

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Identifikace molekulárních cílů protinádorových léčiv afinitní
purifikací**

**Identification of molecular targets for anticancer drugs by affinity
purification**

Diplomová práce

Bc. Barbora Pastorková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: MUDr. Petr Džubák, Ph.D.

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vykonala samostatně s pomocí vedoucího práce.

V Olomouci dne 2. 5. 2014

Souhrn

Identifikace molekulárních cílů je velmi důležitá pro zjištění mechanismu účinku daného léčiva. Afinitní purifikace s jejími různými variantami je nejvíce používaná metoda při izolaci a identifikaci molekulárních cílů jak přírodních bioaktivních látek, tak farmaceuticky syntetizovaných léčiv.

Cílem této práce byla identifikace molekulárních cílů protinádorových léčiv konkrétně indazolových derivátů, které mají vliv na buněčný cyklus a jsou významné díky své antiproliferativní a apoptotické aktivitě. Molekulární cíl těchto látek byl testován na suspenzní buněčné linii odvozené od akutní T-lymfoblastické leukémie CCRF-CEM, která byla značená pomocí lehkých a těžkých izotopů uhlíku tzv. SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture), metodou afinitní purifikace, která spočívá v zachycení cílových proteinů na afinitní matici, eluci těchto proteinů, jejich digesce a identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie.

Při identifikaci molekulárních cílů byly využity dvě strategie afinitní purifikace. První probíhala bez kompetice a druhá s kompeticí o volnou testovanou látku. V průběhu testování docházelo zároveň k optimalizaci metody, čili došlo k mnoha větším či menším úpravám v postupu. Byly využity dva druhy mobilní afinitní matrice: magnetické a agarózové kuličky. Použity byly dva typy trypsinové digesce proteinů a to digesce v roztoku a digesce v gelu. Peptidy byly přečišťovány pomocí Macro Trap kolony nebo reverzní fáze C18 ve špičkách. Při hmotnostní spektrometrii byly aplikovány dva druhy ionizace peptidů: MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) - matricí asistovaná laserová ionizace a ESI (electrospray ionization) - ionizace pomocí elektrospereje a dva typy hmotnostních analyzátorů: analyzátor doby letu TOF (time of flight) a nebo kombinace lineární iontové pasti a Orbitrapu.

Summary

The identification of molecular targets is very important to determine the mechanism of action of the drug. Affinity purification with its various alternatives is the most used method for the isolation and identification of molecular targets as natural bioactive small molecules and pharmaceutically synthesized drugs.

The aim of this work was to identify molecular targets anticancer drugs specifically indazole derivatives which have an effect on the cell cycle and are important because of their antiproliferative and apoptotic activity. Molecular target of these compounds was tested on a suspension cell line derived from acute T - lymphoblastic leukemia CCRF-CEM which was labeled by stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). Affinity purification method, which consists of capturing of the target protein to an affinity matrix; the elution of the proteins, their digestion and identification by mass spectrometry was used.

Two strategies of affinity purification have been used for identification of molecular targets. The first was carried out without competition, and the second one with competition for the free small molecule. During the testing process, the procedure was optimized. Therefore there have been many small or large changes in the procedure. They were used two types of mobile affinity matrix: a magnetic and agarose beads. Two types of tryptic digestion of proteins were used: digestion in solution and digestion in gel. Peptides were purified, using Macro Trap column or a reverse phase C18 in the tips. In mass spectrometry were applied to two types of ionization of peptides: matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and electrospray ionization (ESI). Combination of two types of mass analyzers was used: time of flight analyzer TOF and a combination of linear ion trap and Orbitrap.

Poděkování

Děkuji panu MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D. za vedení diplomové práce, Mgr. Gabriele Rylové za vedení při experimentální části diplomové práce a dále Mgr. Dušanu Holubovi a Mgr. Janě Václavkové za pomoc při práci s hmotnostní spektrometrií.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav řešené problematiky.....	11
2.1	Chemická genetika.....	11
2.1.1	Metody založené na expresním klonování.....	11
2.1.1.1	Kvasinkový trihybridní systém.....	12
2.1.1.2	Fágový display.....	15
2.2	Chemická proteomika.....	16
2.2.1	Mikročipy.....	20
2.2.2	Metoda DARTS.....	22
2.2.3	Afinitní purifikace.....	23
2.2.3.1	Rozlišení specificky a nespecificky vázajících se proteinů.....	25
2.2.3.2	Afinitní matrice.....	25
2.2.3.2.1	Typy afinitních matic.....	26
2.2.3.3	Fotochemické techniky.....	28
2.2.3.4	Látky pronikající do buněk.....	30
2.2.3.5	Vychytávání specifických tříd proteinů.....	32
2.2.4	Hmotnostní spektrometrie.....	34
2.3	Indazolové deriváty.....	36
3	Cíl práce.....	38
4	Materiál a metodika.....	39
4.1	Materiál.....	39
4.1.1	Biologický materiál.....	39
4.1.2	Chemikálie.....	39
4.1.3	Pufry.....	41
4.1.4	Přístroje a laboratorní vybavení.....	41
4.2	Metodika.....	42

4.2.1	SILAC a afinitní purifikace	42
4.2.1.1	Kultivace nádorových buněk CCRF-CEM se značením SILAC.....	45
4.2.1.2	Příprava proteinových lyzátů z nádorových buněk CCRF-CEM.....	46
4.2.1.3	Měření koncentrace proteinů pomocí BCA (bicinchoninic acid)	46
4.2.1.4	Afinitní purifikace bez využití kompetice.....	47
4.2.1.5	Afinitní purifikace s využitím kompetice.....	48
4.2.2	Digesce a příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii.....	49
4.2.2.1	Digesce v roztoku.....	50
4.2.2.2	Digesce v gelu.....	50
4.2.2.3	Přečišťování pomocí kolony Macro Trap	52
4.2.2.4	Přečišťování pomocí reverzní fáze C18 ve špičkách	53
4.2.3	Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie.....	54
4.2.3.1	Analýza HPLC/MS-MALDI TOF/TOF	54
4.2.3.2	Analýza UHPLC/MS-ESI Orbitrap	56
5	Výsledky.....	58
6	Diskuze	72
7	Závěr	75
8	Seznam použitých zkratk	77
9	Literatura.....	80

1 Úvod

Odedávna se bioaktivní molekuly používají k ovlivnění buněčných drah. Dříve tyto molekuly vycházely z přírodních zdrojů, nicméně dnes je snaha vyvinout syntetické molekuly, u kterých je možné garantovat jejich kvalitu, dostupnost a nezávislost na přírodních zdrojích. Klíčovým bodem ve vývoji léčiva je identifikace mechanismu účinku a dle cíle možnost optimalizace testované molekuly.

Jednou z metod, která může přispět k identifikaci molekulárních cílů je afinitní purifikace. Tato metoda spočívá v selektivním vyvázání molekulárního cíle na imobilizovanou cílovou molekulu, což se provádí vysycením kolony s navázanou molekulou buněčným lyzátem. Následuje důkladné odmyváání nesespecificky navázaných proteinů, které v ideálním případě vede k získání jen požadovaných cílových proteinů. Po eluci těchto proteinů z matrice je detekce provedena pomocí elektroforézy a hmotnostně spektrometrické identifikace. Afinitní purifikace je však typická tím, že se na kolonu váží jak specifické, tak nesespecifické proteiny. Naproti tomu, použitím roztoků o různé odmyvací síle mohou být odstraněny nesespecifické proteiny, ale i specifické proteiny s nízkou afinitou. Obrovský vliv na množství nesespecifických interakcí má molární poměr testované molekuly a množství proteinu. Ideálně by měl být protein v nadbytku, protože poté potenciální vazebný protein soutěží o testovanou molekulu a jsou zachyceny jen vysoce afinitní interakce. V opačném případě postačí jen nízká afinita k vazbě na protein, a pokud se tato vazba udrží i po promývání, vede to k identifikaci falešného vazebného partnera. Poté samozřejmě není možné potvrdit např. western blottingem skutečného vazebného partnera (Burdine L, 2004). Z těchto důvodů je snaha využít při identifikaci molekulárních cílů účinnější přístupy. Proto jsme se v této práci pokusili o srovnání a optimalizaci metod afinitní purifikace molekulárních cílů protinádorových léčiv (indazolových derivátů).

Pro snadnější rozlišení specifických a nesespecifických interakcí a kvantitativní analýzu mohou být proteiny značeny. Zde se využívá těžkého a lehkého značení proteinů, pomocí značených aminokyselin v médiu např. uhlíkem ^{13}C nebo deuteriem ^2H tzv. SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) (Ong SE, 2002) nebo

značení specifického místa v řetězci tzv. ICAT (isotope-coded affinity tag) (Gygi SP, 1999). Tyto metody jsou mnohem citlivější než metody vázané pouze na gel. Dalším slibným přístupem je metoda chemického síťování (cross-linking), která nevyžaduje imobilizaci látky. Kontrola důležitých experimentálních parametrů je tak snadnější. Navíc by se tento systém mohl dát využít uvnitř živých buněk, což by znamenalo obrovský průlom v identifikaci molekulárních cílů. Velkým příslibem dnešní doby jsou také metody chemické genetiky a chemické proteomiky (Burdine L, 2004), které jsou předmětem teoretické části práce.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Chemická genetika

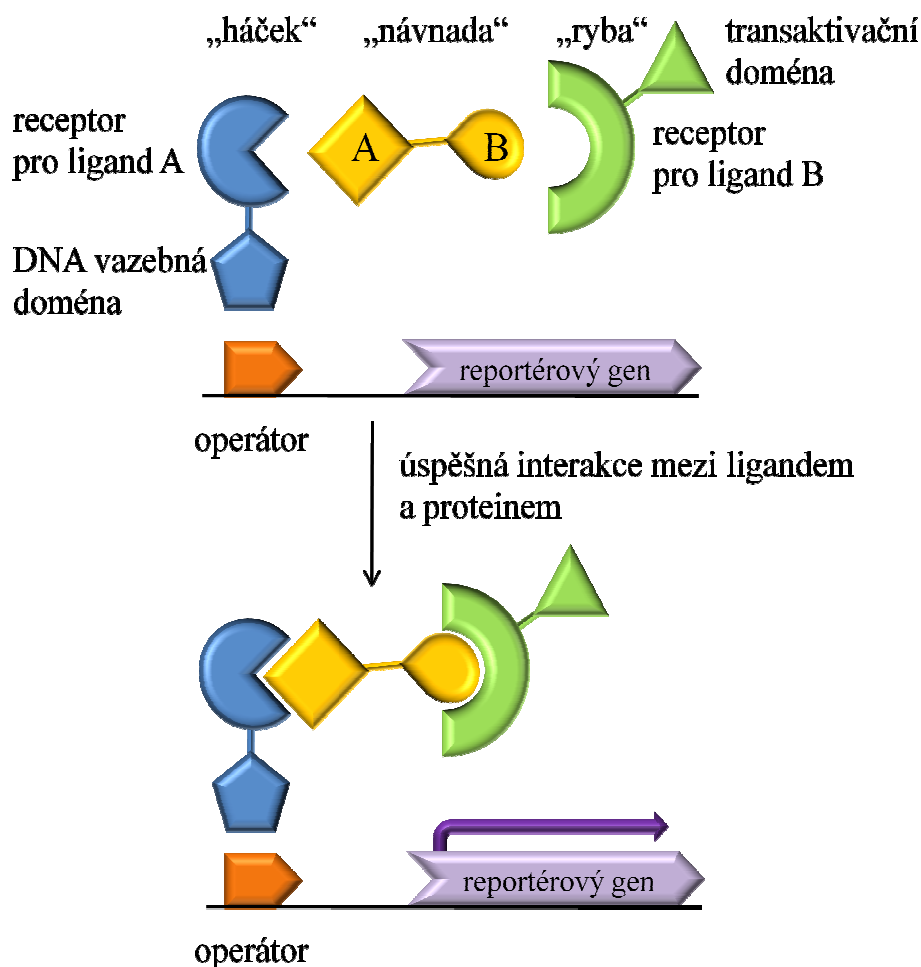
Identifikovat molekulární cíle lze pomocí různých genetických a biochemických metod. Chemická genetika spočívá ve vyřazení či potlačení funkce genu nebo uměle vyvolané nadměrné expresi studovaného genu. Předmětem studia je vliv genetické změny na testovanou látku. Kandidátní molekulární cíle jsou určeny na základě zvýšené citlivosti proteinu při určité koncentraci testované látky v důsledku snížení exprese genu nebo na základě zvýšené rezistence na testovanou látku v důsledku nadměrné exprese genu (Sleno L, 2008). Tento přístup je velmi atraktivní, jelikož spojuje fenotyp s genotypem. Chemická genetika pracuje také přímo s cílovými proteiny, které jsou získány pomocí klonování genů. Cílový protein je však produktem uměle sestaveného konstruktů, který se může a nemusí chovat stejně jako nativní protein, zejména pokud je protein fyziologicky součástí multiproteinového komplexu. Práce s DNA je však snadnější než práce s proteiny. Molekulární biologie využívá v chemické genetice geneticky modifikovatelné organizmy. Jedním z těchto geneticky modifikovatelných organismů je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která je vhodná i k testování molekulárních cílů protinádorových léčiv (Burdine L, 2004).

2.1.1 Metody založené na expresním klonování

Tyto metody obcházejí problém spojený s nedostatkem cílového proteinu tím, že je množství proteinu uměle zvýšeno. Cílové proteiny jsou rekombinantní proteiny, které jsou exprimovány z fúzních konstruktů z cDNA knihovny, jejich vlastnosti však mohou být odlišné od jejich nativního protějšku. Zejména mohou být pozměněny nebo dokonce mohou chybět posttranslační modifikace a také nemohou být vytvořeny multiproteinové komplexy, které mohou ovlivňovat vazbu nízkomolekulárních ligandů. Nicméně cDNA knihovny umožňují přímý přístup ke genům kodujícím cílové proteiny (Terstappen GC, 2007). Mezi metody založené na expresním klonování patří kvasinkový trihybridní systém a fágový display.

2.1.1.1 Kvasinkový trihybridní systém

Kvasinkový trihybridní systém využívá třech hybridních molekul k rekonstrukci transkripce reportérového genu. Skládá se z hybridních fúzních proteinů zvaných „háček“ a „ryba“ a syntetického hybridního ligandu zvaného „návnada“, viz Obr. 1. Hybridní ligand je kovalentně spojený heterodimer, složený ze dvou malých ligandů A a B. Ligand A se váže na receptor spojený s DNA vazebnou doménou, tedy na „háček“ a ligand B se váže na receptor spojený s transkripční aktivační doménou, tedy na „rybu“. Tímto spojením je spuštěna transkripce reportérového genu, umožňující selekci kvasinek obsahujících náležité receptory. Dimery syntetických ligandů, nazývané chemické induktory dimerizace, mohou být v savčích buňkách použity k indukci dimerizace nebo oligomerizace buněčných proteinů, které mají receptory pro dimerní ligandy. Fúze více kopií receptorů cílového proteinu jsou potřebné pro buněčnou odpověď. Trihybridní systém bude fungovat, pokud afinita hybridního ligandu k receptorům bude dostatečně vysoká k aktivaci reportérového genu, a za předpokladu, že budou „háček“ a „ryba“ přítomni jako fúzní hybridní proteiny (Licitra EJ, 1996).

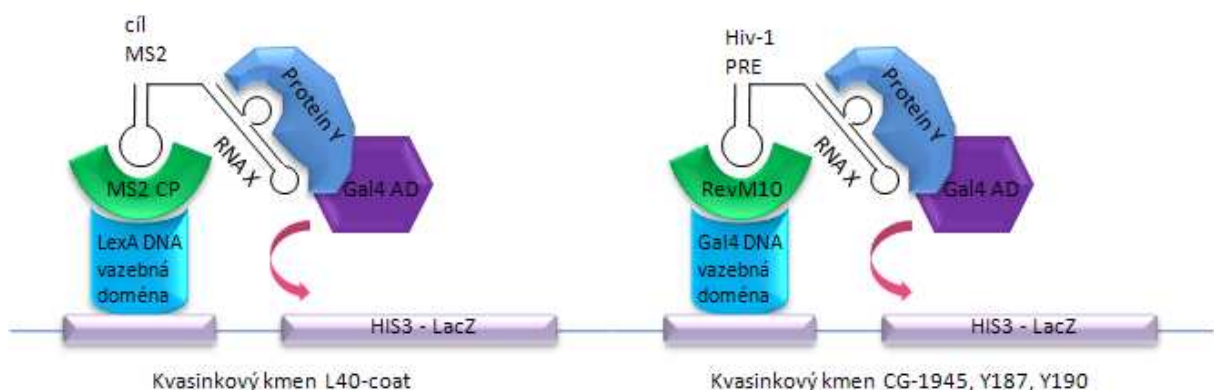


Obr. 1: Složení a mechanismus trihybridního systému

Fúzní protein zvaný „háček“ se skládá z receptoru pro ligand A a DNA vazebné domény transkripčního faktoru. Syntetický hybridní ligand tzv. „návnada“ se skládá z navzájem spojeného ligandu A a B. Fúzní protein zvaný „ryba“ se skládá z receptoru pro ligand B a transaktivační domény transkripčního faktoru. Komplex „háčku“, „návnady“ a „ryby“ vede ke spojení DNA vazebné a transaktivační domény a tím k aktivaci reportérového genu (upraveno podle Licitra EJ, 1996).

Kvasinkový trihybridní systém vysvětlený na příkladu, viz Obr. 2, spočívá v expresi tří chimerických molekul v kvasince, které jsou složeny tak, aby aktivovaly dva reportérové geny. Tento systém využívá transaktivační protein jako je Gal4p, který je schopen využít transkripční aparát a spustit transkripci genu. Skládá se z DNA vazebné a aktivační domény. Tyto domény jsou funkčně nezávislé, což znamená, že mohou být vloženy do jiných molekul. DNA vazebná doména (LexADB nebo Gal4DB) fúzuje s RNA vazebný proteinem (MS2-coat protein nebo Hiv-1 RevM10). Druhý fúzní protein obsahuje, jak Gal4 aktivační doménu (Gal4AD), tak protein našeho

zájmu Y, vážící RNA. Druhý fúzní protein je přemostěn třetí hybridní RNA molekulou obsahující vazebné místo pro první protein vážící RNA a vazebné místo X pro druhý studovaný protein vážící RNA Y. Vazbou proteinu Y do vazebného místa X je vytvořen funkční transaktivátor, který se váže do opačné aktivační sekvence dvou reportérových genů (HIS3 a LacZ) jež jsou poté transkribovány a exprimovány kvasinkou. Hladina exprese lacZ genu může být určena *in vitro* měřením β -galaktosidázové aktivity nebo *in vivo* zbarvením transformovaných kolonií na médiu obohacené o X-gal. A dále HIS3 kóduje imidazolglycerolfosfátdehydrogenázu (His3p), jejíž exprese umožňuje růst kvasinkám na médiu bez histidinu. Látka 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) je kompetitivní inhibitor His3p, a proto buňky obsahující více His3p přežijí na médiu obsahující větší koncentraci 3-AT. Tak úroveň rezistence kvasinek vůči 3-AT reflektuje hladinu exprese HIS3 a tím i sílu interakce RNA-protein v kontextu trihybridního systému, což je také možnost jak optimalizovat selektivitu vazby RNA na protein, který nás zajímá, pomocí měnící se koncentrace 3-AT v médiu (Jaeger S, 2004).



Obr. 2: Příklady trihybridního kvasinkového systému

MS2-coat protein a Hiv-1 RevM10 - RNA vazebné proteiny, LexA a Gal4 - DNA vazebné domény, RNA X – vazebné místo pro protein Y, protein Y - protein našeho zájmu, Gal4AD - aktivační doména, HIS3 a LacZ - reportérové geny (upraveno podle Jaeger S, 2004).

Navzdory určitým omezením nabízí kvasinkový trihybridní systém výhody oproti biochemickým metodám. Například izolace a identifikace cDNA receptorů ligandů. Díky snadnosti manipulace s kvasinkami je trihybridní systém ve spojení s metodami jako je náhodná mutagenese ideální pro identifikaci struktury a funkce receptorů,

zejména části, které jsou důležité pro rozpoznání ligandu. Trihybridní systém může být použit pro hledání ligandů receptorů *in vivo* jak v kvasinkách, tak v savčích buňkách. Pomocí kompetice lze najít ligand, který soutěží o receptor. Navíc díky uměle vytvořeným kombinatoriálním knihovnám malých molekul je hledání ligandu snadnější. Na rozdíl od fágového displaye se typy ligandů trihybridního systému neomezují pouze na geneticky kódované peptidy, ale mohou to být i peptidy složené z D-aminokyselin, peptidomimetika nebo jakékoliv syntetické organické sloučeniny. Ve srovnání s *in vitro* testy jsou pomocí trihybridního systému identifikované ligandy selektovány podle jejich průchodu do eukaryotických buněk a podle jejich stability v buněčném prostředí, což zvyšuje účinnost a selektivitu screeningu. Trihybridní systém má tak velký potenciál ve vývoji léčiv. (Licitra EJ, 1996).

2.1.1.2 Fágový display

Tato metoda stejně jako trihybridní systém patří k metodám založených na expresním klonování. Fágový display byl původně vyvinut k vytváření knihoven protilátek a k selekci těch, které silně váží specifický antigen. Později byl využíván k identifikaci partnerů proteinové interakce a může být také používán k identifikaci vazby léčiva na protein. Metoda spočívá v tom, že DNA sekvence z knihovny je klonována do fágového genomu, kde fúzuje s fágovým genem pro plášťový protein, díky čemuž je pak potenciální cílový protein zobrazen na povrchu fága (Terstappen GC, 2007). Takto připravená fágová knihovna je inkubovaná s imobilizovanou testovanou látkou. Fágové, kteří exprimují cílový protein jsou navázáni na imobilizovanou látku, zatímco ostatní jsou odmyti. Specificky navázaní fágové jsou eluovány a amplifikovány v hostitelské bakteriální buňce. Populace amplifikovaných fágů je bohatá na ty, kteří prezentují na svém povrchu proteiny vázající testované látky. Po několika opakujících se cyklech, kdy vykazují fágové vysokou afinitu k testované látce, mohou být izolovány individuální klony. V této fázi je fágová DNA izolovaná, sekvenovaná a je identifikován cílový protein pomocí vyhledávání podobnosti sekvencí (Saxena C, 2009).

V současnosti byl fágový display úspěšně použit při identifikaci vazby Ca^{2+} -kalmodulin jako cíl derivátu kurkuminu, což je inhibitor proliferace v různých lidských rakovinných buňkách.

Významnou výhodou této metody je to, že dokáže identifikovat cíle v malém množství a s nízkou afinitou a to díky amplifikačnímu kroku. Hodnocení výsledků zpočátku afinitní selekce může být vhodné pro identifikaci dalších vazebných proteinů, což obvykle není možné na konci selekce, jelikož převládají klony, které exprimují vysoce afinitní proteiny. Z toho důvodu proteiny, které měly menší zastoupení, jsou po několika cyklech afinitní selekce eliminovány (Terstappen GC, 2007).

