byl identifikován nejvyšší počet peptidů s nejnižší variabilitou u vzorků zpracovaných FASP protokolem (3001, 1,1 %).



Obr. 14: Na grafech je vyneseno průměrné množství identifikovaných proteinů (A) a peptidů (B) identifikovaných v modelových vzorcích plazmy s mesocainem zpracovaných testovanými protokoly (A-iST, iST, SP3, FASP). Počet vzorků u A-iST protokolu bylo 10 a u iST, SP3 a FASP protokolů bylo 9. Chybové úsečky představují hodnotu SD.

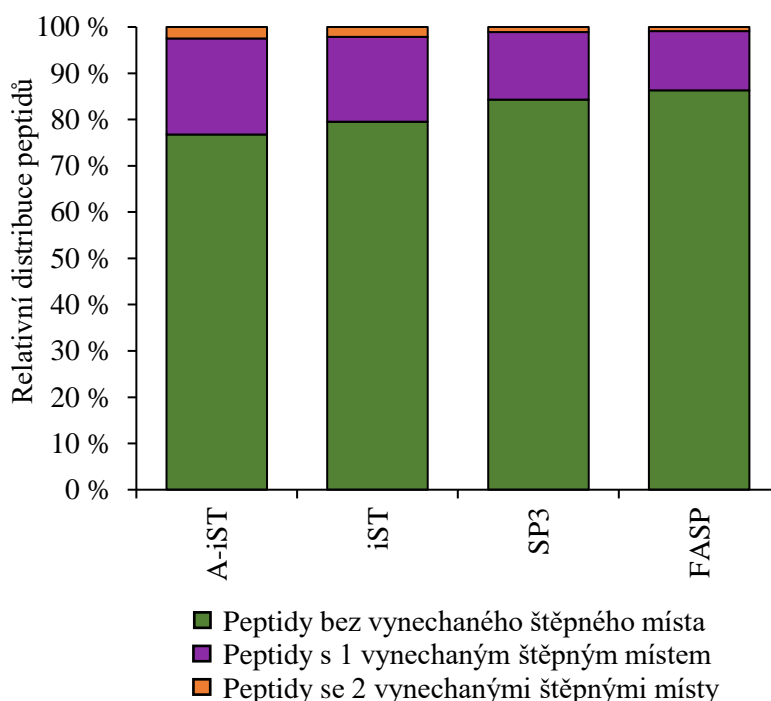
Ve zbylých vzorcích se tato hodnota pohybovala kolem 2000. Nejméně peptidů bylo, stejně jako v případě počtu proteinů, identifikováno ve vzorcích zpracovaných SP3 protokolem (1936) s variabilitou 1,1 %. Ve vzorcích zpracovaných A-iST a iST protokolem bylo identifikováno 2308 a 2096 peptidů s variabilitou 2,3 % pro oba protokoly.

Čtvrtým vyhodnocovaným parametrem bylo průměrné sekvenční pokrytí proteinů. Pro informace o průměrném sekvenčním pokrytí proteinů ve vzorcích byl nahrán soubor proteinGroups.txt do programu Perseus. Pro výpočet průměrného sekvenčního pokrytí proteinů byl proveden součet hodnot sekvenčního pokrytí proteinů, který byl vydělen počtem identifikovaných proteinů v daném vzorku. Získané procentuální sekvenční pokrytí bylo vyneseno do grafu (Obr. 15). Hodnota sekvenčního pokrytí byla u všech protokolů přibližně 25 %. Nejvyšší sekvenční pokrytí bylo u protokolu FASP protokolu (26,90 %), nejnižší sekvenční pokrytí bylo u SP3 protokolu (24,50 %). Variabilita byla pro oba protokoly 1,5 %. U A-iST a iST protokolů byly hodnoty sekvenčního pokrytí 25,86 % a 25,60 % s variabilitou 1,1 % a 1,7 %.