2.2 Chemická proteomika

Zatímco chemická genetika pracuje s cílovými proteiny, které jsou získány pomocí klonování genů a jsou tak produktem uměle sestaveného konstruktů (Burdine L, 2004), tak chemická proteomika pracuje s nativními proteiny, které jsou získány z buněčných lyzátů. Analýza je pak objektivnější a je provedena v rozsahu celého proteomu (Rix U, 2009).

Základním cílem chemické proteomiky je identifikovat cílové proteiny bioaktivních molekul a to pak aplikovat při vývoji léčiv. Tato multidisciplinární věda spojuje technologie z různých oborů chemie, biochemie, biologie, strukturní biologie, proteomiky a informatiky. Takto integrovaná strategie může poskytnout informace o cílovém proteinu a jeho vazebném místě pro bioaktivní molekuly, což je důležitý výchozí bod při vývoji screeningového systému léčiv založeném na struktuře cílového proteinu.

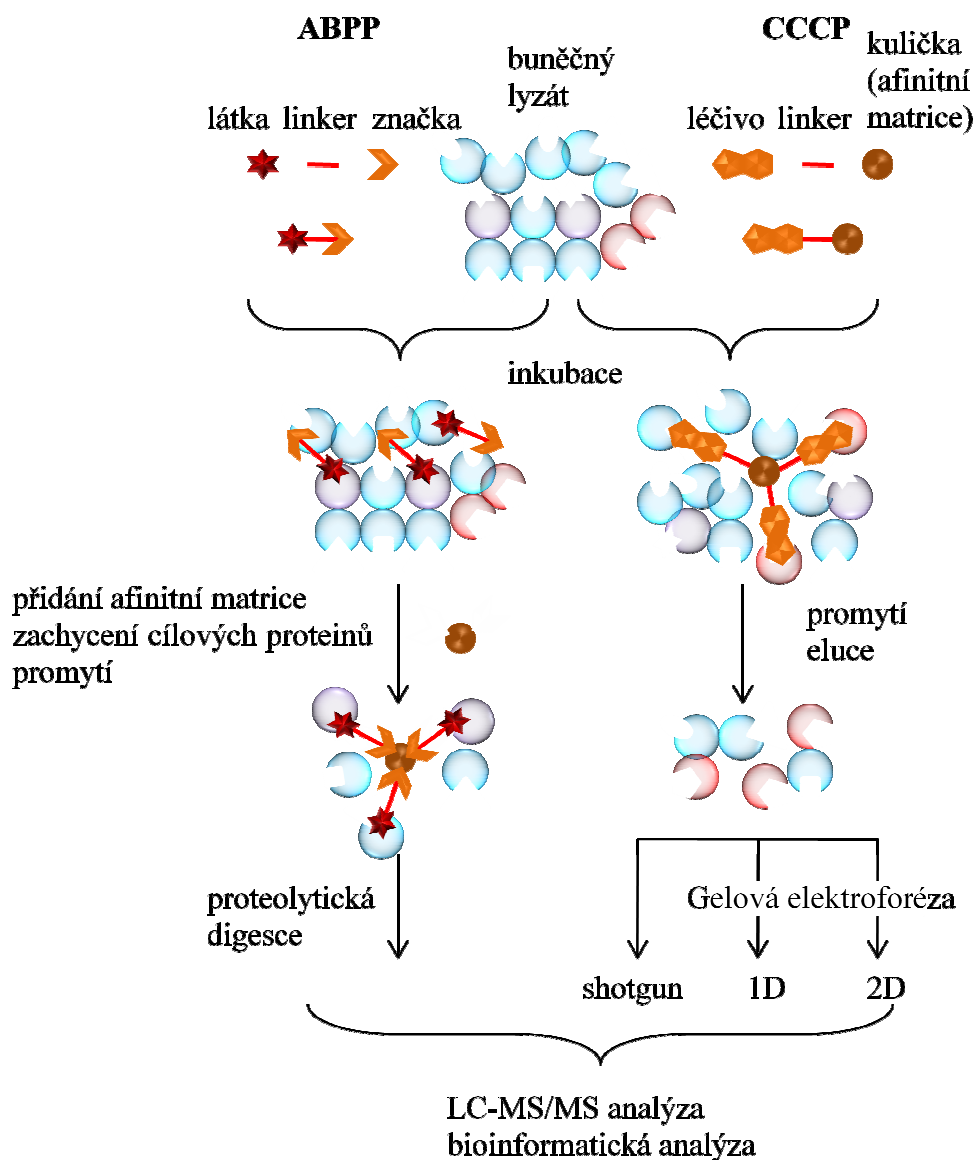
Transdukce signálních drah vedoucích k chorobnému stavu je často využívána již v prvním kroku vývoje léčiv. Porozumění signálním drahám a mapování jejich signálních molekul poskytuje informace o tom, jak jsou v nemoci buňky, orgány a tělo abnormálně kontrolovány, což má obrovský dopad v terapeutických přístupech léčby téměř každé lidské choroby.

Pro objasnění biologické aktivity je nutné znát strukturu cílové molekuly a vazebné místo, kde dochází k interakci ligandu. Podobně mohou být rozpoznány interakce bioaktivní molekuly s původně necílenými („off-target“) proteiny, které mohou být zodpovědné za nežádoucí účinky léčiva (Han SY, 2007). Například pyrido[2,3-*d*]pyrimidiny byly původně vyvinuty jako látky působící proti proliferaci zacíleny na tyrosin kinázu, která je spojena s rakovinou (Panek RL, 1997). Místo toho se ukázalo, že inhibují několik serin/treonin kináz, což poskytlo nový pohled na

jejich buněčný účinek. Nacházíme tak nový význam, pozici, profilování a směr daného léčiva (Ashburn TT, 2004).

Díky významným pokrokům v oborech strukturní biologie, hmotnostní spektrometrie, X-ray krystalografie a informatiky se stává vývoj léčiv založených na znalosti struktury cílové molekuly převažujícím proudem vývoje (Blundell TL, 2002). V současné době jsou ke screeningu a hodnocení interakce biologicky aktivních sloučenin používány dvě rámcové metody založené na hmotnostní spektrometrii: funkční a afinitní. Funkční přístup je založený na měření účinku ligandu na biologickou aktivitu cílového proteinu. V afinitním přístupu jsou ligandy posuzovány a selektovány k dalšímu vývoji na základě jejich vazebné afinity k cílové molekule (Deng G, 2006).

V případě chemické proteomiky existují dva základní přístupy v identifikaci cílové molekuly: I) chemická proteomika zabývající se profilováním na základě aktivity interakce mezi testovanou látkou a proteinem ABPP (aktivity-based probe profiling) a II) chemická proteomika zaměřená na testovanou látku CCCP (compound-centric chemie proteomics). ABPP obecně spočívá v selektivní identifikaci aktivity enzymu, kdy se funkční skupiny ligandu kovalentně váží do enzymaticky aktivního místa cílového proteinu. Próba pro ABPP se skládá ze tří hlavních částí. První část je reaktivní funkční skupina, která má vysokou afinitu k aktivnímu místu cílového proteinu. Druhou částí je spojovací linker, což je obvykle hydrofilní polyetylenglykolový řetězec, který odděluje funkční skupinu a značku. Třetí částí je značka, což je např. biotin, který se váže na streptavidinem pokrytou afinitní matici a slouží k tomu, aby mohla proběhnout afinitní purifikace. Takto připravená molekula je inkubována s buněčným lyzátem, cílový protein je zachycen na afinitní matici. Následuje trypsinová digesce a analýza na hmotnostním spektrometru, popřípadě bioinformatická analýza. Při CCCP je testovaná látka, jejíž aktivita je obvykle známa, chemicky konjugovaná na inertní biokompatibilní matici tak, aby nebyla narušena její aktivita. Komplex je inkubován v dalším kroku s buněčným lyzátem. Zachycené proteiny jsou eluovány a dále frakcionovány pomocí SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nebo jinou na gelu nezávislou metodou. Následuje trypsinová digesce a poté je postup stejný jako při ABPP, viz Obr. 3. (Böttcher T, 2010; Rix U, 2009; Sakamoto S, 2012).



Obr. 3: Porovnání přístupů chemické proteomiky

Porovnání přístupu chemické proteomiky zabývající se profilováním na základě aktivity interakce mezi testovanou látkou a proteinem ABPP (activity-based probe profiling) a přístupem chemické proteomiky zaměřeného na testovanou látku CCCP (compound-centric chemical proteomics) (upraveno podle Rix U, 2009).

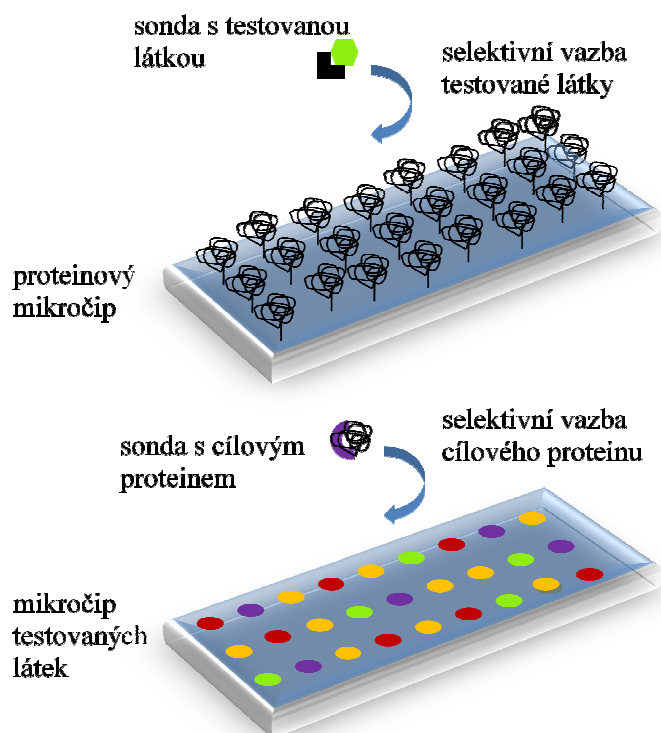
Na rozdíl od klasických technik, kde jsou používány rekombinantní proteiny, má chemická proteomika tu výhodu, že se jedná o proteiny nativní, získané z buněčného lyzátu. Vyskytují se v přirozeném buněčném prostředí, kde je přirozená hladina exprese a kompetice. Vyskytují se zde také přirození vazební partneři, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a endogenní ligandy, nehledě na to, že zůstávají přítomné post-translační modifikace jako je např. fosforylace, glykosylace,

ubikvitinylace a další. Testování není tedy omezeno pouze na rekombinantní proteiny, ale je k dispozici celý proteom nebo jeho definovaná část. Chemická proteomika pracuje s libovolnými buněčnými typy, tkáněmi či druhy organismů jako je člověk, zvíře, rostlina či mikroorganismus.

Nevýhodou je relativně vysoká spotřeba buněčného materiálu, nicméně záleží na typu buněk a na metodice. Je třeba také mít na paměti, že žádnou lyzační metodou nemůžeme získat ve 100 % reprodukovatelné složení proteinové směsi. Dalším požadavkem je, aby proteiny byly rozpuštěny, zejména membránové proteiny. Když se některé proteiny vyskytují ve velkém, řádově vyšším množství než je přítomný cílový protein nebo je ve vzorku velké množství hydrofobních anebo nabitých proteinů, dochází často k falešné pozitivitě identifikace cílů. Tento problém se však dá vyřešit tak, že je lyzát předem frakcionován. Dalším omezením je, že je těžko rozlišitelné, zda je vazba na protein přímá nebo nepřímá (specifická nebo nespecifická). Navíc funkční skupiny mnohých terapeuticky zajímavých molekul nejsou vhodné pro imobilizaci na matici nebo může samotná funkční skupina hrát významnou roli při vazbě testované látky na molekulární cíl. V tomto případě je vhodné syntetizovat analog daného léčiva. Pro většinu molekul, zejména těch přírodních, je těžké zavést funkční skupinu na požadované místo. Optimálním přístupem je mít molekulu ve variantách s různými funkčními skupinami pokrývajícími její strukturu. Je vždy důležité zachovat vztah mezi aktivitou a strukturou, což je problém např. při testování strukturních analogů, je však možné použít opačnou stranu. Jestliže je testovaná molekula příliš malá, zvyšuje se při imobilizaci riziko rušivých interakcí při vazbě na cílový protein. Optimální velikost sloučeniny je přinejmenším 300 Da. Identifikaci molekulárních cílů také mohou rušit metabolity, pokud mají vyšší vazebnou konstantu k cílovému proteinu než testovaná látka. To se dá vyřešit odfiltrováním abundatních proteinů nebo bioinformatickým zaměřením pouze na proteiny nesoucí potenciální vazebné místo (Rix U, 2009). V následujícím přehledu jsou uvedeny významné metody chemické proteomiky.

2.2.1 Mikročipy

Z hlediska studia interakce mezi proteinem a testovanou látkou se nabízí dvě možnosti využití mikročipů: proteinové mikročipy a mikročipy testovaných látek (Sleno L, 2008), viz Obr. 4.



Obr. 4: Mikročipové technologie pro vývoj léků

Proteinové mikročipy mají na svém povrchu navázány proteiny a po aplikaci testované látky je možné detekovat, s kterým proteinem interaguje, díky např. fluorescenčnímu značení. Mikročipy, které mají na povrchu imobilizované testované látky, interagují se studovaným purifikovaným proteinem. Obě metody slouží k identifikaci vazby mezi látkou a proteinem (upraveno podle Sleno L, 2008).

Proteinové mikročipy obsahují ve vysoké hustotě rekombinantní proteiny nebo protilátky, které jsou imobilizované na povrchu podkladového materiálu, což je obvykle sklo nebo křemík. Testovaná látka, která je označena kvůli detekci, je poté přidána na čip (Kingsmore SF, 2006). Křemík má oproti sklu tu výhodu, že se dá vazba látky na povrch selektivně monitorovat pomocí přímé ionizace na křemíku jako u MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) jen je místo organické matrice využit povrch křemíku. Tato technika umožňuje přímou analýzu neznačené testované

látky při zachování vysoké citlivosti a nízké spotřeby vzorku. Umožňuje měřit membránové a jiné těžko měřitelné proteiny (Shen Z, 2001).

Proteinové mikročipy pomáhají identifikovat molekulární cíle testovaných látek, které mají určitou aktivitu, ale mechanismus účinku není zcela jasný. Výsledná aktivita je odvozena z přímé vazby na určitý protein přítomný na mikročipu. Případně lze jejich pomocí identifikovat sekundární molekulární cíl již známého léčiva.

Významnou výhodou proteinových mikročipů je možnost testovat potenciální léčivo na mnoha proteinech najednou. Proteiny jsou přichyceny na povrch mikročipu pomocí N-terminálního konce, avšak vytvořit takový čip ze stovek až tisíců purifikovaných a správně složených proteinů není jednoduché.

Nevýhodou takového mikročipu je, že ne vždy simuluje *in vivo* interakce, jelikož test probíhá mimo biologický rámec (buňku). Mnoho proteinů existuje v buňce jako součást makromolekulárních komplexů, kde nejsou přístupny vazbě. Dalším požadavkem je, že testované látky musí být sledovatelné, většinou pomocí konjugace s radioaktivní, fluorescenční nebo biotinylovanou značkou. Značení je však další nevýhodnou proměnnou, protože může rušit interakci mezi látkou a proteinem. (Sleno L, 2008). Vazba testované látky a proteinu nemusí být detekovatelná pouze pomocí chemiluminiscence, fluorescenčního nebo radioizotopového značení, ale i pomocí metod bez značení, jakou je zobrazení pomocí povrchové plazmonové rezonance, mikroskopie atomárních sil nebo reflektrometrické interferenční spektroskopie (Bertone P, 2005).

Mikročipy s imobilizovými testovanými látkami mohou být použity pro vytipovaný protein dle našeho zájmu. Není však jednoduché vyvinout strategii pro přímé připojení různých chemických struktur na povrch čipu jako je tomu u DNA nebo proteinů. Z mnoha molekul se musí vytvořit jejich deriváty, aby mohly být připojeny na povrch mikročipu. Nicméně vytvořený mikročip představuje širokou škálu imobilizovaných látek, které váží specifický protein (Sleno L, 2008).

V některých pracích byl použitý ligandový mikročip s tisícovkami imobilizovaných molekul látek připojených řetězcem šesti uhlíků tak, aby byla zajištěna dostatečná vzdálenost od povrchu mikročipu kvůli snadné vazbě proteinu na látku. Na čip byly aplikovány proteinové lyzáty z různých zdravých i nádorových buněčných linií, následovalo značení proteinů pomocí nescifického fluorescenčního barviva k identifikaci toho, jak moc se na jakou kterou látku vázal daný protein (Molnar E,

2006). Díky tomuto způsobu může být najednou prověřeno tisíce látek, bez toho aniž bychom znali specifický proteinový cíl (Sleno L, 2008).

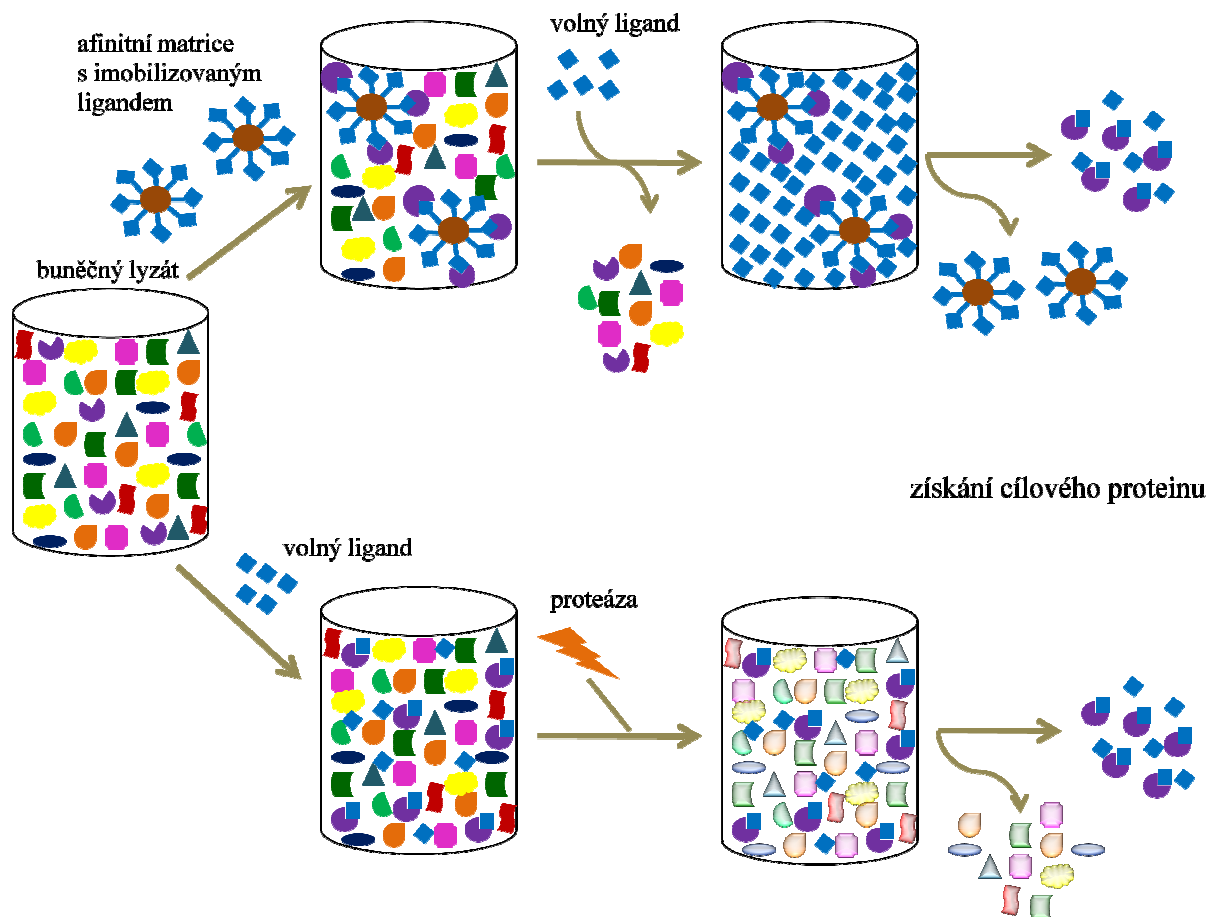
Interakce mezi látkou a proteinem jsou v současnosti přímo identifikovatelné pomocí hmotnostní spektrometrie zachycené sloučeniny CCMS (capture compound mass spectrometry) (Köster H, 2007). Látky jsou na povrch imobilizované tak, aby mohly vychytávat proteiny na základě vysoké afinity k molekulárnímu cíli. Interagující protein je pak izolován a měřen pomocí MALDI-TOF. Zkombinujeme-li mikročipy testovaných látek s identifikací molekulárních cílů pomocí hmotnostní spektrometrie, získáme strategii, kde nemusíme používat reportérové značení (Sleno L, 2008).

2.2.2 Metoda DARTS

Většina nyní používaných technologií identifikujících molekulární cíl na základě afinity vyžaduje chemickou modifikaci testované látky ovlivňující vztah mezi strukturou a aktivitou, zejména specifitu. Pro překonání tohoto nedostatku byla vyvinuta metoda DARTS (drug affinity responsive target stability). Tento proteomický přístup je založen na specifické vazbě ligandu na cílový protein, který se tím stává nepřístupný pro proteázu, není jí tedy rozštěpen.

Současné přístupy afinitní purifikace využívají tzv. pozitivní obohacení cílového proteinu pomocí selektivní akumulace na označené bioaktivní látce. Naopak metoda DARTS používá tzv. negativní obohacení pomocí rozštěpení necílových proteinů a zanechává za sebou jen hmotně větší a intenzivnější fragmenty cílových proteinů, viz Obr. 5, na základě čehož je cíl identifikován (Sakamoto S, 2012). Proveditelnost metody DARTS byla prokázána při zjišťování specifických interakcí mezi látkou FK506 a jeho cílovým proteinem FKBP12 (Lomenick B, 2011, 2009).

Klíčová výhoda metody DARTS však není pouze to, že není třeba používat chemicky modifikované bioaktivní látky a použití přirozených látek pro vazbu s různými proteiny, ale také není třeba masivního promývání a je potenciálně použitelná i pro látky s nízkou afinitou k cílovému proteinu. Stejně jako konvenční metody afinitní purifikace i při této může být limitující faktor cílový protein. Problémovým bodem metody DARTS může být citlivost proteinu k proteolýze, proto se pokud možno používají univerzální proteázy (Sakamoto S, 2012) štěpící většinu proteinů nebo i jejich směs např. pronáza (Moshe T, 1970).



Obr. 5: Porovnání afinitní purifikace a DARTS

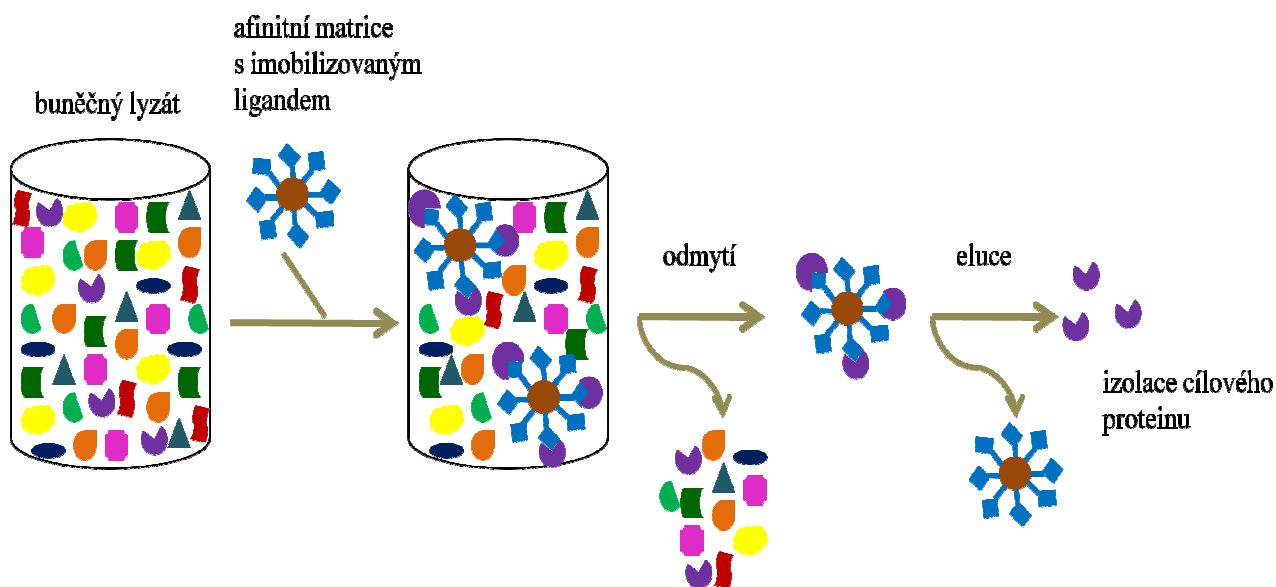
Porovnání afinitní purifikace využívající mobilní matrici a metodu DARTS. Zatímco afinitní purifikace s mobilní matricí využívá pozitivního obohacení cílového proteinu pro bioaktivní látku bez nespecifických vazeb, DARTS využívá negativní obohacení cílového proteinu za přítomnosti přirozené bioaktivní látky a proteázy (upraveno podle Sakamoto S, 2012).

2.2.3 Afinitní purifikace

Afinitní purifikace s jejími různými variantami je nejvíce používaná metoda při izolaci a identifikaci molekulárních cílů a to jak přírodních bioaktivních látek, tak i farmaceuticky syntetizovaných léčiv (Sato S, 2010). Afinitní purifikace zahrnuje imobilizaci ligandu (testované látky) na pevný povrch afinitní matrice, která je prováděna buď přímo, nebo pomocí spojujícího linkeru, který však může ovlivnit afinitu k ligandu (Saxena C, 2009). Za účelem imobilizace musí být ligandy chemicky modifikovány, a to zavedením funkčních skupin jako jsou např. primární alkoholy, aminy, karboxylové kyseliny nebo azidy (Ong SE, 2012). Chemickou modifikaci

podstupují ligandy také kvůli značení pomocí biotinu, fluoroforu, fotoreaktivní skupiny, radioizotopu nebo reaktivní skupiny. Sloučeniny s reaktivní skupinou jako je karboxylová nebo aminová skupina, jsou široce využívány pro kovalentní vazbu na matici. Ligandy, které jsou většinou přes linker biotinylovány využívají silnou afinitu k streptavidinu ukotvenému na matici.

Typický průběh afinitní purifikace je ukázán na Obr. 7. Ligand imobilizovaný na afinitní matici je inkubován s proteinovou knihovnou, což může být buněčný lyzát, následuje promývání puforem, kdy dochází k odstranění nespecificky vázajících se proteinů na matici. Poté jsou specificky navázané proteiny eluovány a to buď nadměrným množstvím volného ligandu, puforem s vysokým obsahem soli nebo denaturací proteinů. Tyto proteiny jsou pak analyzovány pomocí SDS-PAGE a po digesci enzymem jsou identifikovány hmotnostní spektrometrií. Následně je hodnocena vazebná aktivita identifikovaných proteinů s ligandem pomocí nezávislých biochemických, molekulárních a buněčných testů. Teprve po důkladné validaci nezávislými biochemickými, molekulárními a buněčnými testy jsou identifikované proteiny potvrzeny jako platný cíl ligandu (Sakamoto S, 2012).



Obr. 7: Průběh afinitní purifikace

Průběh afinitní purifikace za použití mobilní afinitní matrice. K afinitní matici je přidán buněčný lyzát. Na matici se váže cílový protein. Následuje promývání a eluce cílového proteinu (upraveno podle Sakamoto S, 2012).

2.2.3.1 Rozlišení specificky a nespecificky vázajících se proteinů

Existuje několik strategií jak rozlišit nespecificky a specificky vázající se proteiny. Prvním z nich je použití inaktivního analogu bioaktivní sloučeniny, což je chemický analog molekuly s podobnými farmakologickými vlastnostmi jako ligand. V případě biologicky aktivních přírodních látek jsou používány jejich enantiomery nebo diastereomery, ale protože mnoho z nich má chirální centrum, mohou někdy ztratit aktivitu.

Eluce pomocí denaturace proteinu je často problematická právě kvůli velkému množství nespecificky se vázajících proteinů. Se vzrůstajícím množstvím nespecifických proteinů je těžší najít specifické proteiny včetně těch cílových, proto bývá často využívána eluce na základě většího množství volného ligandu. Selektivní eluce však často závisí na rozpustnosti ligandu v roztoku. Bohužel je však většina farmaceutických ligandů hydrofobních a jsou ve vodném roztoku málo rozpustné. Řešením jsou hydrofilní organická rozpouštědla jako je DMSO (dimetylsulfoxid), ovšem za předpokladu, že nemění aktivitu ligandů.

Další možností jak rozlišit specifické a nespecifické vazby je kompetitivní inhibice vazby ligandem. Afinity matrice je inkubována s buněčným lyzátem, který byl před-inkubován s nadbytkem volného ligandu. S vyšší pravděpodobností pak získáme cílový protein. Tento přístup má však stejný problém jako selekční eluce. Pokud je ligand málo rozpustný ve vodě je obtížné najít cílový protein na základě kompetice (Sakamoto S, 2012).

Další přístup v rozlišení specifických a nespecifických vazeb spočívá v tom, že je buněčný lyzát smíchán s afinitní matricí, na které je navázán ligand. Afinity matrice je následně odstraněna a ten samý lyzát je inkubován s novou afinitní matricí s navázaným ligandem. Obě afinitní matrice zachytí stejné množství nespecifického proteinu, ale první obsahuje více specificky vázaného proteinu, u druhé je již vychytán (Yamamoto K, 2006).

2.2.3.2 Afinitní matrice

Důkladné porozumění struktuře biologicky aktivní látky je důležité při hledání vhodného ligandu. Ligand by měl být při afinitní purifikaci imobilizován na afinitní matrici, aniž by byla ztracena jeho aktivita. Biologicky aktivní místo je identifikováno

na základě studií vztahu mezi strukturou a aktivitou. Jestliže je ligand imobilizován na matrici v nevhodné pozici, je možné, že primární cílový protein nebude identifikován (Sato S, 2010). Na druhou stranu tento přístup může posloužit k identifikaci dalších vedlejších cílů (Han SY, 2007).

Nepatrný rozdíl v pozici imobilizace na afinitní matrici může vést k identifikaci úplně rozdílných cílových proteinů. Ve studii Uga H (2006) byly připraveny dva typy imobilizovaného metotrexátu (MTX), léčiva používaného v terapii rakoviny a autoimunitních a zánětlivých onemocnění. V prvním případě byl MTX imobilizován přes postranní řetězec glutamové kyseliny a v druhém případě přes α -karboxylovou skupinu kyseliny glutamové. V prvním případě byl identifikován známý cílový protein MTX dihydrofolát reduktáza a v druhém případě byl identifikován nový cílový protein MTX deoxycytidin kináza.

Od afinitních matric jsou vyžadovány především tyto vlastnosti: fyzikální a chemická stabilita, vhodná funkční skupina pro imobilizaci ligandu a co nejnižší nespecifická afinita k proteinům (Sakamoto S, 2012).

2.2.3.2.1 Typy afinitních matric

Afinitní chromatografii lze provádět klasicky na chromatografických kolonách nebo na mobilních matricích, které mají formu kuliček (Burdine L, 2004). V následujícím výčtu jsou probrány mobilní matrice, viz Tab. 1. V biochemii a molekulární biologii jsou nejvíce používány mobilní matrice založené na agaróze nebo sefaróze. Agarózový derivát, Affigel, je jedena z nejběžnějších afinitních matric. Díky svému hydrofilnímu charakteru se na ni méně váží nespecifické proteiny. Mnoho cílových proteinů bylo izolováno a identifikováno právě díky Affigelu. Nevýhodou Affigelu však je chemická nestabilita kvůli sacharidové složce a také v důsledku hydrofility Affigelu je omezena příprava pro imobilizaci ligandu. Většina farmaceutických léčiv je totiž hydrofobních nebo lehce hydrofilních a jejich schopnost vázat se na matrici vyžaduje organické rozpouštědla. Naproti tomu jsou funkční organické polymery stabilní v různých organických rozpouštědlech, a proto jsou obvykle využívány pro hydrofobní ligandy, které jsou rozpustné v organických rozpouštědlech. Polymetakrylátové deriváty, např. Toyopearl, jsou využívány jako alternativa k Affigelu, jelikož jsou stabilní v organických rozpouštědlech. Bohužel však vykazuje vyšší hladinu nespecificky vázajících se proteinů než Affigel.

Afinitní matrice založené na organických polymerech, které mají formu velmi malých neporézních kuliček, nabízejí velký povrch pro navázání cílového proteinu (Sakamoto S, 2012). Navíc zavedení funkční skupiny do organicky polymerních kuliček umožňuje imobilizaci hydrofobních ligandů. Proto byly vyvinuty latexové afinitní kuličky, které mají 200 nm v průměru a jsou složeny z polymeru styrenu a glycidylmetakrylátu (GMA), které tvoří jádro kuličky a povrch je kryt polyGMA. Tato matrice se nazývá SG kuličky, podle styrenu a GMA. (Shimizu N, 2000). Její výhody jsou mísitelnost s vodou, chemická a fyzikální stabilita. SG kuličky jsou mírně hydrofilní a dochází k rovnoměrné imobilizaci ligandu na povrch kuličky. Nejdůležitějším rysem je nízká hladina nespecificky vázajících se proteinů (Sakamoto S, 2012).

Další matrice byla inspirována komerčními magnetickými kuličkami DynaBeads. Nesou všechny výhody SG kuliček a navíc překonávají nevýhodu ostatních matic a to zejména centrifugační separační proces, který zabírá nejvíce času. Tato matrice se nazývá FG kuličky podle anglického ferrite, což je magnetický oxid železitý a GMA. FG kuličky jsou nanočástice železa zabalené do organického polymeru. Tyto nanočástice jsou dobře přitahovány magnetem. FG kuličky mají v průměru 140 nm a nanočástice 40 nm. Díky jednolitému polymernímu obalu s vysokou fyzikální a chemickou stabilitou mohou být FG kuličky suspendovány v širokém rozsahu organických rozpouštědel a mohou imobilizovat nejrůznější léčiva. FG kuličky byly využity např. k identifikaci cílových proteinů metotrexátu. Ukázalo se, že FG kuličky jsou lepší maticí pro afinitní purifikaci než komerčně dostupné magnetické kuličky, díky vyšší účinnosti purifikace a nižší hladině nespecificky vázajících se proteinů (Nishio K, 2008).

Tab. 1: Seznam mobilních matic využívaných při afinitní purifikaci

Název matrice	Složení	Výrobce
AffiGel®	agaróza	Bio-Rad
Toyopearl®	polymetakrylát	Thoso Bioscience GmbH
Sepharose®	agaróza	GE Healthcare
TentaGel®	polystyren	Sigma-Aldrich
AQUAFIRMUS®	polymetakrylát s etylenglykolovými jednotkami	IDEA CHEMICALS
SG kuličky	polystyren a polyglycidylmetakrylát	-
FG kuličky	polystyren, polyglycidylmetakrylát a magnetický oxid železitý	Tamagawa Seiki
DynaBeads®	magnetický oxid železitý pokrytý hydrofilním polymerem	Invitrogen

Upraveno podle Sakamoto S, 2012.

2.2.3.3 Fotochemické techniky

Fotochemické techniky umožňují identifikovat molekulární cíle léčiv a jejich vazebné místa. Spočívají v chemickém zavedení fotoreaktivní skupiny do bioaktivní molekuly a specifické fotochemické reakci, která je iniciována UV zářením, čímž je vytvořena buď nová kovalentní vazba nebo je štěpena specifická vazba. Existují tři odlišné přístupy: I) fotoafinitní značení cílových makromolekul, II) fotoindukované a uvolnění blokovaného ligandu a III) fotoimobilizace ligandu na pevný povrch.

Základní rozdíl mezi strategiemi fotochemie je v tom, zda se tvoří nebo je štěpena chemická vazba, viz Obr. 8. Fotoafinitní značení spočívá v tvorbě nové ireverzibilní kovalentní vazby mezi fotoreaktivním ligandem a proteinem (receptorový protein nebo enzym) pomocí UV záření. Fotoligand musí být detekovatelný pomocí fluorescenčního, radioaktivního nebo imunoafinitního značení. Podobný mechanismus se uplatňuje také při fotoimobilizaci ligandu na pevný povrch.

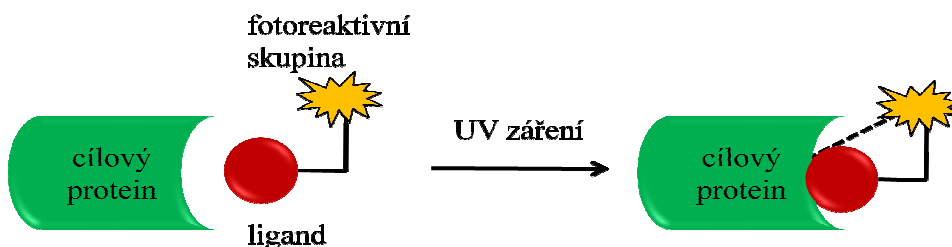
Opačná strategie využívá fotoindukované uvolnění blokovaného ligandu, kdy je jeho biologická aktivita blokována navázanou fotoreaktivní skupinou. Vazba mezi ligandem a fotoreaktivní skupinou je štěpena UV zářením, a tak se ligand může vázat

na cílový protein. Tato technika umožňuje zkoumat rychlé kinetické procesy, které probíhají v milisekundách jako je uvolňování neurotransmiterů nebo buněčná signalizace přes druhého posla (Dormán G, 2000).

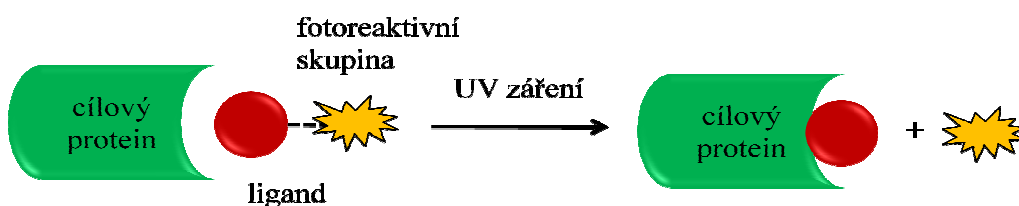
Fotoimobilizace ligandu může být provedena na skleněných destičkách, viz Obr. 9. Spočívá v tom, že je na skleněnou destičku pokrytou molekulami s fotoreaktivními skupinami aplikován roztok s ligandem. Poté je skleněná destička vysušena a pomocí UV záření jsou aktivovány fotoreaktivní skupiny. Vysoce reaktivní částice se váží na nejbližší ligandy. Po promytí zůstanou jen navázané ligandy k fotoreaktivním skupinám. Takto připravená destička je inkubována se značenými proteiny, kdy mohou být detekovány cílové proteiny ligandů. Imobilizace by měla proběhnout bez ovlivnění funkční reaktivní skupinou (Kanoh N, 2003).

Strategie fotoimobilizace ligandu nemusí být aplikována pouze na skleněných destičkách, ale také na agarózových kuličkách, jak bylo ukázáno na ligandech FH506, rapamycinu nebo cyklosporinu A, které byly zavedeny na tuto afinitní matici. (Kanoh N, 2005).

fotoafinitní značení

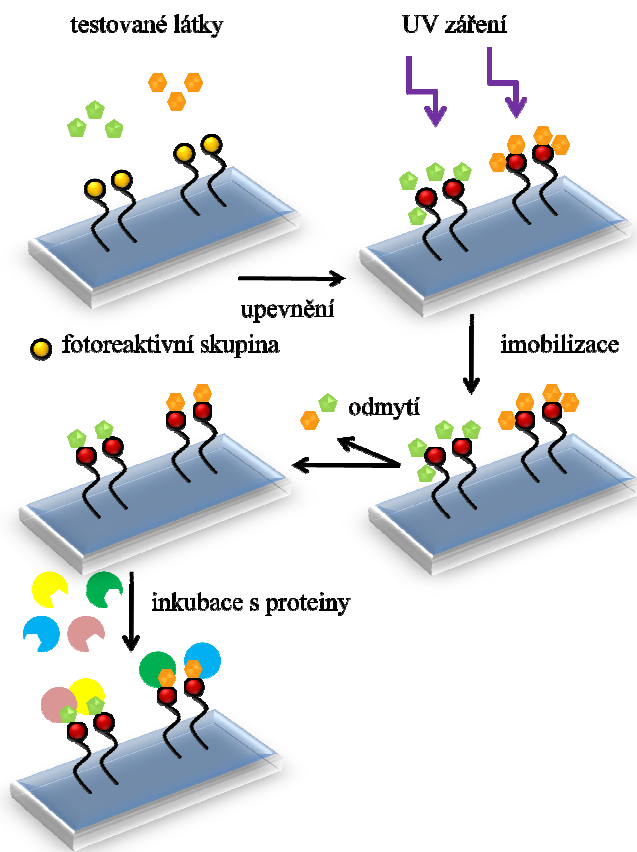


fotoindukované uvolnění blokováného ligandu



Obr. 8: Schéma fotoafinitního značení a fotoindukovaného uvolnění blokováného ligandu

Porovnání dvou základní strategií fotochemie. U fotoafinitního značení představuje čárkovaná čára nově vzniklou kovalentní vazbu UV zářením a u fotoindukovaného uvolnění blokováného ligandu představuje štěpenou vazbu UV zářením (upraveno podle Dormán G, 2000).



Obr. 9: Schéma fotoimobilizace ligandu na skleněné destičce

Imobilizace ligandu a detekce cílových proteinů pomocí fotoafinitní purifikace (upraveno podle Kanoh N, 2003).

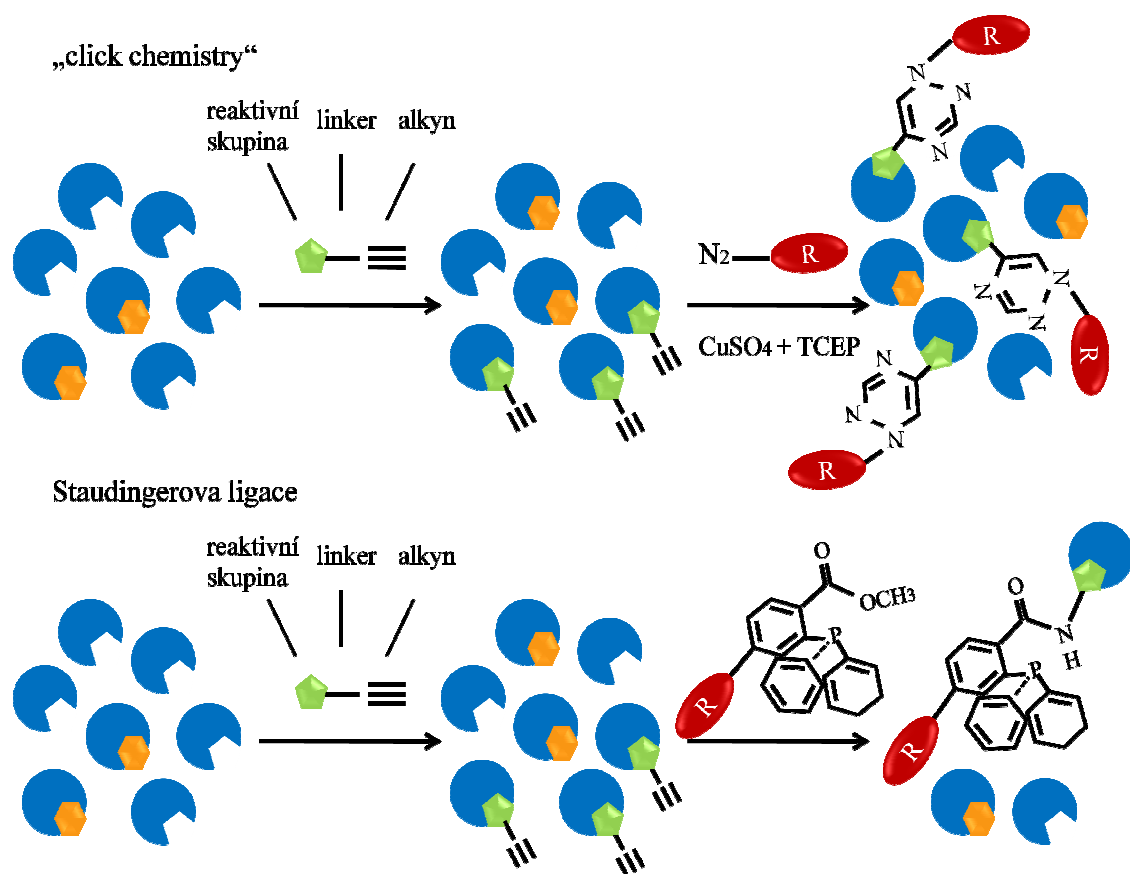
2.2.3.4 Látky pronikající do buněk

Přístup, kde biologicky aktivní přírodní produkty slouží jako kostra, která je chemicky přetvořena ve funkční prouhu pro izolaci a identifikaci cílových proteinů. Dochází zde k zavedení specifických reaktivních funkčních skupin. Příkladem je alkyne a azidová funkční skupina (Böttcher T, 2010).

Chemické značení uvnitř buněk umožňuje zkoumání intracelulárních interakcí a identifikaci nových cílových proteinů. Chemická transformace umožňuje selektivní tvorbu kovalentních vazeb s biopolymery. První metodou je modifikovaná Staudingerova ligace, viz Obr. 10, kde dochází k tvorbě amidové vazby mezi azidem a triarylfosfinem. Azidy jsou inkorporovány do glykokonjugátů buněčného povrchu pomocí metabolizace syntetických azidocukrů. Azidy pak reagují s triarylfosfíny, které

mohou být značeny biotinem nebo fluorescenčním barvivem rodaminem, za tvorby stabilní sloučeniny na povrchu buňky (Saxon E, 2000).