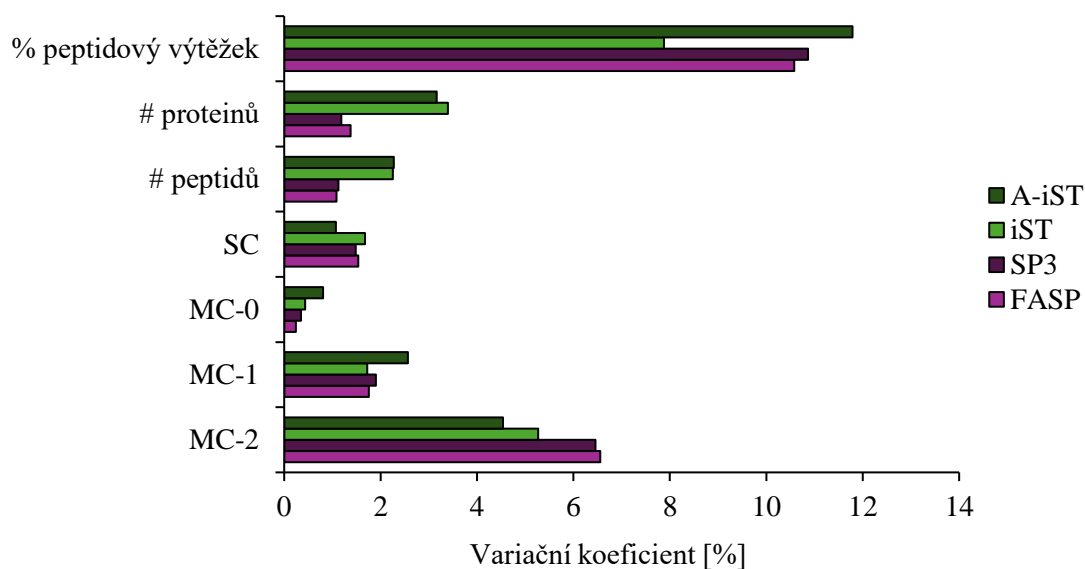
Obr. 15: Graf znázorňuje průměrné sekvenční pokrytí proteinů v modelových vzorcích plazmy s mesocainem zpracovaných testovanými protokoly (A-iST, iST, SP3, FASP). Počet vzorků u A-iST protokolu bylo 10 a u iST, SP3 a FASP protokolů bylo 9. Chybové úsečky představují hodnotu SD.

Pátým sledovaným parametrem byla relativní distribuce peptidů s vynechanými štěpnými místy po enzymovém štěpení (Obr. 16). Pro určení tohoto parametru byly nejprve v programu Perseus z celkového počtu identifikovaných peptidů odfiltrovány peptidy identifikované na základě reverzní sekvence a označené jako potenciální kontaminanty. Následně byly peptidy vyfiltrovány na základě informací o vynechaných štěpných místech. Počet peptidů bez vynechaného štěpného místa a s 1, nebo 2 vynechanými štěpnými místy byl vydělen celkovým počtem peptidů – tímto způsobem byla vypočítána relativní distribuce těchto peptidů. Průměrná hodnota relativní distribuce peptidů bez vynechaného štěpného místa a s 1, nebo 2 vynechanými štěpnými místy pro jednotlivé protokoly byla vynesena do grafu (Obr. 16). Relativní distribuce peptidů bez vynechaného štěpného místa se napříč protokoly pohybovala kolem 80 %. Nejvyšší zastoupení peptidů bez vynechaného štěpného místa bylo u FASP protokolu (86 %), naopak nejnižší zastoupení peptidů bez vynechaného štěpného místa bylo u A-iST protokolu (77 %). U iST a SP3 protokolů bylo zastoupení peptidů bez vynechaného štěpného místa 80 % a 84 %.



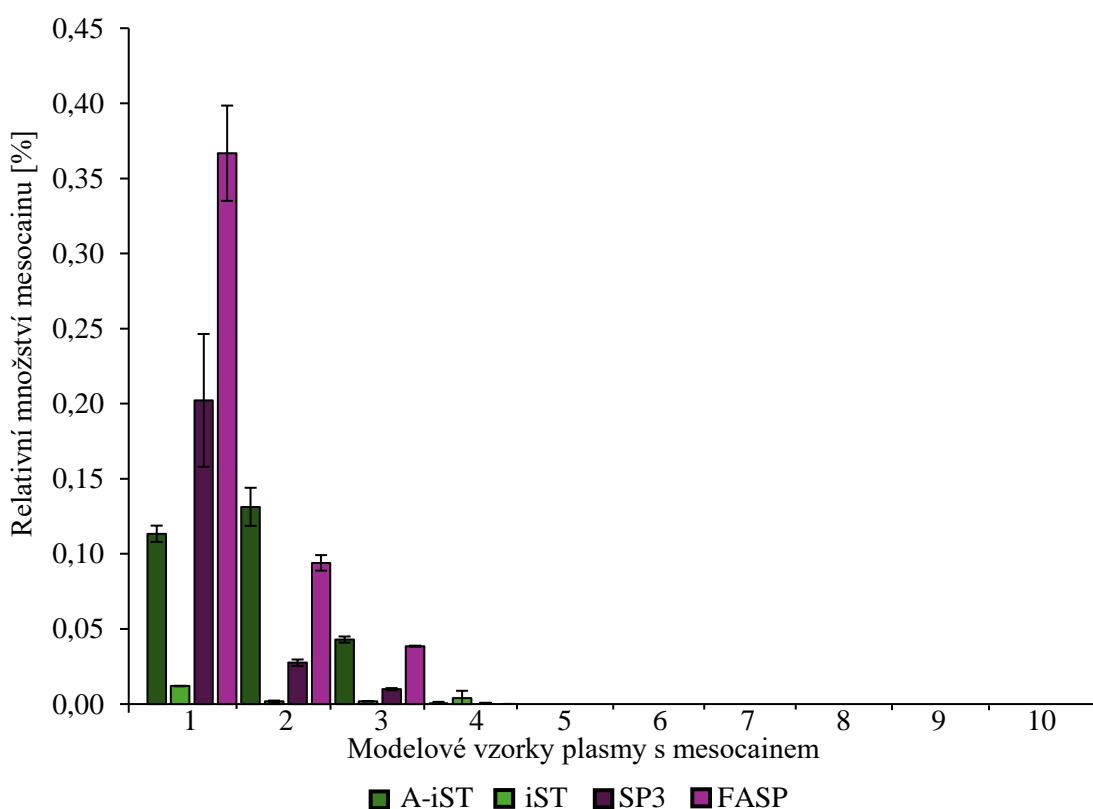
Obr. 16: Graf znázorňuje relativní distribuci peptidů s vynechanými štěpnými místy po enzymovém štěpení v modelových vzorcích plazmy s mesocainem zpracovaných testovanými protokoly (A-iST, iST, SP3, FASP). Počet vzorků u A-iST protokolu bylo 10 a u iST, SP3 a FASP protokolů bylo 9.