Druhou metodou je tzv. „click chemistry“ neboli Husgenova 1,3-dipolární cykloadiční reakce, která konjuguje za katalýzy měďným iontem azidové nebo alkynylové próby na terminální azidovou nebo alkynovou reportérovou značku. Biotin se používá pro alkyln a pro azid se používá rodamin, viz Obr. 10. Tato metoda byla využita při profilování aktivity enzymů *in vivo*. (Speers AE, 2004; Vila A, 2008) „Click chemistry“ poskytuje přesnost reakce mezi cílovým proteinem a reportérovou skupinou stejně jako Staudingerova ligace. Azidové nebo alkynylové próby mohou být také použity při značení buněčných komponent po následném spojení s alkynylovými nebo azidovými značkami (Vila A, 2008).



Obr. 10: Princip „click chemistry“ a Staudingerovy ligace

Při „click chemistry“ dochází ke konjugaci mezi alkynylovou próbou a terminální azidovou reportérovou značkou. Při Staudingerovy ligaci dochází k reakci mezi alkynylovou próbou a značeným trifenylofosfinem. TCEP = tris(2-karboxyetyl)fosfin, R = rodamin (upraveno podle Böttcher T, 2010).

Při tvorbě této metody vycházeli vědci z těchto předpokladů: metoda by měla mít široký rozsah, dávat vysoký výtěžek, měla by generovat pouze neškodné vedlejší produkty, které mohou být odstraněny jinak než chromatograficky, tzn. krystalizací nebo destilací. Dále by měla být stereospecifická, ale nemusí nutně oddělovat enantiomery. Dalším požadavkem jsou jednoduché reakční podmínky, (v ideálním případě by nemělo docházet k reakci s kyslíkem a vodou), snadno dostupné výchozí materiály, použití činidel bez nebo s neškodným rozpouštědlem (voda) a snadná izolace produktu. Tyto reakce mají však velkou termodynamickou sílu a probíhají velmi rychle a produkují jen jediný produkt (Kolb HC, 2001). Podobně jako příroda využívá kombinatorickou chemii k tvorbě proteinů ze základních dvaceti aminokyselin pomocí reverzibilního spojení heteroatomů (amidů), tak i „click chemistry“ využívá spojení mezi uhlíkem a heteroatomem. Protože je však velmi náročné kontrolovat reverzibilní karbonylové vazby „click chemistry“ využívá vysokoenergetické ireverzibilní vazby, které podléhají kinetické kontrole. Nejlepší a nejreaktivnější stavební jednotky jsou olefiny a acetyleny. Chemici mají přístup k nepřebernému množství takovýchto materiálů, od přirozeně se vyskytující terpeny k olefinům z petrochemického průmyslu, které mohou být snadno pozmeněné oxidační nebo adiční reakcí (Kolb HC, 2003).

2.2.3.5 Vychytávání specifických tříd proteinů

V současnosti je zaznamenán rostoucí zájem o vývoj metod, které vychytávají terapeuticky významné proteiny, jako jsou kinázy, lipázy, helikázy, dehydrogenázy, fosforylázy, syntetázy a transferázy (Hall SE, 2006).

Chemická proteomika často zkoumá interakce mezi ligandy a stovkami endogenně exprimovaných proteinkináz a dalších proteinů, které váží puriny. Tento subproteom je vychytáván pomocí strategie afinitní purifikace za použití imobilizovaných inhibitorů kináz, tzv. „kinobeads“. Měřením kompetice s afinitní maticí je hodnocena vazba léčiv na jejich cíl v buněčném lyzátu a v buňce. Také jsou mapovány změny fosforylovaného stavu působením léčiv a analyzovány signální dráhy cílových kináz. Tato metoda spočívá v zachycení velké části exprimovaného kinomu (souboru kináz v buňce) a souvisejících proteinů na „kinobeads“, kdy následuje analýza definovaného subproteomu pomocí kvantitativní hmotnostní spektrometrie. Protože některé látky neobsahují vhodnou funkční skupinu pro vazbu na matici, aniž by

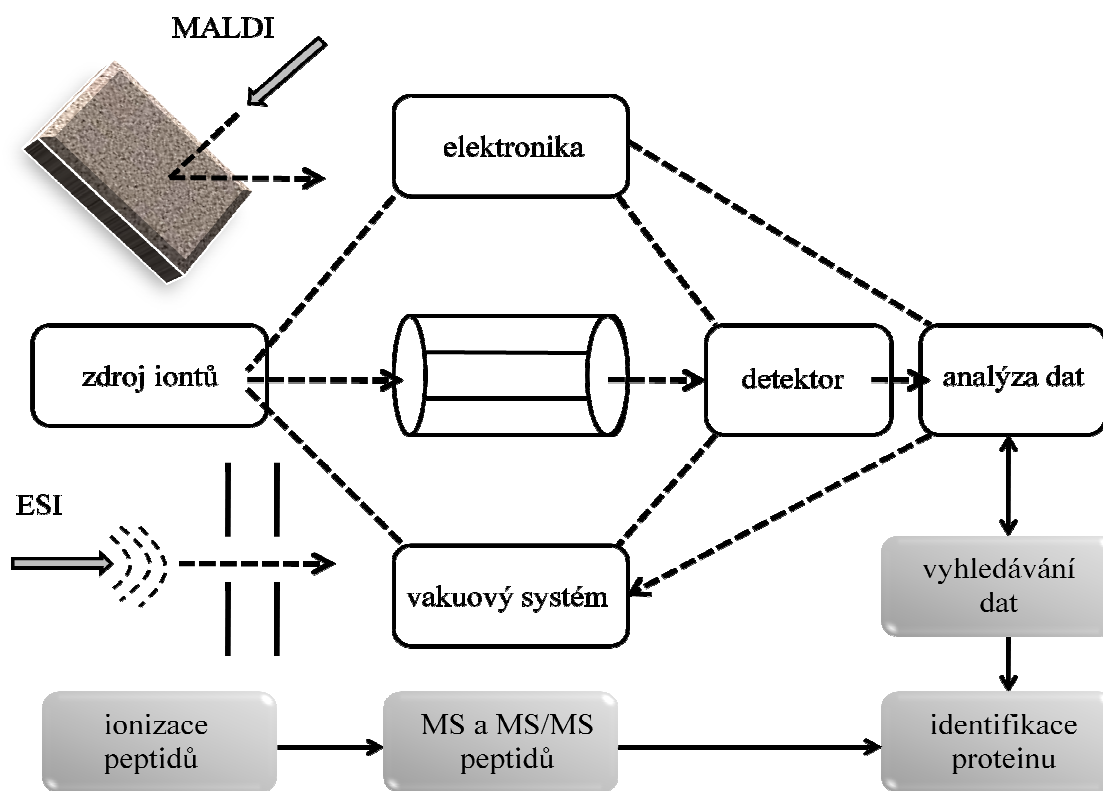
neztratily svoji funkci, byly syntetizovány analogy obsahující primární aminoskupiny. Po imobilizaci sloučeniny na „kinobeads“ následuje inkubace s buněčným lyzátem kdy jsou navázány proteiny. Po odmytí lyzátu jsou navázané proteiny eluovány, rozštěpeny trypsinem a analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Díky tomuto přístupu mohou být identifikovány nové potenciální cílové proteiny. Problém však nastává při hodnocení selektivity inhibitorů. Kvůli imobilizaci ligandu se získané výsledky nemohou vztahovat k dané sloučenině kvůli změně selektivity a účinnosti. Zkreslená je také vazba proteinů, které jsou zastoupeny ve velké míře, jelikož se slaběji váží na příslušnou matici. V důsledku překonání těchto nedostatků byl vyvinut nový přístup. Využívá imobilizovaných selektivních inhibitorů k analýze kompetice volného ligandu v roztoku k jeho cílovému proteinu. Tato metoda je založena na měření kompetice mezi nemodifikovanou testovanou látkou a imobilizovaným ligandem (Bantscheff M, 2007). V metodě, kterou použil Graves PR (2002) bylo využito imobilizace ATP přes γ -fosfát k pevnému nosiči, ATP tedy bylo využito jako ligand.

Tento přístup však často vede k zachycení omezeného počtu kináz. „Kinobeads“ neváží pouze proteinkinázy, ale i jiné proteiny subproteomického zájmu, a to další ATP a purin vazebné proteiny jako jsou: chaperony, helikázy, ATPázy, motorové proteiny, transportéry a metabolické enzymy. Podle výsledků z hmotnostní spektrometrie se odhaduje, že kinázy tvoří 80% z celkového množství zachycených proteinů (Bantscheff M, 2007).

Existují také tzv. rozpustné próby, které byly vyvinuty v rámci překonání nevýhod pevných matic a to nemožnost volného pohybu a sterické překážce. Rozpustné próby jsou tvořeny peptidovým epitopem, který je přes linker spojen s ligandem, což umožňuje volnou difúzi próby a překonání sterické překážky jako je tomu u pevných matic, kde dochází k nadměrnému shlukování ligandu. Byl proveden experiment s derivátem inhibitorů proteinkináz, který byl připojen ke komerčnímu peptidu FLAG, přičemž bylo prokázáno, že jeho inhibiční aktivita byla zachována. Komplex inhibitoru a proteinu byl izolován pomocí anti-FLAG afinitní matrice. Použitím této metody byly identifikovány jak již známé, tak i dosud neznámé molekulární cíle (Saxena C, 2008). Díky této metodě bylo odhaleno několik molekulárních cílů např. chinolinových sloučenin. Při testování lidských krevních buněk byly identifikovány aldehyd dehydrogenáza-1 a chinolin reduktáza-2 jako cílové proteiny chinolinů (Graves PR, 2002).

2.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních součástí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a iontový detektor, viz Obr. 6. Měření molekulární hmotnosti, tedy poměru hmoty a náboje, je prováděno na ionizovaných vzorcích v plynném stavu. K převodu proteinových či peptidových molekul z kapalné nebo pevné fáze do fáze plynné jsou běžně využívány dvě metody (Saxena C, 2009). První metodou je MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization), tedy ionizace na matrici pomocí laseru. Tato ionizační metoda využívá organické směsi k ionizaci a kokrystalizaci proteinových či peptidových molekul na kovové nebo křemíkové destičce. Pulzující laser excituje matrici, což způsobuje prudké zahřívání a tím přeměnu a desorpci iontů do plynné fáze. Tyto ionty jsou pak přiváděny do hmotnostního analyzátoru a na detektor (Karas M, 1988). Druhým způsobem ionizace je ESI (electrospray ionization), tedy ionizace elektrosprejem. Analyzované ionty jsou rozpuštěny v těkavém rozpouštědle a prochází přes nabitou kolonu tvořící jemný aerosol, který je směřován na hmotnostní analyzátor (Fenn JB, 1989). Hmotnostní spektrometry se liší v citlivosti, rozlišení a přesnosti při měření hmoty (Saxena C, 2009).



Obr. 6: Proces identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Peptidy jsou při hmotnostní spektrometrii ionizovány pomocí MALDI nebo ESI a vyslány k hmotnostnímu analyzátoru na detektor. Data jsou analyzována na základě MS a MS/MS spekter a poté jsou porovnávány v databázích, čímž jsou identifikovány dané proteiny (upraveno podle Saxena C, 2009).

Proteiny získané afinitní purifikací jsou rozštěpeny specifickou proteázou (např. trypsin). Peptidy jsou separované na HPLC (high-pressure liquid chromatography) a ionizovány pomocí MALDI nebo ESI a vyslány k hmotnostnímu analyzátoru. Výsledkem měření je poměr hmotnosti a hodnoty náboje peptidových iontů. Při tandemové MS/MS hmotnostní spektrometrii je specifický peptidový iont dále fragmentován na kratší aminokyselinové sekvence, případně až na imoniové ionty, na základě kterých je určena přesná sekvence peptidů. Zaznamenaná spektra jsou porovnána v databázi s virtuálním vzorkem obsahujícím téměř všechny proteiny z daného organismu, díky čemuž je daný protein identifikován (Saxena C, 2009). Tento proces se nazývá fingerprinting hmoty peptidů (Cottrell JS, 1994).

Jedna z výhod hmotnostní spektrometrie je, že může poskytovat kvantitativní informace o proteinu ve vzorku. Několik strategií pro relativní i absolutní kvantifikaci zahrnuje izotopové značení proteinů z fyziologické i patologické buňky a následně

analýzu poměru těchto proteinů s využitím hmotnostní spektrometrie (Saxena C, 2009). Kvantifikační metody jsou různé, např.: ICAT (isotope-coded affinity tag), MCAT (mass-coded abundance tagging), SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture), GIST (global internal standard strategy) (Hamdan M, 2002).

Při SILAC dochází k inkorporaci aminokyselin, které jsou značeny pomocí stabilního izotopu (např.: ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O), již při kultivaci v médiu *in vivo*. Po extrakci proteinů a jejich purifikaci jsou vzorky (značené a neznačené) smíchány v určitém poměru a dále se již pracuje se směsí. Směs je štěpena trypsinem a kvantifikována pomocí hmotnostní spektrometrie na základě poměrů intenzit signálů. Na rozdíl od toho u ICAT dochází ke značení proteinů až po jejich extrakci, denaturaci a redukci pomocí chemické modifikace *in vitro*. Teprve potom jsou vzorky (značené a neznačené) smíchány v určitém poměru, štěpeny trypsinem, purifikovány a kvantifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie na základě poměrů intenzit signálů (Ong SE, 2002).

Kromě metod, které využívají izotopové značení, existují i metody bez nutnosti využití izotopů tzv. „label free“ (Guitot K, 2014)

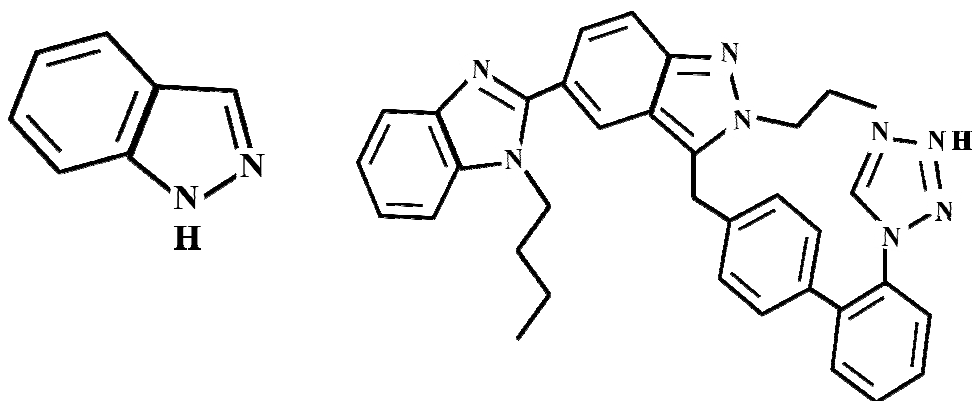
2.3 Indazolové deriváty

Předmětem zájmu této práce jsou indazolové deriváty. Indazol je heterocyklická aromatická sloučenina, viz Obr. 11. V přírodě se vyskytuje zřídka. Indazoly jsou obsaženy v alkaloidech nigelicin, nigeplanin a nigeclidin. Nigelicin byl izolován z široce rozšířené rostliny *Nigella sativa* L čili česky černucha setá, která patří do čeledi pryskyřníkovité, lidově se nazývá černý kmín a semena se používají jako koření (wikipedia.org).

Tyto látky jsou významné hlavně pro svoji antiproliferativní a apoptotickou aktivitu proti nádorovým buňkám. Tak například N-(2-allyl-2H-indazol-6-yl)-4-metoxybenzensulfonamid-4 a N-[7-etoxy-2-(4-metyl-benzyl)-2H-indazol-6-yl]-4-metyl-benzensulfonamid-9 vykazovaly v předběžných farmaceutických studiích *in vitro* významnou antiproliferativní aktivitu proti nádorovým buněčným liniím odvozených od karcinomu vaječníku nebo adenokarcinomu plic. Hodnota IC_{50} se pohybovala kolem 4,21 až 18,6 μM . Obě tyto sloučeniny byly schopny zastavit buněčný cyklus v bodě mezi G2/M fází. Tyto indazolové deriváty se nejspíš váží v buňce na tubuliny.

Při imunofluorescenční mikroskopii však nebyly pozorovány změny ve struktuře mikrotubulární sítě, ale za to byly ukázány rozdíly v chování těchto dvou sloučenin (Abbassi N, 2014).

Nově bylo zjištěno, že indazolové deriváty mají dvojí účinek a jsou to jak antagonisté AT_1 (angiotensinový receptor II) s IC_{50} 0,006 μM , tak parciálními agonisty PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) s EC_{50} 0,25 μM . Tyto receptory hrají významnou roli při metabolických poruchách jako, jsou vysoký krevní tlak, obezita, rezistence k inzulinu a dyslipidémie, která představuje hlavní riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění. V testech *in vivo* na myších bylo prokázáno, že indazolový derivát, viz Obr. 11, výrazně snižuje systolický a diastolický krevní tlak, jelikož působí jako antagonistu AT_1 receptoru. Tato látka však působí také jako parciální agonista PPAR γ receptoru a může mít významné nežádoucí účinky. Tento indazolový derivát také významně snižuje hladinu volných mastných kyselin a triacylglycerolů v plazmě, a tím zvyšuje citlivost tkání na inzulin. Tato látka funguje podobně jako plný agonista PPAR γ , avšak s tím rozdílem, že nezvyšuje hmotnost pacienta během léčby (Lamotte Y, 2014).



Obr. 11: Struktura indazolu a jeho derivátu

Struktura aromatického heterocyklicku indazolu a jeho derivátu.

3 Cíl práce

Cílem práce byla identifikace molekulárních cílů protinádorových léčiv, konkrétně indazolových derivátů, pomocí afinitní purifikace a optimalizace této metody.

Biologickým materiálem byla suspenzní buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie CCRF-CEM, značená pomocí lehkých a těžkých izotopů uhlíku tzv. metodou SILAC. K dispozici bylo několik indazolových derivátů imobilizovaných z několika stran a v rámci optimalizace metody byly použity různé postupy při afinitní purifikaci: od různých strategií afinitní purifikace a rozdílných druhů afinitních matric, přes různé způsoby trypsinové digesce proteinů a přečišťování peptidů, k odlišným přístupům ionizace peptidů při měření na různých hmotnostních spektrometrech.

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

- Suspenzní buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie CCRF-CEM. Buněčná linie byla získána od společnosti ATCC (American Tissue Culture Collection).

4.1.2 Chemikálie

- 10 x tris glycin SDS pufr (TGS), Sigma-Aldrich
- 20% dialyzované fetální bovinní sérum, Sigma-Aldrich
- 30% roztok akrylamidu a bisakrylamidu, Bio-Rad
- acetonitril, J.T. Baker
- agarózové kuličky: Streptavidin-Agarose, from *Streptomyces avidinii*, Sigma-Aldrich
- aminokyseliny: arginin ¹³C, lysin ¹³C, arginin ¹²C, lysin ¹²C, Sigma Aldrich
- antibiotika: streptomycin, Sigma-Aldrich; penicilin, Biotika
- biotin, Sigma-Aldrich
- biotinylované a volné testované molekuly indazolových derivátů byly připraveny pracovníky organické laboratoře Ústavu molekulární a translační medicíny, Olomouc
- bovinní sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich
- bromfenolová modř, Sigma-Aldrich
- Butanol, Sigma-Aldrich
- Coomassie Brilliant Blue, Sigma-Aldrich
- cystein, Sigma-Aldrich
- deoxycholát sodný, Sigma-Aldrich
- dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich
- ditiotritol (DTT), Sigma-Aldrich
- dodecil síran sodný (SDS), Sigma-Aldrich

- etylendiamin tetrakyselina octová (EDTA), Serva
- etylenglykol tetrakyselina octová (EGTA), Serva
- etylmorfolin (EtMF), Sigma-Aldrich
- fosfatázový a proteázový inhibitor, Roche
- glycerol, Sigma-Aldrich
- hydrogenuhličitan amonný, Fluka
- inhibitory: $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$, Na_3VO , NaF, PMSF, Sigma-Aldrich
- jodacetamid (IAA), Sigma-Aldrich
- kalibranty pro hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF: bradykinin 1 – 7 (757,39916 Da), angiotensin II (1046,54180 Da), angiotensin I (1296,68480 Da), substance P (1347,73540 Da), bombesin (1619,82230 Da), renin substrát (1758,93261 Da), ACTH klip 1 – 17 (2093,08620 Da), ACTH klip 18 – 39 (2465,19830 Da) a somatostatin 28 (3147,47100 Da).
- kyselina octová, Lach-Ner
- kyselina trifluorooctová, Sigma-Aldrich
- kyselina α -kyanohydroxyskořicová
- magnetické kuličky: Dynabeads My One C1, Invitrogen
- médium RPMI bez argininu, bez lysinu, s L-glutaminem, Biowest
- metanol, Merck Millipore
- N, N, N', N'-tetrametyletylendiamin (TEMED), Serva
- NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , Lach-Ner
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- NP-40, Sigma-Aldrich
- persulfát amonný (APS), Serva
- roztok bicinchoninové kyseliny (BCA), Sigma-Aldrich
- roztok $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich
- trifluoroetanol
- tris(2-karboxyetyl)fosfin (TCEP), Sigma-Aldrich
- tris(hydroxymetyl)aminometan (Tris), Serva
- triton-X, Serva
- trypsin: Trypsin Gold, Mass spektrometry Grade, Promega

4.1.3 Pufry

- 10 x fosfátový pufr (PBS): 80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 2 g K₂HPO₄ (+ inhibitory: 5mM Na₄P₂O₇ x 10H₂O, 1mM Na₃VO, 5mM NaF, 1mM PMSF) do 1 l H₂O při celkovém pH 7,4
- 5 x SDS vzorkovací pufr: 250mM Tris, 10% SDS, 30% glycerol, 0,5M DTT, 0,02% bromfenolová modř, při celkovém pH 6,8.
- lyzační pufr: 20mM Tris (pH 7,5); 150mM NaCl; 1mM EGTA; 1mM EDTA; 0,5% TritonX-100 0,5% NP-40
- lyzačního pufru podle Ong SE (2012): 1% NP-40, 0,25% deoxycholát sodný, 150mM NaCl, 50mM Tris, fosfátový a proteázový inhibitor v tabletách při celkovém pH 7,8.
- odbarvovací a fixační pufr: 250 ml H₂O, 200 ml metanolu, 50 ml kyseliny octové
- PBS pro afinitní purifikaci: 0,25 g Na₂HPO₄ x H₂O, 1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 8,78 g NaCl do 1 l H₂O při celkovém pH 7,4

4.1.4 Přístroje a laboratorní vybavení

- analyzátor viability buněk: Vi-cell XR, Beckman Coulter, USA
- centrifuga: Centrifuge 5810R, Eppendorf, Německo
- centrifuga: MiniSpin, Eppendorf, Německo
- centrifuga: Rotina 420R Zentrifugen, Hettich, Německo
- elektroforetická komora: Mini-Protean Tetra System, Bio-Rad, USA
- exikátor: Secador, P-lab, Czech Republic
- flowbox: Herasafe KS, Trigon-Plus, Czech Republic
- hmotnostní spektrometr: Bruker Ultraflex extreme, Bruker Daltonics, Německo
- hmotnostní spektrometr: Orbitrap Elite, Velos Pro, Thermo Scientific, Německo
- HPLC kapalinový chromatograf: Agilent Capillary 1200, Agilent Technologies, USA s kolonou Michrom Magic C18AQ, Bruker-Michrom, USA spojený se spoterem Proteiner fc, Bruker Daltonics, Německo
- inkubátor: Forma Direct Head, Thermo Scientific, Trigon-Plus, Czech Republic

- kolona Macro Trap, Bruker-Michrom, USA
- koncentrátor: Concentrator 5301, Eppendorf, Německo
- magnetické míchadlo: Magnetic stirrer MSH, Fischer Scientific, USA
- magnetický separátor 104 II, Omnilab-Laboratorzentrum GmbH & Co. KG, Německo
- mikroskop: Olympus IX51, USA
- pH metr: Denver Ultra Basic UB-10, P-lab, Czech Republic
- přístroj pro MS vodu: Milli Q Water Purification System, Merc Millipore, Czech Republic
- reverzní fáze C18: High Performance Extraction Disks C18, Empore, USA
- scanner polyakrylamidového gelu: GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, USA
- sonikátor: Bandelin Sonorex, Maneko, Czech Republic
- spektrofotometr: Multi plate reader Perkin Elmer, EnSpire, USA
- termomixér: Thermomixer comfort, Eppendorf, Německo
- UHPLC kapalinový chromatograf: Dionex Ultimate 3000, s pre-kolonou a kolonou Acclaim Pep Map 100 C18 Thermo Scientific, Německo
- váhy: Scaltec, SBC 21, LabExchange, Německo
- zdroj pro SDS-PAGE: Power Pac Basic, Bio-Rad, USA

4.2 Metodika

4.2.1 SILAC a afinitní purifikace

Popis metody afinitní purifikace je uveden v teoretické části. Experimentální část vycházela z velké části z práce Ong SE (2012), kde bylo využito metody SILAC pro kvantifikaci proteinů. Buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie CCRF-CEM byla kultivována ve dvou kultivačních nádobách s odlišnými kultivačními médii. První médium obsahovalo arginin a lysin s uhlíkem ^{12}C a druhé médium obsahovalo arginin a lysin s uhlíkem ^{13}C . Buněčné linie byly kultivovány nejméně pět pasáží, aby došlo k celkové inkorporaci značených a neznačených aminokyselin do všech buněk. Z obou buněčných linií byly připraveny proteinové lyzáty, za použití

lyzačního pufru a poté lyzačního pufru podle Ong SE (2012). Koncentrace proteinů v lyzátech byla změřena pomocí BCA (bicinchoninic acid) testu.

Afinitní purifikace byla zaváděna a postupně byla optimalizována v jednotlivých stádiích. Byly použity dva typy mobilních matic, magnetické a agarózové kuličky, které na svém povrchu mají navázaný streptavidin.

Nejprve byla zvolena tato strategie pro afinitní purifikaci: streptavidinové magnetické kuličky byly inkubovány s biotinylovanou látkou s následnou inkubací s lyzátem obsahujícím izotopicky značené proteiny (heavyform). Pro negativní kontrolu byly streptavidinové magnetické kuličky inkubovány s biotinem a následně inkubovány s neznačenými proteiny (lightform). Specifický protein by se měl vázat na biotinylovanou látku navázanou na afinitní matici, kde byl použit heavy lyzát. Poměr intenzit těžkých a lehkých peptidů vázajícího se proteinu (H/L) by měl být ve prospěch těžkých peptidů ($H/L > 1$).

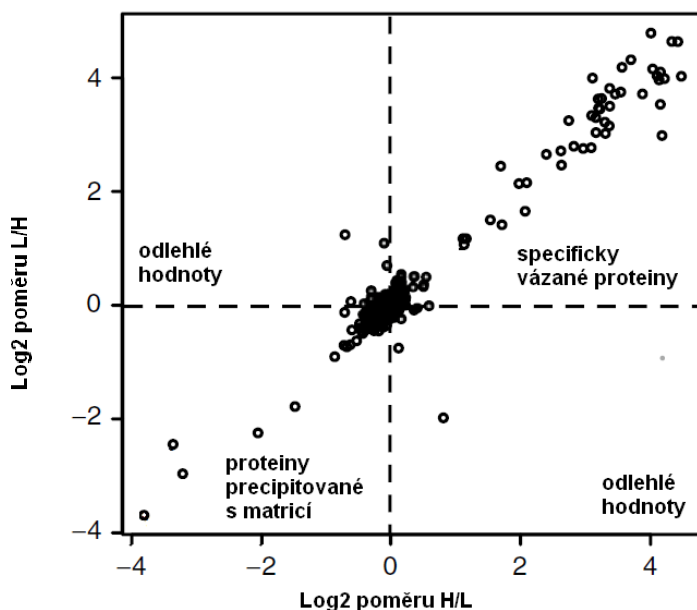
Nejprve bylo na kuličky aplikováno 500 μg proteinů a poté jen 200 μg kvůli snadnějšímu navázání specifických proteinů. Také byl obměněn krok promývání, kde byl PBS pufr vyměněno za lyzační pufr, který je k proteinům šetrnější. Kuličky byly také nejprve zamrazovány v PBS pufru, poté v lyzačním pufru, aby nedocházelo k vyvázání cílových proteinů.

Druhá zvolená strategie vycházela z práce Ong SE (2012), kdy se využilo kompetitivní vazby proteinu mezi biotinylovanou látkou navázanou na matici a stejnou volnou látkou v roztoku, která byla obsažena v pětinasobném množství. Byly vytvořeny dvě varianty vzorků: varianta A, kdy k lyzátu s neznačenými proteiny byla přidána volná testovaná látka a zároveň k lyzátu se značenými proteiny byl přidán místo testované látky DMSO; a varianta B, kdy tomu bylo přesně naopak. Afinitní matrice byla před-inkubována s biotinylovanou látkou a následně inkubována s takto připravenými lyzáty. Nakonec byly v obou variantách smíchány lyzáty s těžkými a lehkými formami proteinů dohromady (v poměru 1:1). U varianty A by se mělo navázat pětinasobné množství cílového proteinu na matici, kde byla pouze biotinylovaná látka a DMSO, tedy při inkubaci s heavy lyzátem. Při inkubaci s light lyzátem byla na matici vázána biotinylovaná látka, ale v roztoku byl zároveň pětinasobek volné látky, což způsobilo pětinasobné snížení množství specificky navázaného proteinu. Specificky navázaný proteiny na volnou látku byl následně odmyt. U varianty B tomu bylo přesně naopak. Pokud je na biotinylovanou látku specificky navázan protein, tak lze očekávat kladnou hodnotu \log_2 poměrů H/L

u varianty A a L/H u varianty B. Díky této strategii můžeme lépe rozlišit nespecifické a specifické vazby proteinů na testovanou látku. V bodovém grafu \log_2 poměrů H/L a L/H variant A a B, viz Graf 1, jsou v pravém horním kvadrantu umístěny specificky vázající se proteiny, přičemž hodnoty kolem 5 odpovídají nejvíce specificky navázaným proteinům. Nižší hodnoty mohou představovat proteiny, které se váží na specifický vázaný protein, např. mohou být tyto proteiny spolu v komplexu. Specifické proteiny jsou v grafu uspořádány v lineární linii. Všechny proteiny vyskytující se kolem bodu 0 jsou nespecificky vázané proteiny, např. proteiny vázající se na afinitní matici nebo streptavidin. V levém dolním kvadrantu grafu se pak vyskytují proteiny precipitované s maticí. V levém horním a v pravém dolním kvadrantu jsou odlehle hodnoty. Porovnáním variant A a B jsou vytvořeny striktní kritéria pro identifikaci specificky vázaných proteinů na testovanou látku.

V dalším kroku optimalizace metody byly srovnány afinitní matrice magnetických a agarózových kuliček pro zjištění, na kterou matici se budou specifické proteiny lépe vázat. Při přípravě proteinových lyzátů a v průběhu afinitní purifikace byl využit šetrnější lyzační pufr podle Ong SE (2012) a také byl aplikován přímo čerstvý proteinový lyzát a to o koncentraci 2 mg/ml místo předem připraveného a uschovaného v mrazáku při -80°C . Zamrazením proteinového lyzátu může dojít k rozpadu některých proteinových komplexů. Posledním optimalizačním krokem bylo vynechání blokačního kroku promývání PBS pufrům s 0,1% BSA, jelikož se BSA nespecificky váže na afinitní matici a může tak nepříznivě ovlivňovat výsledek.

Graf 1: Poměry H/L (varianta A) a L/H (varianta B) značené pomocí SILAC



Upraveno podle Ong SE (2012).

4.2.1.1 Kultivace nádorových buněk CCRF-CEM se značením SILAC

- Byly připraveny dva druhy kultivačních medií: 500 ml RPMI média s glutaminem a bez argininu a lysinu, 50 ml 20% dialyzovaného bovinního séra, antibiotika (2,5 ml 0,5% streptavidinu a 0,05% 0,25 ml penicilinu) a přidané aminokyseliny: k jednomu médiu 100 mg argininu a 20 mg lysinu s uhlíkem ^{12}C a k druhému médiu 100 mg arginin a 20 mg lysinu s uhlíkem ^{13}C . Obě média byla následně filtrována přes sterilní filtr s PES membránou s póry o velikosti 0,22 μm ve vakuu.
- Buněčná linie CCRF-CEM byla tímto médiem nejdříve jen kultivována podobu 5 pasáží, aby se do všech buněk inkorporovaly aminokyseliny s uhlíkem ^{12}C nebo ^{13}C .
- Buněčná linie CCRF-CEM byla převážně kultivována v kultivačních lahvích o objemu 690 ml s kultivační plochou 150 cm^2 . Počáteční koncentrace byla vždy 0,5 milionů buněk na 1 ml, při čemž za 2-3 dny se koncentrace buněk pohybovala kolem 1,5 milionů na 1 ml. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37°C a 5% atmosféře CO_2 .

- Viabilita buněk a jejich počet byl analyzován pomocí přístroje Vi-Cell XR (Cell viability analyzer).

4.2.1.2 Příprava proteinových lyzátů z nádorových buněk CCRF-CEM

- Bylo napočítáno potřebné množství buněk (100×10^6), centrifugováno 5 minut při 1500 rpm ve vychlazené centrifuze na -4°C .
- Peleta byla rozklepána a bylo přidáno 15-20 ml 1 x PBS s inhibitory a opět centrifugováno 5 minut při 1500 rpm a bylo opakováno 3 x.
- Peleta byla vysušena invertováním zkumavky 1-2 minuty, byl přidán lyzační pufr (1 ml na 100×10^6 buněk), obsah byl opakovaně propipetován a sonikován na sonikátoru s ledem 30 sekund, obsah byl ponechán lyzovat na ledu 15 minut a poté byl znovu sonikován, a opět lyzován na ledu 15 minut.
- Lyzát byl centrifugován na $14000 \times g$ při 4°C , 10 minut, supernatant byl přenesen do nových zkumavek.
- Čerstvý lyzát byl využit pro následnou afinitní purifikaci nebo byl zamražen při -80°C .

4.2.1.3 Měření koncentrace proteinů pomocí BCA (bicinchoninic acid)

- Tento test je založen na tvorbě komplexů proteinů s měďnatým kationtem. V zásaditém prostředí jsou měďnaté kationty redukovány na měďné, které tvoří fialově zbarvený komplex s BCA. Cystein, cystin, tryptofanu, tyrosinu a peptidové vazby jsou schopny redukovat Cu^{2+} na Cu^{1+} . Množství redukovaného měďnatého kationtu odpovídá množství proteinu v lyzátu.
- Byly vytvořeny standardy - roztoky bovinního sérového albuminu (BSA) v lyzačním pufru pro měření neznámé koncentrace proteinů v lyzátu o koncentracích: 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1400 a 2000 $\mu\text{g/ml}$.
- Lyzát byl 5 x zředěn, jelikož byla předpokládána vysoká koncentrace proteinů.
- Byl připraven roztok BCA se 4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ v poměru 50:1.
- Na 96 jamkovou destičku byly v triplicátech po 10 μl nanášeny standardy, vzorky proteinového lyzátu a jako blank byl použit lyzační pufr.
- Do každé jamky bylo aplikováno 200 μl předem připraveného roztoku BCA se 4% roztokem $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$.

- Destička byla 1 minutu promývána na třepačce a poté byla umístěna do inkubátoru při 37°C po dobu 30 minut.
- Po uplynutí této doby byla destička opět 1 minutu promývána na třepačce a byla změřena absorbance roztoku při 562 nm na spektrofotometru.
- Pomocí rovnice regrese grafu závislosti mezi absorbancí a koncentrací standardů byla vypočítána koncentrace proteinů v lyzátu.

4.2.1.4 Afinitní purifikace bez využití kompetice

- Magnetické kuličky byly resuspendovány v původním obalu na vortexu.
- Do zkumavek bylo aplikováno 50 μ l magnetických kuliček.
- Magnetické kuličky byly promyty 100 μ l PBS pufru, umístěny na magnetický separátor a PBS pufr byl odsát, promývání bylo opakováno 3 x.
- K magnetickým kuličkám bylo přidáno 100 μ l 100 μ M roztoku biotinylované látky, do negativní kontroly bylo přidáno stejné množství 100 μ M biotinu a bylo inkubováno 30 minut při pokojové teplotě na termomixéru při 500 rpm.
- Magnetické kuličky s navázanou biotinylovanou molekulou byly ponechány separovat na magnetickém separátoru po dobu 2-3 minut.
- Magnetické kuličky byly 3 x promývány 100 μ l PBS pufru s 0,1% BSA kvůli blokaci afinitní matrice.
- K vyvázání zbylých vazebných míst streptavidinu bylo přidáno 100 μ l 100 μ M roztoku biotinu a bylo inkubováno 30 minut při pokojové teplotě na termomixéru při 500 rpm.
- Magnetické kuličky byly 3 x promyty 100 μ l PBS pufru a přeneseny do nových zkumavek.
- K magnetickým kuličkám bylo přidáno 500 nebo 200 μ g proteinu. Ke zkumavce s negativní kontrolou byl přidán lyzát s lehkými izotopy a ke zkumavce s navázanou látkou byl přidán lyzát s těžkými izotopy.
- Magnetické kuličky s lyzátem byly za občasného promíchávání inkubovány 2 hodiny na ledu.
- Navázané proteiny byly promývány 3 x 100 μ l PBS pufru, pak 2 x promývány 100 μ l 0,1% SDS nebo lyzačním pufrem s pauzou 5 minut a nakonec ještě jednou promyty 100 μ l PBS pufru.

- Magnetické kuličky s negativní kontrolou a lyzátem s lehkými izotopy byly smíchány s magnetickými kuličkami s látkou a lyzátem s těžkými izotopy v PBS pufru do jedné nové zkumavky.

4.2.1.5 Afinitní purifikace s využitím kompetice

- Magnetické nebo agarózové kuličky byly resuspendovány v původním obalu na vortexu.
- Do zkumavek bylo aplikováno 50 μ l magnetických nebo agarózových kuliček.
- Magnetické kuličky byly 3 x a agarózové 7 x, jelikož byly uchovány v azidovém pufru, promyty 100 μ l PBS pufru. Magnetické kuličky byly separovány pomocí magnetického separátoru a agarózové kuličky byly separovány centrifugací podobu 2 minut při 13 400 rpm.
- Ke kuličkám bylo přidáno 99 μ l PBS pufru a potom 1 μ l 10mM DMSO roztoku biotinylované molekuly, poté byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě na termomixéru při 500 rpm.
- Mezitím byla vytvořena varianta A, kdy k proteinovému lyzátu s lehkými izotopy o koncentraci 2 mg/ml byla přidána volná látka do výsledné koncentrace 0,5 mM (5 μ l z 10mM roztoku do 100 μ l lyzátu) a k proteinovému lyzátu s těžkými izotopy o koncentraci 2 mg/ml bylo přidáno adekvátní množství DMSO.
- Varianta B byla připravena přesně naopak, kdy k proteinovému lyzátu s lehkými izotopy bylo přidáno DMSO a k proteinovému lyzátu s těžkými izotopy byla přidána volná látka.
- Takto připravené lyzáty byly inkubovány 1 hodinu na ledu.
- Kuličky s navázanou biotinylovanou molekulou byly separovány po dobu 2-3 minut.
- Kuličky byly 3 x promývány 100 μ l PBS pufru s 0,1% BSA, kvůli blokaci afinitní matrice.
- Ke kuličkám bylo přidáno 100 μ l 100 μ M roztoku biotinu k vyvázání zbylých vazebných míst streptavidinu a inkubováno 30 minut při pokojové teplotě na termomixéru při 500 rpm.
- Poté byly kuličky 3 x promývány 100 μ l PBS pufru a obsah byl přenesen do nových zkumavek.

- Na kuličky byl aplikován před-inkubovaný lyzát s volnou látkou nebo DMSO a byly za občasného míchání inkubovány 2 hodiny na ledu.
- Poté byl lyzát odebrán a uschován pro případnou pozdější analýzu.
- Navázané proteiny byly promyty 150 μ l lyzačního pufru otáčením zkumavky.
- Poté byl lyzační pufr odebrán a uschován.
- Bylo přidáno znova 150 μ l lyzačního pufru a obsah zkumavek s lyzátem s těžkými a lehkými izotopy byly přeneseny a smíchány v nové větší zkumavce.
- Lyzační pufr byl odebrán a kuličky byly znovu promyty 300 μ l lyzačního pufru.
- Lyzační pufr byl odebrán a kuličky byly zamraženy v lyzačním pufru, aby kuličky nevyschly. Pro následnou digesci v gelu byly kuličky uschovány v 10% SDS vzorkovacím pufru, který uvolnil navázané proteiny z kuliček.

4.2.2 Digesce a příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii

Proteiny, získané pomocí afinitní purifikace byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Před identifikací musí být provedena digesce, tedy rozštěpení proteinů na peptidy enzymem např. trypsinem, který specificky štěpí za každým argininem nebo lysinem. Trypsin je aktivní v mírně zásaditém prostředí kolem pH 8,5. Pro lepší dostupnost trypsinu k aminokyselinové sekvenci je protein podroben redukci disulfidických můstků cysteinů pomocí ditiotritolu (DTT) nebo tris(2-karboxyetyl)fosfinu (TCEP) a alkylation volných sulfurylových skupin pomocí jodacedaminu (IAA). Digesce byla provedena v roztoku nebo v gelu. Digesce v gelu zahrnuje redukci, alkylation a štěpení přímo v gelu. Digesci v gelu předchází elektroforetická separace vzorku pomocí SDS-PAGE, tedy elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS). Gel se skládá ze zaostřovacího gelu o nižší koncentraci polyakrylamidu a nižším pH, který slouží k zaostření vzorku a separačního gelu, který slouží k samotné separaci proteinů. Následuje barvení gelu látkami, které se váží na proteiny. Barvit se dá buď pomocí modrého barviva Coomassie Brilliant Blue nebo pomocí dusičnanu stříbrného, který vyniká větší citlivostí, ale je méně vhodný pro hmotnostní spektrometrii. Poté je gel odbarvován, jelikož by vizualizační prostředky bránily v další analýze. Po redukci, alkylation a štěpení trypsinem jsou peptidy z gelu

extrahovány a následuje jejich přečištění (Huynh ML, 2009). Přečištění peptidů bylo provedeno pomocí kolony Macro Trap nebo přes reverzní fázi C18 ve špičkách, kde je využito dlouhých uhlíkatých řetězců, aby došlo k odstranění nežádoucích solí ze vzorku. Vzorky byly aplikovány do organické fáze a byly tak připraveny pro separaci v kapalinové chromatografii a následnou hmotnostní spektrometrii (Govorukhina NI, 2006).

4.2.2.1 Digesce v roztoku

- Magnetické nebo agarózové kuličky byly resuspendovány ve 100 μ l 50mM hydrogenuhličitanu amonném (ammonium bicarbonate - ABC).
- K roztoku bylo přidáno 10 μ l 100mM DTT rozpuštěného v 50mM ABC o pH 8,5 a byl inkubován při 60 °C 30 minut.
- K roztoku bylo přidáno 15 μ l 100mM IAA rozpuštěného v 50mM ABC o pH 8,5 a byl inkubován při pokojové teplotě ve tmě 1 hodinu. Poté byl obsah přemístěn do větší zkumavky.
- Pro neutralizaci nadbytečného IAA bylo k roztoku přidáno 375 μ l 5mM cysteinu rozpuštěného v 50mM ABC o pH 8,5.
- Ke směsi bylo přidáno 50 μ l metanolu.
- Poté bylo přidáno 5 μ l 0,1 μ g/ μ l trypsinu rozpuštěného v 50mM ABC a směs byla inkubována při 37°C nejméně 2 hodiny.
- Poté byly kuličky separovány.
- Supernatant byl vyjmut a přenesen do nové zkumavky.
- Štěpení bylo zastaveno přidáním 2,5 μ l 10% trifluoroctové kyseliny (TFA) k supernatantu.
- Vzorek byl zamražen při - 20 °C nebo byl rovnou přečištěn.