Dále byla vyhodnocena reprodukovatelnost jednotlivých protokolů podle pěti výše zmíněných parametrů na základě vypočítaného variačního koeficientu (Obr. 17). U všech čtyřech protokolů byla pro všechny sledované parametry hodnota variačních koeficientů nižší než 20 %.



Obr. 17: V grafu je srovnána reprodukovatelnost A-iST, iST, SP3 a FASP protokolů dle hodnot variačních koeficientů pro sledované parametry: procentuální peptidový výtěžek (% peptidový výtěžek), počet identifikovaných proteinů (# proteinů), počet identifikovaných peptidů (# peptidů), sekvenční pokrytí (SC), relativní distribuce peptidů bez vynechaného místa (MC-0), s jedním vynechaným štěpným místem (MC-1) a se dvěma vynechanými štěpnými místy (MC-2). Počet vzorků u A-iST protokolu bylo 10 a u iST, SP3 a FASP protokolů bylo 9.

Jako poslední byla vyhodnocena přítomnost a relativní množství mesocainu ve zpracovaných vzorcích (Obr. 18). Pro účely zjištění relativního množství mesocainu ve vzorku byly pomocí programu Skyline exportovány plochy pod křivkou pro mesocain a pro všechny identifikované peptidy a mesocain (celková intenzita ve vzorku). Relativní množství mesocainu bylo určeno z poměru plochy pod křivkou pro mesocain a celkovou intenzitu ve vzorku. U všech protokolů byl mesocain detekován ve zpracovaných vzorcích 1–4, zatímco ve vzorcích 5–10 nebyl detekován. Obsah mesocainu v vzorcích 1-4 byl přímo úměrný míře ředění mesocainu v původním roztoku. Nejmenší relativní množství mesocainu obsahovaly vzorky zpracované A-iST a iST protokoly, kdy byla hodnota pro vzorek 1 0,113 % a 0,012 %. Vyšší relativní množství mesocainu (0,202 % pro vzorek 1) obsahovaly vzorky zpracované SP3 protokolem. Nejvyšší relativní množství mesocainu bylo obsaženo ve vzorcích zpracovaných FASP protokolem (0,367 % pro vzorek 1).



Obr. 18: Na grafu je znázorněn relativní obsah mesocainu v modelových vzorcích plazmy s mesocainem zpracovaných testovanými protokoly (A-iST, iST, SP3, FASP). Počet vzorků u A-iST protokolu bylo 10 a u iST, SP3 a FASP protokolů bylo 9. Chybové úsečky představují hodnotu SD.

5 DISKUSE

V rámci této diplomové práce byla řešena problematika kontaminace tukové tkáně mesocainem. Mesocain je lokální anestetikum běžně používané při biopsii tukové tkáně. Místo pro jeho aplikaci se nachází v blízkosti místa určeného pro odběr tukové tkáně, proto se vyskytuje i v odebrané tukové tkáni. Tato externí kontaminanta způsobuje iontovou supresi peptidů v čase eluce mesocainu během LC-MS analýzy vzorků tukové tkáně. Lokální anestetika jsou běžně používána pro biopsie různých druhů tkání za účelem znecitlivění místa odběru. Tyto externí kontaminanty mohou zůstat v odebrané tkáni a dále ovlivňovat všechny části zpracování vzorku a LC-MS analýzy. Dosud nebyla publikována žádná práce pojednávající o problematice kontaminace bioptických tkání lokálními anestetiky, jejich vlivu na LC-MS analýzu a možnostech jejich odstranění. Nicméně vliv lokálních anestetik by neměl být v rámci přípravy vzorku a LC-MS analýzy bioptických vzorků opomíjen.

Cílem této diplomové práce bylo nalézt takový protokol pro přípravu proteomických vzorků, který by zajistil odstranění mesocainu ze vzorku a který by byl dále vhodný pro zpracovávání vzorků tukové tkáně. Pro testování vybraných protokolů (A-iST, iST, SP3, FASP), které jsou založeny na odlišných principech zpracování vzorku, byly připraveny modelové vzorky plazmy se snižujícím se množstvím mesocainu. Všechny testované protokoly vykazovaly reprodukovatelné výsledky pro sledované parametry (procentuální peptidový výtěžek, počet identifikovaných proteinů a peptidů, průměrné sekvenční pokrytí proteinů, relativní distribuce peptidů s vynechanými štěpnými místy po enzymovém štěpení), nicméně žádný z nich nebyl dostatečně účinný pro úplné odstranění mesocainu ze vzorku.

Navržené parametry byly využity k porovnání jednotlivých testovaných protokolů. Nejvyšší procentuální peptidový výtěžek byl u iST protokolu, protože zahrnoval nejméně kroků během přípravy vzorků, kde by mohlo docházet ke ztrátě proteinů a peptidů. Nejvyšší počet proteinů a peptidů byl identifikován u FASP protokolu oproti zbylým třem testovaným protokolům. Vzorky z A-iST, iST a SP3 protokolů byly měřeny na Orbitrapu Elite, kdežto vzorky z FASP protokolu byly měřeny na Orbitrapu Exploris 480 z důvodu opravy Orbitrapu Elite. Vyšší počet identifikovaných proteinů a peptidů u FASP protokolu byl způsoben měřením na novější LC-MS sestavě. Srovnatelné hodnoty počtu identifikovaných proteinů a peptidů mezi iST, SP3 a FASP protokoly byly pozorovány i u studie Varnavides et al., 2022 provedené na buněčných lyzátech. Rovněž u studie

provedené na vzorcích listů z *Arabidopsis thaliana* byl počet identifikovaných proteinů a peptidů u SP3 a FASP protokolů podobný (Mikulášek et al., 2021). Také u studie Mayr et al., 2024 provedené na buněčných lyzátech byly počty identifikovaných proteinů a peptidů mezi SP3 a FASP protokoly podobné, nicméně u FASP protokolu byly pozorovány vyšší hodnoty. Naopak u studie Sielaff et al., 2017, která byla rovněž provedena na buněčných lyzátech, byl nejvyšší počet identifikovaných proteinů a peptidů u iST protokolu v porovnání s SP3 a FASP protokoly. Počty identifikovaných proteinů a peptidů u iST, SP3 a FASP protokolů jsou tedy srovnatelné i při zpracování různých typů vzorků. Z hlediska sekvenčního pokrytí proteinů ve vzorcích byly testované protokoly srovnatelné. Sekvenční pokrytí u iST a FASP protokolů bylo srovnatelné i ve studii provedené na vzorcích slin (Zhang et al., 2020). Z hlediska relativní distribuce peptidů s vynechanými štěpnými místy po enzymovém štěpení byl nejlépe hodnocen FASP protokol, kde bylo nejvyšší zastoupení peptidů bez vynechaného štěpného místa, což mohlo být způsobeno delším časem štěpení (přes noc). U zbývajících tří protokolů bylo naopak vyšší zastoupení peptidů s 1 a 2 vynechanými štěpnými místy, což bylo způsobeno kratším časem štěpení (3 h). Ve studii Varnavides et al., 2022, kde byla délka enzymového štěpení trypsinem 20 h u všech protokolů, bylo při porovnání iST, SP3 a FASP protokolů naopak nejvyšší zastoupení peptidů bez vynechaného štěpného místa u iST protokolu a u FASP protokolu byla tato hodnota druhá nejvyšší. Ve studii Mayr et al., 2024, kdy enzymové štěpení směsí enzymů trypsin/ LysC probíhalo přes noc, byla relativní distribuce peptidů bez vynechaného štěpného místa u FASP protokolu vyšší než u SP3 protokolu. Enzymové štěpení může být ovlivněno délkou štěpení a typem použitých enzymů.

Všechny testované protokoly vykazovaly z hlediska výše zmíněných pěti parametrů dobrou míru reprodukovatelnosti, kdy byl variační koeficient menší než 20 %. Dobrá míra reprodukovatelnosti na základě hodnot proteinové abundance byla také pozorována ve studiích na buněčných lyzátech srovnávajících iST, SP3 a FASP protokoly (Sielaff et al., 2017; Varnavides et al., 2022) a iST a FASP protokoly (Zhang et al., 2020). Dobrá míra reprodukovatelnosti byla na základě hodnot proteinové abundance prokázána i při srovnání SP3 a FASP protokolů provedených na vzorcích listů z *A. thaliana* (Mikulášek et al., 2021). Vysoká míra reprodukovatelnosti na základě počtu identifikovaných

proteinů a peptidů byla vyhodnocena také u studie Mayr et al., 2024 u SP3 a FASP protokolů provedených na buněčných lyzátech. Testované protokoly mají vysokou míru reprodukovatelnosti napříč různými typy vzorků.

Z výše popsaných výsledků vyplývá, že je obtížné najít univerzální protokol pro přípravu proteomických vzorků, který by měl ve všech sledovaných parametrech nejlepší výsledky. Jako nejlepší protokol byl vybrán iST protokol, protože byl nejúčinnější pro odstranění mesocainu ze vzorku, poskytoval nejvyšší peptidovou výtěžnost a byl časově nejméně náročný.