4.2.2.2 Digesce v gelu

- Byla připravena aparatura pro přípravu polyakrylamidových gelů.
- Byl připraven zaostřovací gel (následující množství vystačí pro přípravu 3 gelů): 4,95 ml H₂O; 6 ml 30% akrylamidového mixu obsahujícího akrylamid a N,N'-metylenbisakrylamid; 3,75 ml 1,5M tris(hydroxymetyl)aminometanu (Tris) o pH 8,8; 0,15 ml 10% SDS; 0,15 ml 10% persulfátu amonného (APS)

- a 6 μ l N, N, N', N'-tetramethylethyldiaminu (TEMED). APS a TEMED byl ke směsi přidán těsně před aplikací mezi skla, jelikož způsobují zesíťování akrylamidu.
- Byl připraven separační gel (následující množství vystačí pro přípravu 3 gelů): 7 ml H₂O; 1,65 ml 30% akrylamidového mixu obsahujícího akrylamid a N,N'-metylenbisakrylamid; 1,25 ml 0,5M Tris o pH 6,8; 0,1 ml 10% SDS; 0,1 ml 10% APS a 20 μ l TEMED. APS a TEMED byl opět ke směsi přidán těsně před aplikací mezi skla.
 - Separací gel byl do 3/4 nalit mezi skla aparatury a překryt vrstvičkou protřepaného butanolu, který vyrovná hladinu separačního gelu do roviny.
 - Po ztuhnutí separačního gelu byl odstraněn butanol a nalit zaostřovací gel až po okraj skel a mezi skla byl vsunut hřebínek, který vytvořil v gelu 10 jamek.
 - Byla sestavena aparatura pro elektroforézu naplněna 1 x Tris glycin SDS (TGS) puforem pro SDS-PAGE.
 - Vzorky byly před nanesením na gel 5 minut ponechány v termomixéru při 99°C a následně krátce centrifugovány. Vzorky byly aplikovány do jamek na gel v dostatečné vzdálenosti, aby se při separaci navzájem neovlivňovaly.
 - Elektroforéza probíhala nejprve u zaostřovacího gelu při 120 V a poté u separačního gelu při 150 V.
 - Po separaci vzorku byla elektroforéza zastavena a gel byl barven v Coomassie Brilliant Blue po dobu 20 minut.
 - Poté byl gel odbarven odbarvovacím a fixačním puforem po dobu 15 minut. Proces byl opakován 3 x. Gel byl do druhého dne ponechán v MS vodě v lednici při 4°C.
 - Druhý den byly pásy gelu obsahující vzorky rozkrájeny skalpelem na jednotlivé frakce, přičemž byly rozděleny jednotlivé pruhy proteinů v gelu do samostatných frakcí. Frakce byly ještě dále rozkrájeny na 1 x 1mm kostičky a přeneseny do zkumavek.
 - K frakcím bylo přidáno 200 μ l acetonitrilu (ACN) a sonikováno 5 minut, poté byl ACN odebrán a bylo přidáno 200 μ l MS H₂O (vody určené pro hmotnostní spektrometrii) a opět 5 minut sonikováno. Tento postup byl opakován až do úplného odbarvení gel od Coomassie Brilliant Blue.
 - Byla provedena redukce. Ke každé frakci bylo přidáno 150 μ l 50mM TCEP a bylo ponecháno 10 minut na termomixéru při 90°C. Poté byl TCEP odebrán.

- Po redukci bylo provedeno promytí přidáním 200 µl MS H₂O, sonikací po dobu 5 minut, odebráním MS H₂O a přidáním 200 µl ACN, sonikací po dobu 5 minut a odebráním ACN.
- Byla provedena alkylace. Ke každé frakci bylo přidáno 150 µl 50mM IAA a inkubováno 1 hodinu ve tmě při pokojové teplotě.
- Po alkykaci bylo provedeno promytí přidáním 200 µl MS H₂O, sonikací po dobu 5 minut, odebráním MS H₂O a přidáním 200 µl ACN, sonikací po dobu 5 minut a odebráním ACN. Tento postup byl opakován 3 x. Poslední krok promývání byl proveden přidáním 200 µl 50% ACN, sonikací po dobu 5 minut a odebráním.
- Ke každé frakci bylo přidáno 150 µl trypsinového pufru, což je 80 x zředěný trypsin o koncentraci 500 ng/µl v etylmorfolinovém pufru (50mM EtMf s 10% ACN o pH 8,3) a inkubováno přes noc při 37°C.
- Další den byla provedena extrakce peptidů. Zkumavky byly zchlazeny na laboratorní teplotu, krátce centrifugovány a kapalný obsah byl přenesen do nových zkumavek.
- K frakcím gelu bylo přidáno 100 µl 0,1% TFA v 80% ACN, sonikováno 10 minut a poté byl obsah přenesen do nových zkumavek z předešlého kroku.
- K frakcím gelu bylo přidáno 150 µl 0,1% TFA, sonikováno 10 minut a poté byl obsah opět přenesen do nových zkumavek z předešlého kroku.
- K frakcím gelu bylo přidáno 100 µl 50% ACN, sonikováno 10 minut a poté byl obsah opět přenesen do nových zkumavek z předešlého kroku.
- Extrakty byly odpařeny na koncentrátoru při pokojové teplotě a poté rozpuštěny v 5 µl 80% ACN s 0,1 % TFA a naředěny 145 µl 0,1% TFA a bylo provedeno přečišťování.

4.2.2.3 Přečišťování pomocí kolony Macro Trap

- Byla sestavena souprava Macro Trap s držákem a propláchnuta pomocí stříkačky Hamilton nejprve 500 µl ACN a poté 500 µl 80% ACN s 0,1% TFA.
- Fáze přečišťování probíhala tak, že kolona Macro Trap byla propláchnuta 500 µl roztoku 0,1%TFA, poté byl do stříkačky Hamilton aplikován celý objem digestu a nanesen na kolonku, znovu byla kolona propláchnuta 500 µl 0,1% TFA. Přečištěné peptidy byly eluovány 200 µl 80% acetonitrilu

s 0,1% TFA do nových zkumavek. Tento postup byl opakován pro další vzorky.

- Eluát přečištěných proteinů byl odpařen v koncentrátoru při pokojové teplotě.
- Poté byly vzorky rozpuštěny v 1 μ l ACN a naředěny 19 μ l 0,1 % kyselinou mravenčí (formic acid – FA) a přeneseny do skleněných vialek s inzertem a víčkem, tím byly vzorky nachystány pro separaci kapalinovou chromatografií a následnou hmotnostní spektrometrii, až do analýzy byly uschovány při - 20°C.

4.2.2.4 Přečišťování pomocí reverzní fáze C18 ve špičkách

- Vzorky byly po digesci odpařeny v koncentrátoru při pokojové teplotě.
- Pro každý vzorek byly ručně připraveny špičky s reverzní fází C18.
- Vzorky byly rozpuštěny ve 100 μ l 0,5% kyseliny octové (acetic acid – AA).
- Do špiček bylo přidáno 100 μ l metanolu a centrifugováno při 1500 \times g, 2-3 minuty.
- Do špiček bylo přidáno 100 μ l 60% ACN s 0,5% AA a centrifugováno při 1500 \times g, 2-3 minuty.
- Do špiček bylo přidáno 100 μ l 0,5% AA a centrifugováno při 1500 \times g, 2-3 minuty.
- Do špiček bylo aplikováno 100 μ l vzorku a centrifugováno při 1500 \times g, 2-3 minuty.
- Do špiček bylo přidáno 100 μ l 0,5% AA a centrifugováno při 1500 \times g, 2-3 minuty.
- Špičky byly přeneseny do nových zkumavek.
- Do špiček bylo přidáno 100 μ l 60% ACN s 0,5% a centrifugováno při 1500 \times g, 2-3 minuty.
- Eluát byl odpařen na koncentrátoru při pokojové teplotě a poté byly peptidy rozpuštěny v 5% ACN s 0,1% FA a tak připraveny pro separaci kapalinovou chromatografií a následnou hmotnostní spektrometrii, až do analýzy byly vzorky uschovány při - 20°C.

4.2.3 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Princip hmotností spektrometrie je popsán v teoretické části. Před samotnou ionizací vzorku a měření hmotnostních spekter musí dojít k separaci jednotlivých peptidů přes analytickou kolonu pomocí kapalinové chromatografie. Kapalinová chromatografie byla provedena na chromatografech: HPLC (high-pressure liquid chromatography) a UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography), který umožňuje separaci při ještě vyšším tlaku a tím i rychlejší separace (Rosenthal I, 2014). Ionizace byla provedena laserem za účasti matrice MALDI spojená s analyzátozem doby letu TOF (time of flight), který měří hmotnost iontů na základě doby letu od zdroje k detektoru. Ionty jsou urychlovány pomocí elektromagnetického pole. Všem iontům je udělena stejná kinetická energie, avšak různé ionty jsou urychleny s různou rychlostí a to v závislosti na poměru hmoty a náboje m/z . Analýza byla provedena pomocí MALDI TOF/TOF hmotnostního spektrometru, což znamená, že je využito TOF reflektromu, který odráží letící ionty na TOF analyzátor a zvyšuje tak dobu letu. Tak je zvýšeno rozlišení, avšak často na úkor citlivosti (Lewis JK, 2000). Také byla využita ionizace pomocí elektrospreje ESI a následná analýza iontů na Orbitrapu s využitím lineární iontové pasti. Zde dochází k oscilaci iontu a frekvence pohybu iontů je pak nepřímo úměrná poměru m/z . Orbitrap poskytuje jak vysoké rozlišení, tak vysokou citlivost (Hu Q, 2005).

4.2.3.1 Analýza HPLC/MS-MALDI TOF/TOF

- HPLC kapalinová chromatografie byla provedena na chromatografu (Agilent Capillary 1200) spojeném se spoterem (Protein Engineer fc).
- Peptidy byly separovány na koloně (Michrom Magic C18AQ) o parametrech: průměr kolony 0,2 mm a délka 150 mm, velikost částic 5 μm a velikost vnitřních pórů 200 Å při průtoku mobilní fáze 4 $\mu\text{l}/\text{minutu}$.
- Byl nastaven nelineární gradient mobilní fáze, kdy bylo v 0-5 minutě nanášeno 95 % roztoku A a 5 % roztoku B, v 5-44 minutě 70 % roztoku A a 30 % roztoku B, ve 44-65 minutě 5 % roztoku A a 95 % roztoku B, v 65-88 minutě 95 % roztoku A a 5% roztoku B.
- roztok A obsahoval 0,1% FA a ACN.

- roztok B obsahoval 0,1% FA.
- Separace jednoho vzorku trvala 88 minut.
- Na MALDI destičku MTP AnchorChip 1536 TF, 6s step byla nejprve spotována matrice, která sestává ze 44 μl 5,29 μM kyseliny α -kyanohydroxyskořicové, 1524 μl ACN, 16 μl 10% TFA a 16 μl 100 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ v 0,1% TFA.
- Poté byly spotovány frakce eluované po 15 – 48,6 minutě od začátku separace.
- Po spotování vzorku byl na destičku aplikován roztok komerčních kalibrantů pro hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF obsahující peptidy bradykinin 1 – 7 (757,39916 Da), angiotensin II (1046,54180 Da), angiotensin I (1296,68480 Da), substance P (1347,73540 Da), bombesin (1619,82230 Da), renin substrát (1758,93261 Da), ACTH klip 1 – 17 (2093,08620 Da), ACTH klip 18 – 39 (2465,19830 Da) a somatostatin 28 (3147,47100 Da).
- Lyofilizovaná směs kalibrantů byla rozpuštěna ve 250 μl 0,1% TFA.
- 15 μl kalibračního roztoku bylo smícháno se 135 μl 0,1% TFA, 200 μl etanolu a 100 μl roztoku 5,29mM α -kyanohydroxyskořicové kyseliny v acetonu.
- Na jeden kalibrační spot bylo aplikováno 0,5 μl roztoku kalibrantů.
- Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji Bruker Ultraflex extreme v refletronovém pozitivním módu při relativní síle laseru 25 %.
- MS spektra byla měřena v rozsahu 600 – 3500 m/z, detekce peptidů byla potlačena do hodnoty 500 Da.
- Rozlišení detektoru bylo nastaveno na maximální hodnotu 4 GS/s, citlivost byla nastavena na hodnotu 100 mV.
- Výsledné spektrum bylo sestaveno z 2000 zásahů. Měření bylo provedeno při napětí 25,24 kV na zdroji 1, 22,79 kV na zdroji 2; 7,46 kV na čočce; 26,60 kV na refletronu 1; 13,33 kV na refletronu 2 a při zpožděné extrakci 110 ns. Napětí na refletronovém detektoru bylo rovno 2426 V.
- Získaná hmotnostní spektra byla automaticky zpracována v softwarech WARP-LC a FlexAnalysis, které vybraly peptidy pro následnou MS/MS analýzu. Hmotnostní spektra byla porovnána v softwaru ProteinScape a identifikované proteiny vyhledány algoritmy Mascot a Phenyx.

4.2.3.2 Analýza UHPLC/MS-ESI Orbitrap

- LC-MS/MS analýza byla umožněna spojením kapalinové chromatografie (UltiMate 3000) přes ionizační zdroj (NanoEasySpray) s hmotnostním spektrometrem (Orbitrap Elite)
- 20 µl peptidové směsi bylo nastříknuto a zachyceno na C18 Trap koloně (Acclaim PepMap100) o parametrech: průměr kolony 0,075 mm a délka 2000 mm, velikost částic 3 µm, a velikost pórů 100 Å při průtoku 5 µl/minutu pomocí mobilní fáze 0,1% TFA. Doba průtoku jednoho vzorku byla 95 minut.
- Mezi každým vzorkem byl nastříknut kontrolní vzorek s BSA. Doba průtoku byla nastavena na 65 minut.
- Po 10 minutách nanášení a promývání byly peptidy přeneseny na analytickou C18 kolonu (PepMap) o parametrech: průměr kolony 0,075 mm a délka 15000 mm, velikosti částic 3 µm a velikost pórů 100 Å a separovány pomocí lineárního gradientu (2 - 40% mobilní fáze B) při průtoku 275 nl/minutu po dobu 2 hodin.
- Poté byla kolona promyta 90% mobilní fází B a následně byla ekvilibrována pomocí 2% mobilní fáze B.
- Mobilní fáze A byla složena z 2% ACN a 0,1% FA.
- Mobilní fáze B byla složena z 80% ACN, 10% trifluoroetanolu a 0,08% FA.
- Hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite pracoval v pozitivním módu.
- MS spektra byla měřena v rozsahu m/z 300 - 1700 na Orbitrapu při rozlišení 120000 (při hodnotě m/z 400), AGC (automatic gain control), což je množství iontů, které proudí do Orbitrapu za určitý čas, bylo nastaveno na hodnotu 1×10^6 iontů a maximální akviziční čas byl nastaven na 200 ms.
- Minimální MS signál pro spuštění MS/MS experimentu byl nastaven na 1000.
- Hodnoty m/z spouštějící fragmentaci peptidů (MS/MS experimenty) byly zařazeny na exluzní list po dobu 60 s.
- Pro všechny případy byl nastaven jeden mikroskan a bylo umožněno provést maximálně 10 MS/MS experimentů.
- Bylo využito funkce interní recalibrace hmotnostního spektra na iontu o m/z 445,120025 (polydimetylcyclosiloxan).
- CID (collision-induced dissociation) fragmentace byla provedena v iontové pasti při "target value" (počet iontů do plné iontové pasti) 3000 iontů,

maximální akviziční čas byl nastaven na 200 ms, bylo použito 35% kolizní energie (energie potřebná pro fragmentaci peptidů), Q hodnota byla nastavena na 0,25 a aktivační čas byl nastaven na 10 ms.

- Hmotnostní spektra byla porovnána v softwaru MaxQuant a identifikované proteiny vyhledány algoritmem Andromeda.
- Hmotnostní spektrometr a kapalinová chromatografie byla ovládána pomocí programu Xcalibur.

5 Výsledky

Pomocí afinitní purifikace byly izolovány a identifikovány kandidátní proteiny, které by mohly být cílovými proteiny testovaných indazolových derivátů (14C, 41C a 44C). U těchto látek, jak biotinylovaných, tak volných byla zjištěna hodnota IC_{50} na různých buněčných kulturách pracovníky laboratoře tkáňových kultur, viz Tab. 2. Izolace a identifikace kandidátních proteinů byla provedena díky kombinaci afinitní purifikace a hmotnostní spektrometrie.

Tab. 2: Hodnoty IC_{50} biotinylovaných a volných indazolových derivátů 14C, 41C a 44C na různých buněčných kulturách

Buněčná linie	A549		CCRF-CEM		CEM-DNR		HCT116		HCT116p53		K562		K562-TAX	
	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD	IC_{50}	SD
Biotinylovaná látka 14C	82,2	18,5	22,9	4,3	88,7	9,1	78,2	6,8	98,7	3,8	83,8	16,9	85,2	12,4
Biotinylovaná látka 41C	50,3	12,5	8,8	1,1	87,2	10,4	20,0	3,3	48,7	13,9	32,4	14,7	48,7	2,5
Biotinylovaná látka 44C	41,7	20,4	8,1	0,7	70,7	7,8	34,0	4,9	48,2	15,0	34,2	19,9	24,2	3,5
Volná látka 14C	81,4	23,3	19,1	9,9	50,0	3,9	12,7	1,5	45,4	8,0	27,9	12,3	42,4	2,6
Volná látka 41C	12,3	1,7	12,9	0,6	3,2	0,4	8,3	1,7	2,1	0,2	8,2	1,2	1,9	0,2
Volná látka 44C	5,2	2,0	5,2	1,8	2,5	0,4	2,5	0,4	0,7	0,1	2,6	0,3	0,7	0,1

A549 - buněčná linie odvozená od epitelálního adenokarcinomu plic, CCRF-CEM - buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie, CEM-DNR - buněčné linie CEM rezistentní na daunorubicin, HCT116 - buněčná linie odvozená karcinomu tlustého střeva, HCT116p53 - buněčná linie odvozená karcinomu tlustého střeva s lentivirovým vektorem, který obnovuje funkci p53, K562 - buněčná linie odvozená od erytromyeloblastické leukémie, K562-TAX - buněčná linie odvozená od erytromyeloblastické leukémie rezistentní k paclitaxelu. IC_{50} - koncentrace testovaných látek, při které je 50% viabilita buněk, SD - směrodatná odchylka

Z počátku bylo využito strategie afinitní purifikace, kde nedocházelo ke kompetici mezi vázanou a volnou látkou, byly využity magnetické kuličky a digesce byla prováděna v roztoku. Peptidy byly přečištěny na koloně Macro Trap. LC-MS analýza byla provedena pomocí HPLC/MS-MALDI TOF/TOF, což odpovídá **metodám 1, 2, 6 a 7** v Tab. 12. Poměr intenzit těžkých a lehkých peptidů vázajícího se proteinu (H/L) by měl být ve prospěch těžkých peptidů ($H/L > 1$), viz metodika.

Nejprve byl testován indazolový derivát 14C a poté stejnou metodou 41C, který má nižší hodnoty IC_{50} . Oba experimenty byly zopakovány ještě jednou. Při testování indazolového derivátu se zkratkou 14C, viz Tab. 3, byly identifikovány kandidátní protein histon H 1,5, který měl poměr H/L 1,27. Tento proteiny byl identifikován na základě 13 unikátních peptidů při skóre 1265,4, což ukazuje na spolehlivost identifikace. Heat shock protein HSP 90-beta byl sice identifikován z 9 peptidů, ale poměr H/L byl nižší než 1 stejně jako exportin-2, který byl identifikován na základě jen 4 peptidů, čímž narůstá pravděpodobnost chybné identifikace proteinu.

Testován byl stejnou metodou také indazolový derivát se zkratkou 41C, viz Tab. 4, kde byl kandidátním proteinem opět histon H 1,5 s poměrem H/L 1,53, který byl identifikován z 11 peptidů při skóre 1075,7. Ostatní identifikované proteiny byly různé ribozomální proteiny a vimentin.

Tyto dva experimenty byly ještě jednou opakovány. Při testování látky 14C, viz Tab. 5, byl opět ukázán jako kandidátní protein heat shock protein HSP 90-beta s poměrem H/L 1,31. Také cytoplasmatický aktin 1 můžeme považovat za kandidátní protein s poměrem H/L 1,24 a identifikací ze 12 peptidů při skóre 942,7. Identifikována byla také syntáza mastných kyselin a příbuzný protein heat shock proteinu. Nejvyšší poměr H/L zde měl vimentin o hodnotě 3,9 ale byl identifikován pouze na základě 1 peptidu, není tedy spolehlivě identifikován. U látky 41C, viz Tab. 6 byl také identifikován vimentin s poměrem H/L 3,79, ale identifikován byl jen ze 2 peptidů. Také byl identifikován cytoplasmatický aktin a ribozomální proteiny s poměrem vyšším než 1 byly také identifikovány jako v předchozím experimentu.

Tab. 3: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace bez kompetice s látkou 14C, experiment 1

Protein	Skóre	Peptidy	Poměr H/L
histon H1,5	1265,4	13	1,27
heat shock protein HSP 90-beta	1036,8	9	0,93
exportin-2	198,1	4	0,94

Tab. 4: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace bez kompetice s látkou 41C, experiment 1

Protein	Skóre	Peptidy	Poměr H/L
histon H1,5	1075,7	11	1,53
60S ribosomální protein L27a	367,5	4	1,08
40S ribosomální protein S29	270,0	6	1,26
vimentin	163,5	2	1,07
putativní 60S ribosomální protein L39	87,0	2	3,72

Tab. 5: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace bez kompetice s látkou 14C, experiment 2

Protein	Skóre	Peptidy	Poměr H/L
cytoplasmatický actin-1, upraven na N-konci	942,7	12	1,24
heat shock protein HSP 90-beta	490,2	7	1,31
syntáza mastných kyselin	156,1	2	1,81
heat shock proteinu příbuzný protein (71 kDa)	145,7	2	1,98
vimentin	98,8	1	3,90

Tab. 6: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace bez kompetice s látkou 41C, experiment 2

Protein	Skóre	Peptidy	Poměr H/L
vimentin	113,7	2	3,79
cytoplasmatický actin-1, upraven na N-konci	100,7	2	1,62
40S ribosomální protein S29	81,1	1	1,78

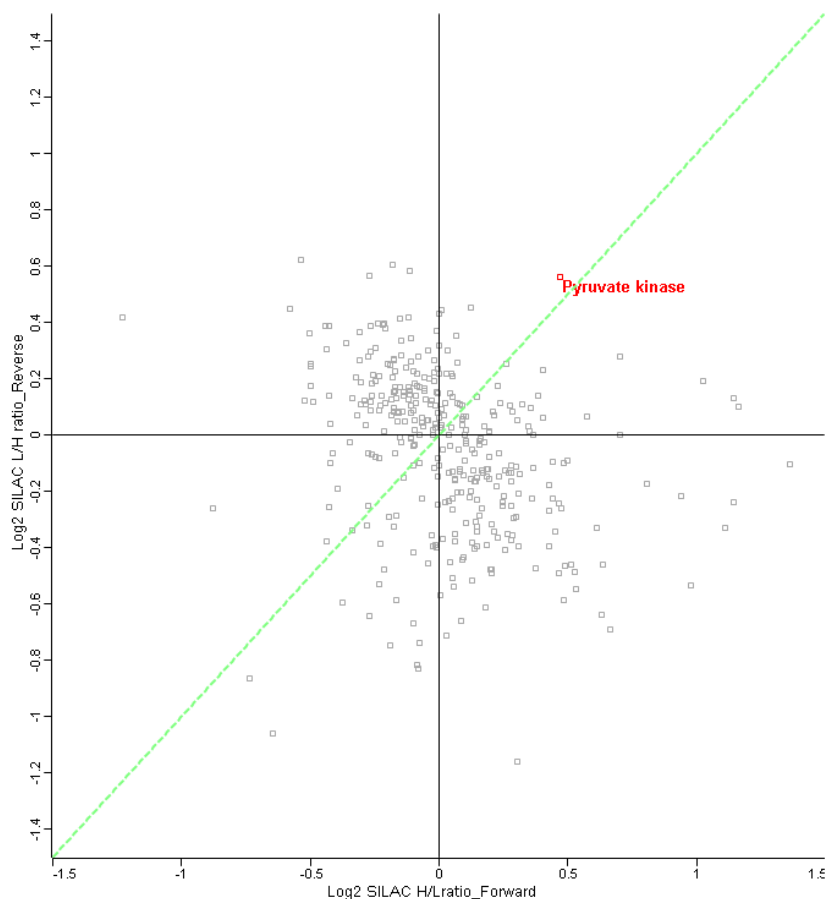
Druhá strategie afinitní purifikace využívala kompetici mezi vázanou biotinylovanou látkou a stejnou volnou látkou s využitím LC-MS analýzy UHPLC/MS-ESI Orbitrap. Kandidátní proteiny se vyznačují přibližně stejnou kladnou hodnotou log₂ poměrů H/L a L/H, přičemž ty nejspecifičtější vázané proteiny by měly dosahovat hodnot kolem 5, viz metodika. Nejprve byl testován indazolový derivát se zkratkou 14C, přestože jeho hodnoty IC₅₀ nejsou tak nízké jako u látky 44C. K dispozici bylo totiž větší množství této látky, a proto bylo záměrem jej využít pro optimalizaci metody. Nejprve byla využita **metoda 3**, viz. Tab. 12, kdy afinitní purifikace probíhala na magnetických kuličkách a byl využit čerstvý proteinový lyzát. Proteiny byly po purifikaci skladovány při - 20°C v lyzačním pufru, aby nedocházelo k uvolňování navázaných proteinů. Poté byla provedena digesce v roztoku a přečištění pomocí Macro Trap kolony.