Mesocain byl detekován ve zpracovaných vzorcích 1–4, napříč všemi protokoly. V těchto vzorcích bylo původní množství mesocainu nejvyšší. Relativní množství mesocainu ve zpracovaných modelových vzorcích odpovídalo míře nařazení mesocainu ve vzorcích u všech testovaných protokolů. Použití vybraných protokolů tedy nevedlo k úplnému odstranění mesocainu ze vzorku. Mohlo to být zapříčiněno vazbou mesocainu na proteiny a peptidy, což je z literatury známo (Taylor & McLeod, 2020).

Jedním z možných řešení by mohlo být použití jiného lokálního anestetika při odběru tukové tkáně, jejichž vazba na proteiny je slabší, např. prilocain nebo lidocain. Použití takového anestetika by ovšem mohlo vést k nižší účinnosti lokální anestezie, protože anestetika se slabší vazbou na proteiny mají slabší účinek, než anestetika se silnější vazbou na proteiny (Taylor & McLeod, 2020). Avšak ani při použití jiného anestetika není zaručené, že by nedocházelo k ovlivnění analýzy vzorku. Druhou možností je vůbec nepoužívat lokální anestetikum před odběrem, což by pro pacienta znamenalo, že by byl odběr tukové tkáně více bolestivý. Třetí možností by mohl být odběr tukové tkáně v celkové anestezii, kdy by se použité anestetikum nedistribovalo přímo do místa, odkud je vzorek tukové tkáně odebírán, nicméně celková anestezie je pro pacienty daleko více zatěžující a riziková než lokální anestezie. Čtvrtou možností by mohlo být vyzkoušení jiných protokolů pro přípravu proteomických vzorků a jejich modifikace. Dalším možným řešením by mohlo být využití metody „high-field asymmetric waveform ion mobility spektrometry“ (FAIMS). Většina kontaminantů vyskytujících se v proteomických vzorcích je jednonásobně nabitých, které se pomocí této metody odfiltrují a dále vstupují pouze vícenásobně nabitě ionty, které jsou následně měřené pomocí hmotnostní spektrometrie (Frankenfield et al., 2022).

Pro testování vybraných protokolů byly použity připravené modelové vzorky plasmy o klesajícím množství mesocainu a ne tuková tkáň hned z několika důvodů. Jednak se během biopsie tukové tkáně odebírá přibližně 5–40 mg tukové tkáně, což je poměrně malé množství, navíc k diagnostice je ročně zasíláno přibližně deset vzorků. Množství tukové tkáně, které by mohlo být pro testování použito, je tedy značně omezené. Dalším důvodem je nedefinované množství mesocainu v bioptické tukové tkáni, které se může mezi vzorky lišit v důsledku jeho odlišné distribuce ve tkáni a jeho použitého množství pro účely lokální anestezie. Nicméně pro protokoly, které by se osvědčily na modelových vzorcích plazmy s mesocainem, bylo v plánu vyzkoušet i na vzorcích tukové tkáně.

V rámci této diplomové práce nebyl nalezen protokol, který by odstranil mesocain z modelových vzorků. Jako nejlepší byl vyhodnocen iST protokol podle nejvyšší účinnosti odstranění mesocainu ze vzorku, nejvyšší peptidové výtěžnosti a nejmenší časové náročnosti.

6 ZÁVĚR

V rámci teoretické části diplomové práce byly shrnuty poznatky o amyloidóze, vzácném onemocnění, které je charakterizované ukládáním patologických proteinů ve tkáních, což následně vede k poškození a selhání orgánů. Dále byly uvedeny různé typy amyloidózy a laboratorní metody používané k průkazu amyloidu a jeho typizaci.

V rámci praktické části diplomové práce bylo cílem nalézt vhodný protokol pro přípravu proteomických vzorků z tukové tkáně, který by odstranil kontaminaci mesocainem. K tomuto účelu byly připraveny modelové vzorky plazmy s mesocainem, na kterých byly vyzkoušeny čtyři protokoly pro přípravu proteomických vzorků: A-iST, iST, SP3 a FASP. Všechny čtyři testované protokoly vykazovaly srovnatelné a reprodukovatelné výsledky pro pět sledovaných parametrů (procentuální peptidový výtěžek, počet identifikovaných proteinů a peptidů, průměrné sekvenční pokrytí proteinů, relativní distribuce peptidů s vynechanými štěpnými místy po enzymovém štěpení). Avšak protokol, který by úplně odstranil mesocain ze vzorku, se nepodařilo nalézt. Do budoucna by bylo vhodné provést další studie s cílem najít vhodné řešení externí kontaminace lokálními anestetiky u proteomických vzorků, aby nedocházelo k ovlivnění zpracování vzorku a LC-MS analýzy.

7 LITERATURA

- Bajpai, M. (2018). Peripheral variant of calcifying epithelial odontogenic tumor with clear cell changes: An enigma. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 61(2), 290–291. https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_679_17
- Benson, M. D., Berk, J. L., Dispenzieri, A., Damy, T., Gillmore, J. D., Hazenberg, B. P., Lavatelli, F., Picken, M. M., Röcken, C., Schönland, S., Ueda, M., & Westermarck, P. (2022). Tissue biopsy for the diagnosis of amyloidosis: experience from some centres. *Amyloid*, 29(1), 8–13. <https://doi.org/10.1080/13506129.2021.1994386>
- Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Eisenberg, D. S., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., Sekijima, Y., Sipe, J. D., & Westermarck, P. (2020). Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid*, 27(4), 217–222. <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>
- Buxbaum, J. N., Dispenzieri, A., Eisenberg, D. S., Fändrich, M., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., Sekijima, Y., & Westermarck, P. (2022). Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. *Amyloid*, 29(4), 213–219. <https://doi.org/10.1080/13506129.2022.2147636>
- Canetti, D., Rendell, N. B., Gilbertson, J. A., Botcher, N., Nocerino, P., Blanco, A., Di Vagno, L., Rowczenio, D., Verona, G., Mangione, P. P., Bellotti, V., Hawkins, P. N., Gillmore, J. D., & Taylor, G. W. (2020). Diagnostic amyloid proteomics: experience of the UK National Amyloidosis Centre. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 58(6), 948–957. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-1007>
- Coelho, T., Inês, M., Conceição, I., Soares, M., de Carvalho, M., & Costa, J. (2018). Natural history and survival in stage 1 Val30Met transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*, 91(21), 1. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006543>
- Connors, L. H., Sam, F., Skinner, M., Salinaro, F., Sun, F., Ruberg, F. L., Berk, J. L., & Seldin, D. C. (2016). Heart Failure Resulting From Age-Related Cardiac Amyloid Disease Associated With Wild-Type Transthyretin. *Circulation*, 133(3), 282–284. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018852>
- Cornes, M. P. (2016). Exogenous sample contamination. Sources and interference. *Clinical Biochemistry*, 49(18), 1340–1345. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.09.014>
- Dasari, S., Theis, J. D., Vrana, J. A., Rech, K. L., Dao, L. N., Howard, M. T., Dispenzieri, A., Gertz, M. A., Hasadsri, L., Highsmith, W. E., Kurtin, P. J., & McPhail, E. D. (2020). Amyloid Typing by Mass Spectrometry in Clinical Practice: a Comprehensive Review of 16,175 Samples. *Mayo Clinic Proceedings*, 95(9), 1852–1864. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.06.029>
- Desport, E., Bridoux, F., Sirac, C., Delbes, S., Bender, S., Fernandez, B., Quellard, N., Lacombe, C., Goujon, J.-M., Lavergne, D., Abraham, J., Touchard, G., Femand, J.-P., & Jaccard, A. (2012). AL Amyloidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-54>
- Dogan, A. (2017). Amyloidosis: Insights from Proteomics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 12(1), 277–304. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100200>
- Emdin, M., Morfino, P., Crosta, L., Aimo, A., Vergaro, G., & Castiglione, V. (2023). Monoclonal antibodies and amyloid removal as a therapeutic strategy for cardiac amyloidosis. *European Heart Journal Supplements*, 25(Supplement_B), B79–B84. <https://doi.org/10.1093/eurheartjsupp/suad079>
- Feist, P., & Hummon, A. (2015). Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 3537–3563. <https://doi.org/10.3390/ijms16023537>
- Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., Jaroniec, C. P., Wang, L., Ladizhansky, V., Müller, S. A., MacPhee, C. E., Waudby, C. A., Mott, H. R., De Simone, A., Knowles, T. P. J., Saibil, H. R., Vendruscolo, M., Orlova, E. V., Griffin, R. G., et al. (2013). Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid

- fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), 5468–5473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219476110>
- Frankenfield, A. M., Ni, J., Ahmed, M., & Hao, L. (2022). Protein Contaminants Matter: Building Universal Protein Contaminant Libraries for DDA and DIA Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 21(9), 2104–2113. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00145>
- Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B., & Lehane, M. (2013). Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta*, (15), 104–122. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.048>
- Holub, D., Flodrova, P., Pika, T., Flodr, P., Hajduch, M., & Dzubak, P. (2019). Mass Spectrometry Amyloid Typing Is Reproducible across Multiple Organ Sites. *BioMed Research International*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/3689091>
- Hughes, C. S., Moggridge, S., Müller, T., Sorensen, P. H., Morin, G. B., & Krijgsveld, J. (2019). Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nature Protocols*, 14(1), 68–85. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0082-x>
- Katikireddy, K. R., & O’Sullivan, F. (2011). Immunohistochemical and Immunofluorescence Procedures for Protein Analysis. *Gene Expression Profiling*, (784), 155–167. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-289-2_11
- Klaips, C. L., Jayaraj, G. G., & Hartl, F. U. (2018). Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 51–63. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709072>
- Kulak, N. A., Pichler, G., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nature Methods*, 11(3), 319–324. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2834>
- Kyoto University Bioinformatics Center. (b. r.). *ENZYME: 1.11.1.7*. GenomeNet. Retrieved February 15, 2024, from https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?enzyme+1.11.1.7
- Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., Singru, P. S., Nilsson, K. P. R., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., & Riek, R. (2009). Functional Amyloids As Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science*, 325(5938), 328–332. <https://doi.org/10.1126/science.1173155>
- Mayr, A.-L., Hummel, K., Leitsch, D., & Razzazi-Fazeli, E. (2024). V Comparison of Bottom-Up Proteomic Sample Preparation Methods for the Human Parasite *Trichomonas vaginalis*. *ACS Omega*, 9(8), 9782–9791. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10040>
- Mikulášek, K., Konečná, H., Potěšil, D., Holánková, R., Havliš, J., & Zdráhal, Z. (2021). SP3 Protocol for Proteomic Plant Sample Preparation Prior LC-MS/MS. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635550>
- Moggridge, S., Sorensen, P. H., Morin, G. B., & Hughes, C. S. (2018). Extending the Compatibility of the SP3 Paramagnetic Bead Processing Approach for Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 17(4), 1730–1740. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00913>
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 13932, Mesocaine. Retrieved March 4, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mesocaine>.
- Olmos-Martínez, J. M., Mazorra, R., Magadán, C., Martín, L., & Crespo, J. (2017). AA Amyloidosis Associated with Jugular Paraganglioma as a Rare Cause of Chronic Diarrhea. *ACG Case Reports Journal*, 4(1), 1–3. <https://doi.org/10.14309/crj.2017.100>
- Orłowska, A., Mastalerek, J., Jaskólska, M., Rzepakowska, A., Grzybowski, J., Gotlib, T., & Niemczyk, K. (2019). Head and neck amyloidosis – a report on five cases. *Polski Przegląd Otorynolaryngologiczny*, 8(2), 32–37. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.1929>
- Otzen, D., & Riek, R. (2019). Functional Amyloids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(12), 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033860>
- Palladini, G., Riva, E., Basset, M., Russo, F., Milani, P., Pasquinucci, E., Foli, A., Lavatelli, F., Nuvolone, M., Casarini, S., Obici, L., & Merlini, G. (2017). Prognostication of survival and progression to dialysis in AA amyloidosis. *Amyloid*, 24(sup1), 136. <https://doi.org/10.1080/13506129.2017.1289917>
- Pika, T., Heřmanová, Z., & Flodrová, P. (2017). Laboratorní aspekty systémové AA amyloidózy. *Klinická biochemie a metabolismus*, 25(46), 56–58.

- Pinney, J. H., & Hawkins, P. N. (2012). Amyloidosis. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 49(3), 229–241. <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011225>
- Promega. (c2023). *Protease Digestion for Mass Spectrometry*. Promega. Retrieved March 17, 2023, from <https://worldwide.promega.com/resources/guides/protein-analysis/protease-digestion-for-mass-spec/>
- Ravichandran, S., Lachmann, H. J., & Wechalekar, A. D. (2020). Epidemiologic and Survival Trends in Amyloidosis, 1987–2019. *New England Journal of Medicine*, 382(16), 1567–1568. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1917321>
- Rezk, T., Gilbertson, J. A., Mangione, P. P., Rowczenio, D., Rendell, N. B., Canetti, D., Lachmann, H. J., Wechalekar, A. D., Bass, P., Hawkins, P. N., Bellotti, V., Taylor, G. W., & Gillmore, J. D. (2019). The complementary role of histology and proteomics for diagnosis and typing of systemic amyloidosis. *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 5(3), 145–153. <https://doi.org/10.1002/cjp2.126>
- Richards, D. B., Cookson, L. M., Berges, A. C., Barton, S. V., Lane, T., Ritter, J. M., Fontana, M., Moon, J. C., Pinzani, M., Gillmore, J. D., Hawkins, P. N., & Pepys, M. B. (2015). Therapeutic Clearance of Amyloid by Antibodies to Serum Amyloid P Component. *New England Journal of Medicine*, 373(12), 1106–1114. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504942>
- Sethi, S., Vrana, J. A., Theis, J. D., Leung, N., Sethi, A., Nasr, S. H., Fervenza, F. C., Cornell, L. D., Fidler, M. E., & Dogan, A. (2012). Laser microdissection and mass spectrometry–based proteomics aids the diagnosis and typing of renal amyloidosis. *Kidney International*, 82(2), 226–234. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.108>
- SIB Swiss Institute of Bioinformatics. (b. r.). *ENZYME entry: EC 3.4.21.4*. Expasy. Retrieved February 15, 2024, from <https://enzyme.expasy.org/EC/3.4.21.4>
- Sielaff, M., Kuharev, J., Bohn, T., Hahlbrock, J., Bopp, T., Tenzer, S., & Distler, U. (2017). Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. *Journal of Proteome Research*, 16(11), 4060–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00433>
- Sigma-Aldrich. (c2014). *TECHNICAL BULLETIN: Endoproteinase Lys-C from Lysobacter enzymogenes suitable for Protein Sequencing*. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/217/458/p3428bul.pdf>
- Simons, J. P., Al-Shawi, R., Ellmerich, S., Speck, I., Aslam, S., Hutchinson, W. L., Mangione, P. P., Disterer, P., Gilbertson, J. A., Hunt, T., Millar, D. J., Minogue, S., Bodin, K., Pepys, M. B., & Hawkins, P. N. (2013). Pathogenetic mechanisms of amyloid A amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40), 16115–16120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306621110>
- Stroo, E., Koopman, M., Nollen, E. A. A., & Mata-Cabana, A. (2017). Cellular Regulation of Amyloid Formation in Aging and Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 11(64), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00064>
- Taylor, A., & McLeod, G. (2020). Basic pharmacology of local anaesthetics. *BJA Education*, 20(2), 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.bjae.2019.10.002>
- Teng, C., Li, P., Bae, J. Y., Pan, S., Dixon, R. A. F., & Liu, Q. (2020). Diagnosis and treatment of transthyretin-related amyloidosis cardiomyopathy. *Clinical Cardiology*, 43(11), 1223–1231. <https://doi.org/10.1002/clc.23434>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (c2006–2023). *Mass Spectrometry Grade Proteases: Catalog number: 90051*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/90051>
- Varnavides, G., Madern, M., Anrather, D., Hartl, N., Reiter, W., & Hartl, M. (2022). In Search of a Universal Method: A Comparative Survey of Bottom-Up Proteomics Sample Preparation Methods. *Journal of Proteome Research*, 21(10), 2397–2411. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00265>