Jak je vyznačeno v Grafu 2, kandidátním proteinem tohoto experimentu je pyruvát kináza, která se vyskytuje v lineární linii a má podobné hodnoty log₂ poměrů H/L a L/H kolem 0,5. Přesnější hodnoty nabízí Tab. 7, kde jsou uvedeny další kandidátní proteiny: podjednotka komplexu THO 3 a složka exocystického komplexu 2. Tyto hodnoty jsou však nízké, abychom mohli říct, že by se pyruvát kináza mohla specificky vázat na látku 14C. Ostatní hodnoty se pohybují v oblasti nespecificky vázaných proteinů, viz Graf 3.

Tab. 7: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace s kompeticí s látkou 14C s využitím magnetických kuliček a digesce v roztoku

Varianta A Log ₂ H/L	Varianta B Log ₂ L/H	Peptidy varianta A	Peptidy varianta B	Protein
0,26	0,25	3	2	složka exocystického komplexu 2
0,47	0,56	2	2	pyruvát kináza izoenzym M1/M2
0,40	0,23	2	2	podjednotka komplexu THO 3

Graf 2: Poměry H/L (varianta A) a L/H (varianta B) u látky 14C s využitím afinitní purifikace na magnetických kuličkách a digesce v roztoku



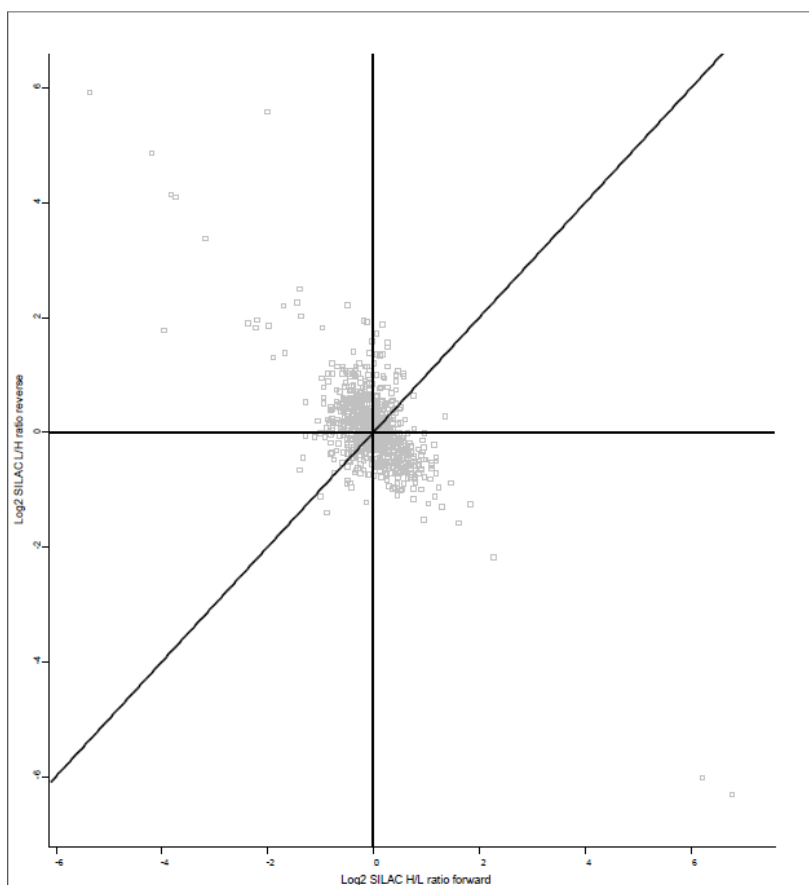
Další experiment byl proveden pomocí **metody 4**, viz Tab. 12. tzn. stejně jako v předchozím případě i se stejnou látkou, jen s tím rozdílem, že digestce byla provedena v gelu místo v roztoku. Při předchozím experimentu byla totiž v průběhu digestce v roztoku pozorována precipitace. Digestce v gelu umožnila identifikaci přes 1700 proteinů, tzn. více než při digestci v roztoku. V tomto experimentu je nejvýznamnějším kandidátním proteinem myosin-10, který byl identifikován z 33 peptidů u varianty A a z 38 peptidů u varianty B, ovšem jeho hodnoty log₂ poměrů H/L (0,56) a L/H (1,01) jsou nízké a naznačují nespecifickou vazbu, viz Tab. 8. V tabulce jsou uvedeny také mitochondriální vazebný protein jednořetězcové DNA a podjednotka komplexu kondenzinu-1, které však byly identifikovány na základě 1-2 peptidů, což je opět málo spolehlivé. Jak je také vidět na Grafu 3 většina hodnot se pohybuje kolem středu os, což značí nespecificky vázající se proteiny. Některé

odlehle hodnoty se nacházejí v levém horním kvadrantu, což může být kontaminace keratiny a proteiny z vnějšího prostředí.

Tab. 8: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace s kompeticí s látkou 14C s využitím magnetických kuliček a digesce v gelu

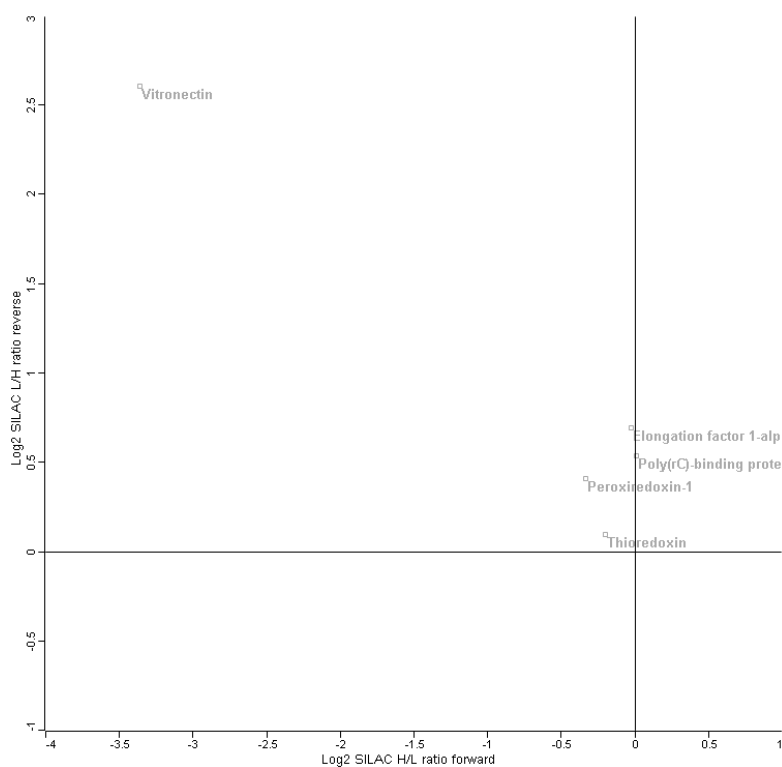
Varianta A Log2 H/L	Varianta B Log2 SILAC L/H	Peptidy varianta A	Peptidy varianta B	Protein
0,56	1,01	33	38	myosin-10
0,58	0,98	1	1	mitochondriální vazebný protein ss DNA
0,74	0,64	1	2	podjedotka komplexu kondenzinu 1

Graf 3: Poměry H/L (varianta A) a L/H (varianta B) u látky 14C s využitím afinitní purifikace na magnetických kuličkách a digesce v gelu



Poté byla afinitní purifikace vyzkoušena na jiné mobilní matrici a to na agarózových kuličkách, viz **metoda 5** v Tab. 12. Při afinitní purifikaci byla opět testována látka 14C. Z důvodu optimalizace metody byl však použit zamražený lyzát. Digesce byla prováděna v roztoku. Proteiny byly opět přečištěny pomocí kolony Macro Trap. Bylo identifikováno velmi malé množství proteinů, které se navíc nespecificky vázaly nebo byly identifikovány odlehlé hodnoty v levém horním kvadrantu, viz Graf 4.

Graf 4: Poměry H/L (varianta A) a L/H (varianta B) u látky 14C s využitím afinitní purifikace na agarózových kuličkách a digesce v roztoku



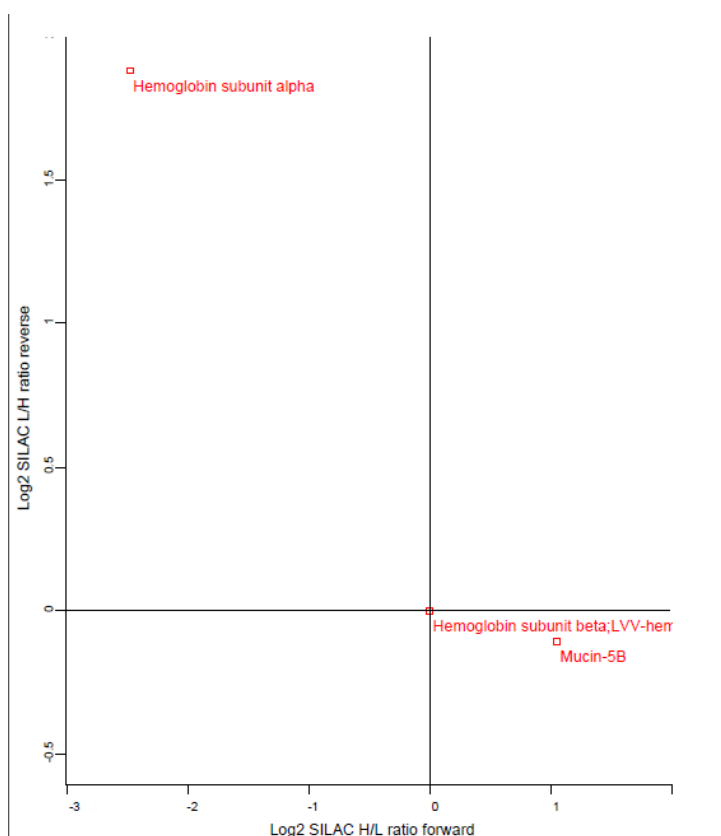
Následně byl ověřen rozdíl mezi digescí v roztoku a v gelu pomocí **metod 8 a 9**, viz Tab. 12. Afinitní purifikace byla provedena na agarózových kuličkách. Zde byl již testován indazolový derivát se zkratkou 44C. V rámci optimalizace metody byl použit opět zamražený lyzát. Proteiny však byly po digesci přečištěny pomocí reverzní fáze C18 ve špičkách.

Při digesci v roztoku byly identifikovány pouze 3 nevýznamné proteiny, viz Graf 5. Při digesci v gelu bylo proteinů identifikováno mnohem víc, kolem 800. Nejvýznamnějším kandidátním proteinem tohoto experimentu je alfa-enoláza, která

byla identifikována z 8 peptidů u obou variant a měla nejvyšší a přibližně stejné hodnoty log2 poměrů H/L (1,53) a L/H (1,35), viz Tab. 9. Dalším proteinem v tabulce je cytoplazmatická cystein - RNA ligáza, která byla identifikována na základě 4 a 6 peptidů a s hodnotami poměrů H/L (0,74) a L/H (0,9). Další identifikované proteiny, anexin a septiny byly identifikovány na základě malého množství peptidů a jejich hodnoty log2 poměry H/L a L/H jsou až na septin-2 nerovné.

Většina proteinů se však vyskytuje v oblasti nespecificky vázaných proteinů, viz Graf 6. Velké množství proteinů se objevuje také v levém dolním kvadrantu, kde se nacházejí proteiny precipitované s matricí. V grafu jsou také odlehle hodnoty v pravém horním kvadrantu, což může být kontaminace keratiny a proteiny z vnějšího prostředí.

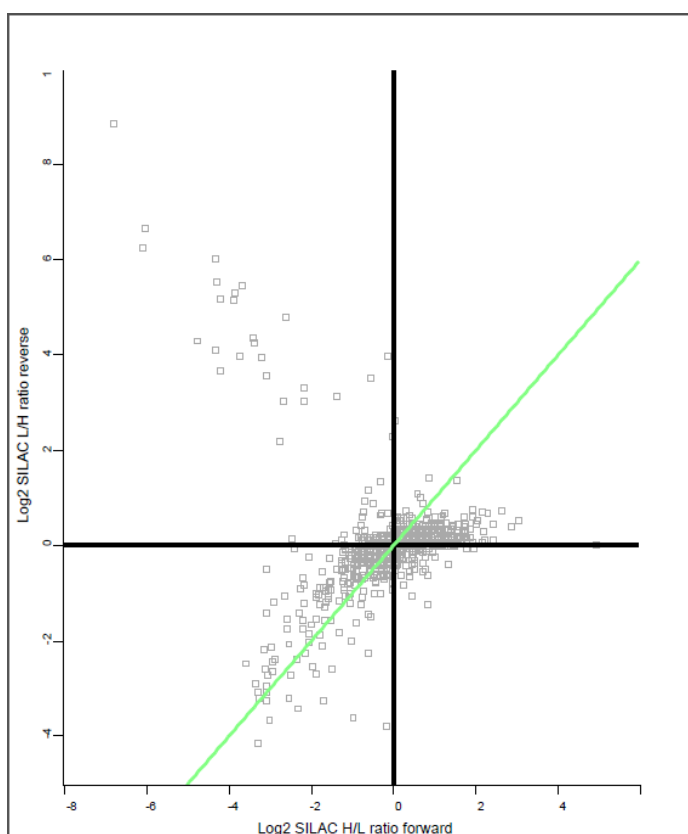
Graf 5: Poměry H/L (variant A) a L/H (varianta B) u látky 44C s využitím afinitní purifikace na agarózových kuličkách a digesce v roztoku



Tab. 9: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace s kompeticí s látkou 44C s využitím agarózových kuliček a digesce v gelu, experiment 1

Varianta A Log2 H/L	varianta B Log2 L/H	Peptidy varianta A	Peptidy varianta B	Protein
1,53	1,35	8	8	alfa-enoláza
0,74	0,90	4	6	cytoplazmatická cystein-RNA ligáza
1,93	0,78	4	3	septin-6
0,82	0,71	2	2	septin-2
2,62	0,75	3	2	anexin-A6

Graf 6: Poměry H/L (varianta A) a L/H (varianta B) u látky 44C s využitím afinitní purifikace na agarózových kuličkách a digesce v gelu, experiment 1



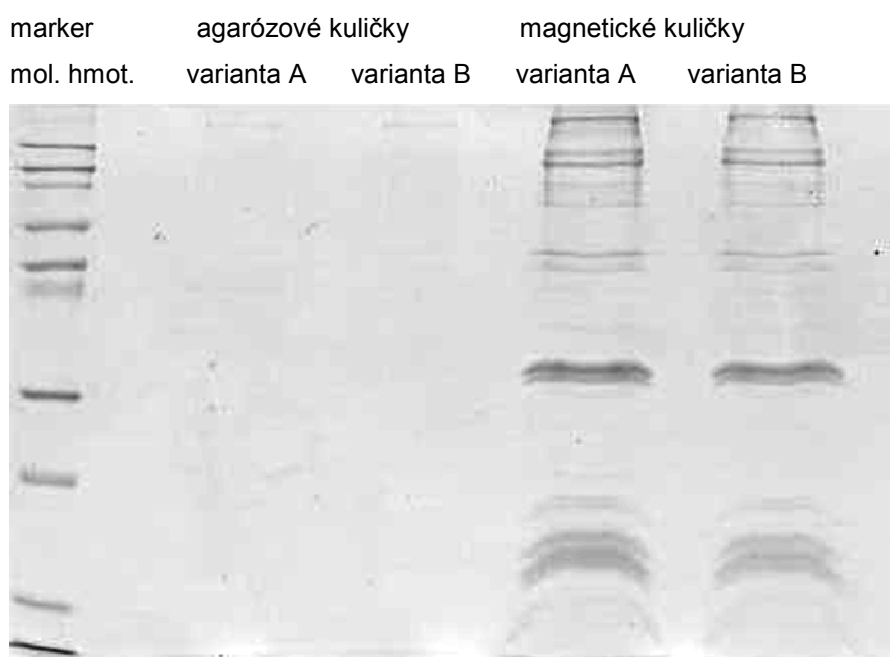
V rámci optimalizace byla také porovnána afinitní purifikace na agarózových a magnetických kuličkách pomocí **metod 10 a 11**, viz Tab. 12. Byla testována látka 44C a byl použit zamražený lyzát. V průběhu afinitní purifikace došlo ještě k jedné změně a to vynechání blokačního kroku s BSA, který by mohl být zdrojem

nespecifických vazeb. Digesce byla provedena v gelu. Proteiny byly přečištěny pomocí reverzní fáze C18 ve špičkách. Po analýze SDS-PAGE variant A a B na agarózových a magnetických kuličkách bylo zřetelné, že magnetické kuličky mají větší schopnost vázat proteiny, viz Obr. 12. Hmotnostní spektrometrie však prokázala identifikaci přibližně 700 proteinů jak u afinitní purifikace na agarózových, tak na magnetických kuličkách.

Při afinitní purifikaci na agarózových kuličkách byl identifikován s nejvyššími hodnotami \log_2 poměru H/L (1,53) a L/H (2,86) protein serpin-B12, viz Tab. 10. Byl však identifikován pouze na základě 2 a 3 peptidů. Argináza byla sice identifikována na základě 4 a 5 peptidů, ale hodnoty \log_2 poměrů H/L (0,93) L/H (1,26) jsou nižší než u serpinu-B12. Co se týče afinitní purifikace na magnetických kuličkách, zde byl nejvýznamnějším identifikovaným proteinem lamin-B1 s hodnotami \log_2 poměru H/L (0,89) a L/H (0,66). Lamin-B1 byl identifikován na základě 7 peptidů v obou variantách, viz Tab. 11.

Jak lze vidět na Grafech 7 a 8 žádný z identifikovaných proteinů není specificky nevázející se na testovanou látku 44C. Můžeme uvažovat snad pouze o kandidátních proteinech jako je serpin-B12 u agarózových kuliček a lamin-B1 u magnetických kuliček, jak je ukázáno v detailech grafů. Identifikovány byly pouze nespecifické proteiny kolem středu os. Odlehlé hodnoty mohou být způsobeny kontaminací keratiny a jinými proteiny z vnějšího prostředí, které jsou charakteristické tím, že se vyskytují pouze v neznačené formě, byly pozorovány v pravém horním kvadrantu. Hodnoty, které byly pozorovány v levém dolním kvadrantu, byly nejspíš výsledkem precipitace s matricí. Vyřazení blokačního kroku s BSA pro minimalizování nespecifických vazeb nemělo pozorovatelný účinek.