- Vrana, J. A., Theis, J. D., Dasari, S., Mereuta, O. M., Dispenzieri, A., Zeldenrust, S. R., Gertz, M. A., Kurtin, P. J., Grogg, K. L., & Dogan, A. (2014). Clinical diagnosis and typing of systemic amyloidosis in subcutaneous fat aspirates by mass spectrometryrometry-based proteomics. *Haematologica*, *99*(7), 1239–1247. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.102764>
- Zhang, X., Sadowski, P., & Punyadeera, C. (2020). Evaluation of sample preparation methods for label-free quantitative profiling of salivary proteome. *Journal of Proteomics*, *210*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103532>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ ZKRATEK

A	amyloidní fibrilární protein (protein A)
AA	amyloidóza odvozená od sérového amyloidu A
ACN	acetonitril
AGC	Automatic Gain Control
A-iST	protokol s proteinovou precipitací acetonem s následným zpracováním pomocí iST protokolu
ANS	autonomní nervová soustava
apoAI	apolipoprotein A-I
apoAIV	apolipoprotein A-IV
apoE	apolipoprotein E
BCA	bicinchoninová metoda
BSA	hovězí sérový albumin
C18	silica s navázanými oktadecyly
CAA	2-chloroacetamid
CID	kolizně indukované disociace – „Collision-Induced Dissociation“
CNS	centrální nervová soustava
DB	pufr pro štěpení – „digest buffer“
dH ₂ O	demineralizovaná voda
DTT	dithiothreitol
ESI	ionizace elektrosprejem – „Electrospray Ionization“
EtAc	ethylacetát
FASP	„filter-aided sample preparation“ protokol – protokol pro štěpení proteinů na filtru
FDR	korekce typu „false-discovery rate“
FFPE	fixovaný formalínem zalitý parafínem
h	dědičný – „hereditary“
HCD	vysokoenergetická kolizní disociace – „Higher-Energy Collisional Dissociation“
HCl	kyselina chlorovodíková
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou – „High-density lipoprotein“
IAA	iodoacetamid
Ig LC	imunoglobulinové lehké řetězce – „immunoglobulin light chains“

IgG	imunoglobuliny typu G
Ins	insulin
iST	„in StageTip“ protokol – protokol pro štěpení proteinů ve špičce
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
Lys-C	lysozym C (EC 3.4.21.50)
m/z	poměr hmotnosti iontu ku jeho náboji
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NaOH	hydroxid sodný
NH ₄ OH	hydroxid amonný
p.	prekurzor
p-mel	melanocytární protein
PNS	periferní nervová soustava
SAA	sérový amyloid A
SDB-RPS	styren-divinylbenzenový kopolymer na membránovém extrakčním disku
SDC	deoxycholát sodný
SDS	dodecylsulfát sodný
SP3	„single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation“ protokol – protokol pro štěpení proteinů na paramagnetických kuličkách
TCEP	tris(2-carboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TFA	kyselina trifluoroctová Tris 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TTR	transthyretin
UA	kyselina močová – „uric acid“
UIP	univerzální indikátorový papírek
v	varianta – „variant“
wt	nativní, nemutovaný typ proteinu – „wild type“