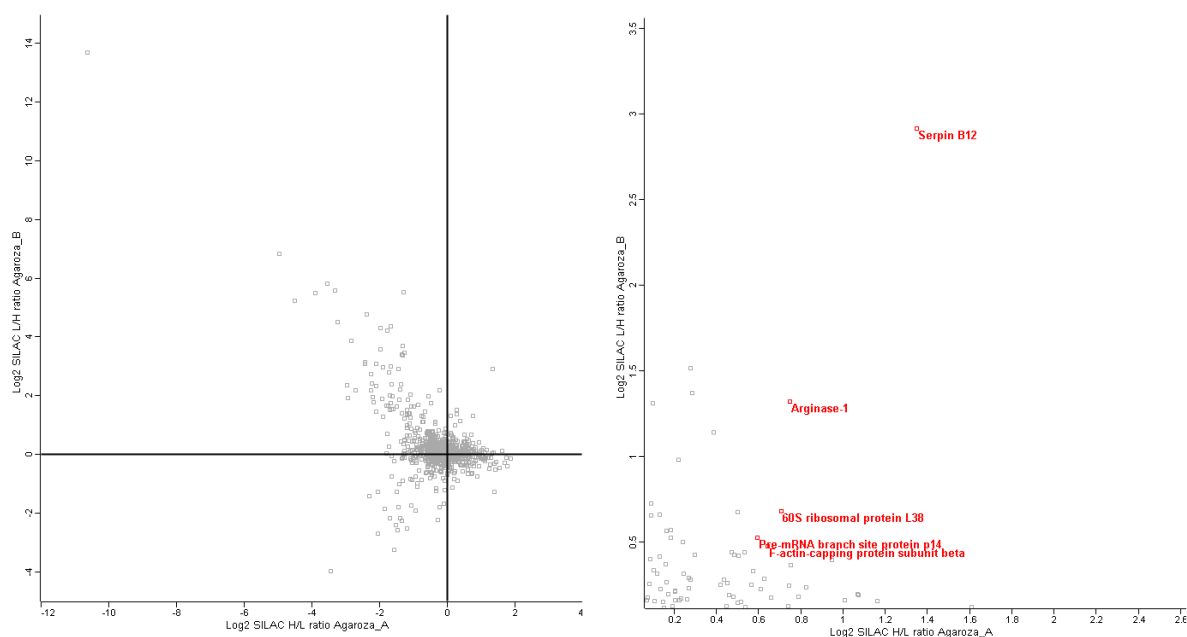
Obr. 12: SDS-PAGE gel varianty A a B po afinitní purifikaci proteinů u látky 44C imobilizované na agarózových a magnetických kuličkách



Tab. 10: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace s kompeticí s látkou 44C s využitím agarózových kuliček a digesce v gelu, experiment 2

Varianta A Log2 H/L	Varianta B Log2 L/H	Peptidy varianta A	Peptidy varianta B	Protein
1,53	2,86	2	3	serpin-B12
0,93	1,26	4	5	argináza-1
0,89	0,62	3	3	60S ribozomální protein L38
0,69	0,62	2	3	protein podobný kinezinu KIF2C

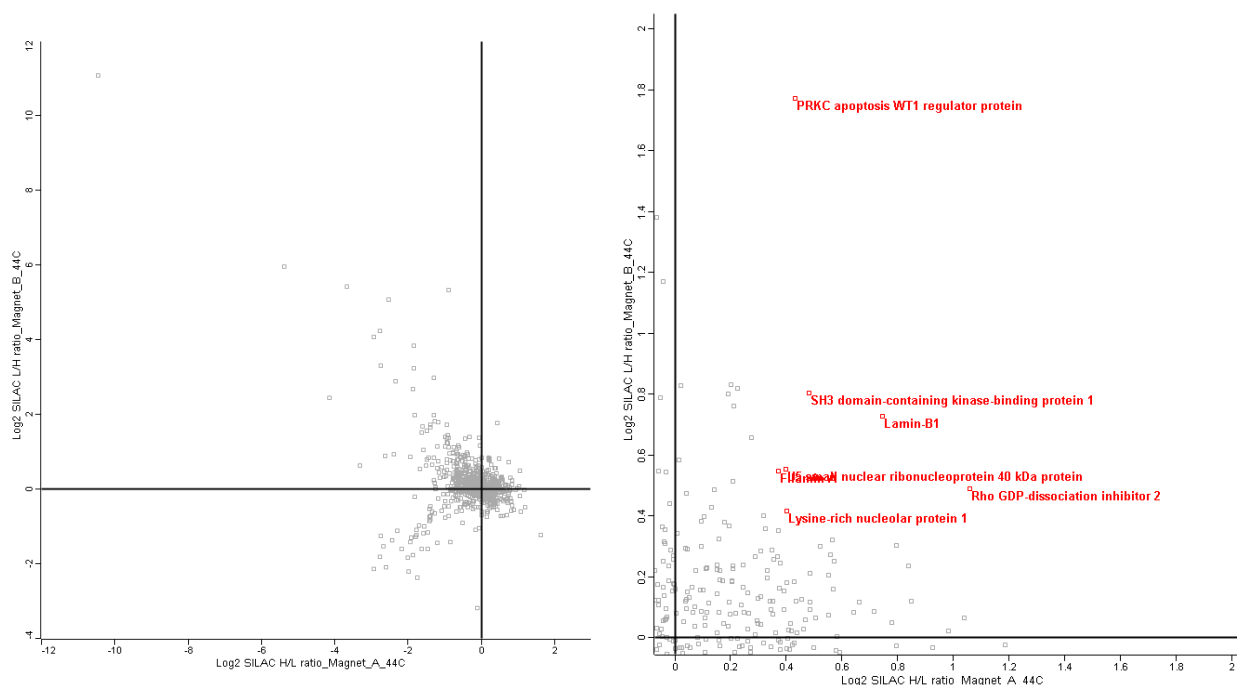
Graf 7: Poměry H/L (varianta A) a L/H (varianta B) u látky 44C s využitím afinitní purifikace na agarózových kuličkách a digesce v gelu, experiment 2



Tab. 11: Výběr kandidátních proteinů identifikovaných pomocí afinitní purifikace s kompeticí s látkou 44C s využitím magnetických kuliček a digesce v gelu, experiment 2

Varianta A Log2 H/L	Varianta B Log2 L/H	Peptidy varianta A	Peptidy varianta B	Protein
0,89	0,66	7	7	lamin-B1
0,62	0,74	3	3	Kinázoový vazebný protein 1, obsahující doménu SH3
0,57	1,70	2	2	PRKC apoptotický regulační protein WT1

Graf 8: Poměry H/L (varianta A) a L/H (varianta B) u látky 44C s využitím afinitní purifikace na magnetických kuličkách a digesce v gelu



Všechny použité metody při testování indazolových derivátů shrnuje Tab. 12, která také zahrnuje tři nejvýznamnější proteiny u každé použité metody. Některé proteiny byly opakovaně prokázány u různých i stejných testovaných látek u **metod 1, 2, 6 a 7**, kdy byla využita afinitní purifikace bez kompetice na magnetických kuličkách. Byla provedena digesce v roztoku a přečištění peptidů přes kolonu Macro Trap a byla provedena LC-MS analýza pomocí HPLC/MS-MALDI TOF/TOF. Histon H 1,5 byl identifikován u látky 14C i 41C, heat shock protein 90-beta byl identifikován opakovaně u látky 14C, vimentin byl identifikován u látky 14C i 41C a 40S ribozomální protein S29 byl opakovaně identifikován u látky 41C.

Při strategii, kdy byla použita afinitní purifikace s kompeticí s využitím LC-MS analýzy pomocí UHPLC/MS-ESI Orbitrap, bylo prováděno více změn v rámci optimalizace a byly vždy identifikovány různé proteiny, viz **metody 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11**.

Tab. 12: Shrnující tabulka použitých metod a nejvýznamnějších identifikovaných proteinů při testování indazolových derivátů 14C, 41C a 44C

Látky →	14C					41C		44C			
Číslo metody →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Metody ↓											
Afinitní purifikace bez kompetice	X	X				X	X				
Afinitní purifikace s kompeticí			X	X	X			X	X	X	X
Afinitní purifikace na magnetických kuličkách	X	X	X	X		X	X				X
Afinitní purifikace na agarózových kuličkách					X			X	X	X	
Digesce v roztoku	X	X	X		X	X	X	X			
Digesce v gelu				X					X	X	X
Přečištění na koloně Macro Trap	X	X	X	X	X	X	X				
Přečištění přes reverzní fázi C18 ve špičkách								X	X	X	X
LC-MS analýza pomocí HPLC/MS-MALDI TOF/TOF	X	X				X	X				
LC-MS analýza pomocí UHPLC/MS-ESI Orbitrap			X	X	X			X	X	X	X
Proteiny ↓											
1.nejvýznamější	histon 1,5	cytoplazm. actin-1	složka exocis. komplexu 2	myosin-10	-	histon 1,5	vimentin	-	alfa-enoláza	serpin-B12	lamin-B1
2.nejvýznamější	HSP 90-beta	HSP 90-beta	pyruvát kináza izoenzym	mitochon. vazebný protein ss DNA	-	40S ribozom. protein S29	cytoplazm. actin-1	-	cytoplazm. cystein-RNA ligáza	argináza-1	kinázový vazebný protein-1
3.nejvýznamější	exportin-2	vimentin	podjednotka komplexu THO3	podjednotka komplexu kondenzinu 1	-	vimentin	40S ribozom. protein S29	-	septin-6	60S ribozomal. protein L38	PRKC apoptotický regulační protein

6 Diskuze

Při identifikaci molekulárních cílů protinádorových léčiv (indazolových derivátů) pomocí afinitní purifikace došlo v rámci optimalizace metody k mnoha změnám. Celkem byly testovány tři indazolové deriváty (14C, 41C a 44C) pomocí dvou strategií afinitní purifikace. Byly otestovány dva typy mobilních afinitních matic: agarózové a magnetické kuličky. Digesce probíhala buď v roztoku, nebo v gelu. Peptidy byly přečišťovány na koloně Macro Trap nebo reverzní fázi C18. LC-MS analýzy byla provedena jak pomocí HPLC/MS-MALDI TOF/TOF, tak UHPLC/MS-ESI Orbitrap.

Při využití strategie afinitní purifikace bez kompetice s volnou a vázanou biotinylovanou látkou 14C a 41C na magnetických kuličkách, kdy byla digesce provedena v roztoku, peptidy byly přečištěny na koloně Macro Trap a LC-MS analýzy pomocí HPLC/MS-MALDI TOF/TOF, tedy **metod 1, 2, 6 a 7**, viz Tab. 12, bylo identifikováno několik kandidátních proteinů. Většinou to však byly histony, ribozomální nebo heat shock proteiny, které se v buňce vyskytují v hojném počtu (Petraček J, 2008) a proto je málo pravděpodobné, že by mohly být cílovými proteiny těchto indazolových derivátů. Například histon H 1,5, který byl identifikován v prvním experimentu u obou látek, se účastní organizace chromatinu. Jeho funkce má klíčový význam v genové expresi a byla spojena s agresivní formou karcinomu prostaty (Hechtman JF, 2013). Při testování látky 14C byl identifikován heat shock protein HSP 90-beta, který vykazuje vyšší hladinu exprese v nádorové tkáni žaludku než v normální tkáni (Liu X, 1999). Zajímavým kandidátním proteinem je vimentin, který se objevuje u obou testovaných látek. Podle Petraček J (2008) je sice také jedním z abundančních proteinů, ale podle Satelli A (2011) je vimentin potenciálním molekulárním cílem protinádorové terapie. Vimentin patří do skupiny proteinů intermediálních filament. V normálních mezenchymálních buňkách je exprimován v přiměřené míře, udržuje buněčnou integritu a chrání buňku před stresem. V různých typech nádorových buněk je vimentin nadměrně exprimován, což souvisí s progresivním růstem nádoru (Satelli A, 2011).

Strategie afinitní purifikace využívající kompetice mezi volnou a vázanou biotinylovanou látkou 14C a 44C přinesla ve smyslu specifčnosti vazby přesnější

výsledky. Nezdařilo se sice identifikovat přímo specificky vázající se proteiny na indazolové deriváty, ale byly jsme schopni rozlišit nespecificky vázané proteiny nebo alespoň možné kandidátní proteiny.

Při afinitní purifikaci na magnetických kuličkách pro látku 14C, kdy byla využita digesce v roztoku, viz **metoda 3** v Tab. 12, byl určen jako kandidátní protein pyruvát kináza. Pyruvát kináza katalyzuje konečný krok glykolýzy a je rozhodující regulátor spotřeby glukózy. Bylo zjištěno, že nadměrná exprese pyruvát kinázy-2 podporuje migraci a adhezi buněk kolorektálního karcinomu, a proto by mohla sloužit jako terapeutický cíl pro metastazující kolorektální karcinom (Yang P, 2014). Petrak J (2008) však uvádí pyruvát kinázy na seznam abundatních proteinů, vyskytují se v buňce v hojném počtu, a tak je větší pravděpodobnost, že se váží na danou látku nespecificky.

Při afinitní purifikaci na magnetických kuličkách pro látku 14C, kdy však byla využita digesce v gelu, viz **metoda 4** v Tab. 12, byl nejvýznamnějším identifikovaným proteinem myosin-10, který podle databáze Uniprot hraje roli v cytokinezi a specializovaných funkcích jako je sekrece. Myosin-10 má vliv na tvar buňky a během buněčného dělení se podílí na reorganizaci buňky v její centrální části. Myosin-10 také hraje roli při embryonálním vývoji kůry mozkové (Ju XD, 2014). Myosin je však cytoskeletární protein a také se v buňce vyskytuje v hojném počtu (Petrak J, 2008).

Při identifikaci kandidátních proteinů pomocí afinitní purifikace na agarózových kuličkách pro látku 44, kdy byla použita digesce v gelu, viz **metoda 9** v Tab. 12, byla nejvýznamnější kandidátním proteinem alfa-enoláza. Alfa-enoláza neboli enoláza-1 je multifunkční vysoce abundantní glykolytický enzym, který reverzibilně dehydratuje 2-fosfo-*p*-glycerát na fosfoenolpyruvát při glykolýze a glukoneogenezi. Tento enzym může sloužit také jako receptor pro plasminogen na buněčném povrchu a v jádře může být alternativně translatován jako nádorový supresor. Alfa-enoláza je také heat shock protein a protein hypoxie a je považována za diagnostický marker nádorového onemocnění. Pomocí protilátek proti alfa-enoláze můžeme odhalit bezpočet autoimunitních chorob. Ve spojení s dalšími proteiny hraje roli v metabolismu energií, při proliferaci a je významným regulátorem při mnoha stresových situacích (Petrak J, 2008). Dalšími identifikovanými proteiny byly cytoskeletární proteiny septiny a anexiny, které jsou také abundantní (Petrak J, 2008).

Při porovnávání dvou mobilních afinitních matric: agarózové a magnetické kuličky, bylo využito digesce v gelu a byl vynechán blokační krok s BSA, viz **metoda 10 a 11** v Tab. 12. Zde byly identifikovány jako kandidátní proteiny serpin-B12 a argináza-1 u agarózových kuliček a lamin-B1 u magnetických kuliček. Serpin-B12 je podle databáze Uniprot inhibitor trypsinu a plasminu, neinhibuje však trombin. Působí jako koagulační faktor Xa nebo aktivátor plazminogenu urokinázového typu. Argináza-1 je podle databáze Uniprot enzym, který hydrolyzuje arginin na ornitin a močovinu. Hraje roli v metabolismu dusíkatých látek a močovinovém cyklu. Argináza se vyskytuje hlavně v játrech a bylo zjištěno, že se u karcinomu jater a při jaterní cirhóze významně zvyšuje její aktivita (Chrzanowska A, 2014). Lamin-B1 je podle databáze Uniprot součástí jaderné laminy, tvoří vláknitou vrstvu na vnitřní straně jaderné membrány a může interagovat s chromatinem. Strukturální integrita laminy je v průběhu buněčného cyklu přísně řízena. Podle Wazir U (2013) má také lamin-B1 význam při rakovině prsu, kdy jeho hladina klesá.

Pokud srovnáme tyto dvě afinitní matrice, tak by se na první pohled po SDS-PAGE mohlo zdát, že agarózové kuličky váží daleko míň proteinu než magnetické, viz Obr. 12. Může to však být způsobeno tím, že magnetické kuličky váží více nespecifických proteinů. Po LC-MS analýze bylo u obou matric identifikováno přibližně 700 proteinů, což ukazuje na stejnou schopnost vazby.

Porovnání metod digesce dopadlo následovně. Nejprve bylo využíváno digesce v roztoku, jelikož je rychlejší a elegantnější. Po několika experimentech byla však po digesci před přečišťováním na koloně Macro Trap, pozorována precipitace. Byla vyzkoušena i jiná forma přečišťování proteinů a to pomocí reverzní fáze C18 ve špičkách, ale nemělo to na výsledky pozorovatelný vliv. Proto bylo stále více využíváno pracnější digesce v gelu, kdy bylo při LC-MS analýze identifikováno daleko větší množství proteinů než při digesci v roztoku, např. 3 proteiny při digesci v roztoku a 800 proteinů při digesci v gelu.

7 Závěr

V této práci jsme se pokusili o srovnání a optimalizaci metod afinitní purifikace molekulárních cílů protinádorových léčiv (indazolových derivátů). Bylo využito dvou strategií afinitní purifikace a to bez kompetice a s kompeticí o volnou látku. Postup afinitní purifikace prošel v rámci optimalizace několika změnami. Byla využita kvantifikační metoda SILAC, kde byla polovina proteinů značená pomocí ^{13}C a polovina neznačená. Navázané proteiny na mobilní afinitní matrice s navázanou biotinylovanou látkou, kterou byly jak magnetické tak agarózové kuličky, byly štěpeny trypsinem pomocí digesce v roztoku i v gelu. Peptidy byly poté přečišťovány od nežádoucích solí pomocí Macro Trap kolony a reverzní fáze C18 ve špičkách. Následovala LC-MS analýza buď pomocí HPLC/MS-MALDI TOF/TOF nebo UHPLC/MS-ESI Orbitrap.

Identifikovány však byly pouze nescificky vázající se proteiny popřípadě precipitované proteiny s matricí nebo proteiny z okolního prostředí jako jsou např. keratiny. Bohužel nebyl opakovaně identifikován žádný specificky se vázající protein testovaných indazolových derivátů. Mezi identifikovanými proteiny jsou nicméně proteiny, které mají očekávaný trend a mohly by se vázat na dané léčivo. Jedním z nich je např. vimentin, který je podle Satelli A (2011) možným terapeutickým cílem protinádorové terapie nebo pyruvát kináza, která by také mohla být vhodným terapeutickým cílem pro metastazující kolorektální karcinom (Yang P, 2014). Dále byly identifikovány proteiny jako myosin-10, alfa-enoláza, septiny a anexiny, které jsou však podle Petrak J (2008) abundatní proteiny, které se v buňce vyskytují v hojném počtu a proto je větší pravděpodobnost, že se váží na danou látku nescificky. Také byly identifikovány proteiny jako serpin-B12, argináza-1 a lamin-B1, které mohou mít určitý vliv na proliferaci a metastazování nádorových buněk.

Při optimalizaci metody bylo zjištěno, že strategie afinitní purifikace využívající kompetici o volnou látku poskytuje přesnější informace o tom, jestli je protein vázán nescificky nebo specificky. Po digesci v gelu bylo na hmotnostním spektrometru identifikováno mnohem větší množství proteinů než po digesci v roztoku. Magnetické kuličky po SDS-PAGE a obarvení pomocí Coomassie Brilliant Blue vykazovaly

mnohem větší množství navázaných proteinů než agarózové kuličky. Ostatní změny v rámci optimalizace metody neměly na identifikaci proteinů pozorovatelný vliv.

V naší laboratoři je nyní také optimalizována metoda afinitní purifikace pomocí streptavidinových destiček, která může sloužit k paralelnímu zpracování více vzorků a jako vysokokapacitní afinitní povrch pro studium specifických proteinových interakcí (Dapron J).

8 Seznam použitých zkratek

14C, 41C, 44C - zkratky testovaných indazolových derivátů
3-AT - 3-amino-1,2,4-triazol
A549 - buněčná linie odvozená od epitelálního adenokarcinomu plic
AA - acetic acid - kyselina octová
ABC - ammonium bicarbonate - hydrogenuhličitan amonný
ABPP - activity-based probe profiling
ACN - acetonitril
AGC - automatic gain control
APS - persulfát amonný
AT₁ - angiotenzinový receptor II
ATCC - American Tissue Culture Collection
ATP - adenzinotriposfát
BCA - biconchonic acid - biconchonic acid
BSA - bovinní sérový albumin
CCCP - compound-centric chem proteomics
CCMS - capture compound mass spectrometry
CCRF-CEM - buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie
cDNA - komplementární DNA
CEM-DNR - buněčné linie CEM rezistentní na daunorubicin
CID - collision-induced dissociation
DARTS - drug affinity responsive target stability
DMSO - dimethylsulfoxid
DTT - dithiothreitol
EDTA - ethylenediamin tetraacid octová
EGTA - ethyleneglykol tetraacid octová
ESI - electrospray ionization
EtMF - etylmorpholin
FA - formic acid - kyselina mavenčí
Gal4AD - aktivační doména
Gal4DB - DNA vazebná doména
Gal4p - transaktivační protein

GIST - global internal standard strategy
GMA - glycidylmetakrylát
HCT116 - buněčná linie odvozená karcinomu tlustého střeva
HCT116p53 - buněčná linie odvozená karcinomu tlustého střeva s lentivirovým vektorem, který obnovuje funkci p53
HIS3 - reportérový gen kódující His3p
His3p - imidazolglycerolfosfátdehydrogenáza
Hiv1 RevM10 - RNA vazebný protein
HPLC - high-pressure liquid chromatography
HSP - heat shock protein
IAA - jodacetamid
IC₅₀ - half maximal inhibitory concentration
ICAT - isotope-coded affinity tag
K562 - buněčná linie odvozená od erytromyeloblastické leukemie
K562-TAX - buněčná linie odvozená od erytromyeloblastické leukemie rezistentní k paclitaxelu
LacZ- reportérový gen
LC - liquid chromatography
LexADB - DNA vazebná doména
MALDI - matrix-assisted laser desorption ionization
MCAT - mass-coded abundance tagging
MS - mass spectrometry
MS2 - plášťový protein, RNA vazebný protein
MTX - metotrexát
NP-40 - nonylfenoxypolyetoxyletanol
PBS - fosfátový pufr
PES - polyetersulfon
PMSF - fenylmetylsulfonylfluorid
PPAR γ - peroxisome proliferator-activated receptor- γ
rpm - revolutions per minute
SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SILAC - stable isotope labeling by amino acids in cell culture
TCEP - tris(2-karboxyetyl)fosfin
TEMED - N, N, N', N'-tetrametyletylendiamin

TFA - trifluoric acid - kyselina trifluoroctová

TGS - tris glycin SDS pufr

TOF - time of flight

Tris - tris(hydroxymetyl)aminometan

UHPLC - ultra high-pressure liquid chromatography

9 Literatura

Abbassi N, Rakib EM, Chicha H, Bouissane L, Hannioui A, Aiello C, Gangemi R, Castagnola P, Rosano C, Viale M. Synthesis and Antitumor Activity of Some Substituted Indazole Derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2014; Epub ahead of print.

Alluri PG, Reddy MM, Bachhawat-Sikder K, Olivos HJ, Kodadek T. Isolation of protein ligands from large peptoid libraries. *J Am Chem Soc*. 2003; 125(46):13995-4004.

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3(8):673-83.

Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, Bastuck S, Boesche M, Hobson S, Mathieson T, Perrin J, Raida M, Rau C, Reader V, Sweetman G, Bauer A, Bouwmeester T, Hopf C, Kruse U, Neubauer G, Ramsden N, Rick J, Kuster B, Drewes G. Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(9):1035-44.

Bertone P, Snyder M. Advances in functional protein microarray technology. *FEBS J*. 2005; 272(21):5400-11.

Blundell TL, Jhoti H, Abell C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nat Rev Drug Discov*. 2002; 1(1):45-54.

Böttcher T, Pitscheider M, Sieber SA. Natural products and their biological targets: proteomic and metabolomic labeling strategies. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010; 49(15):2680-98.

Burdine L, Kodadek T. Target identification in chemical genetics: the (often) missing link. *Chem Biol*. 2004; 11(5):593-7.

Chrzanowska A, Graboń W, Mielczarek-Puća M, Barańczyk-Kuźma A. Significance of arginase determination in body fluids of patients with hepatocellular carcinoma and

liver cirrhosis before and after surgical treatment. *Clin Biochem.* 2014. pii: S0009-9120(14)00161-1.

Cottrell JS. Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept Res.* 1994; 7(3):115-24.

Dapron J, Zobrist J, Foster K, Barbacci L, Hassell T and Kappel W. Proteomic Applications of Specialty High Capacity Streptavidin-Coated Multiwell Plates. Sigma-Aldrich Biotechnology, St. Louis, MO. Sigma-Aldrich.com

Deng G, Sanyal G. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 40(3):528-38.

Dormán G, Prestwich GD. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol.* 2000; 18(2):64-77.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989; 246(4926):64-71.

Graves PR, Kwiek JJ, Fadden P, Ray R, Hardeman K, Coley AM, Foley M, Haystead TA. Discovery of novel targets of quinoline drugs in the human purine binding proteome. *Mol Pharmacol.* 2002; 62(6):1364-72.

Govorukhina NI, Reijmers TH, Nyangoma SO, van der Zee AG, Jansen RC, Bischoff R. Analysis of human serum by liquid chromatography-mass spectrometry: improved sample preparation and data analysis. *J Chromatogr A.* 2006; 1120(1-2):142-50.

Guitot K, Scarabelli S, Drujon T, Bolbach G, Amoura M, Burlina F, Jeltsch A, Sagan S, Guianvarc'h D. Label-free measurement of histone lysine methyltransferases activity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2014. pii: S0003-2697(14)00129-8.

Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 1999; 17(10):994-9.

Hall SE. Chemoproteomics-driven drug discovery: addressing high attrition rates. *Drug Discov Today.* 2006; 11(11-12):495-502.

Hamdan M, Righetti PG. Modern strategies for protein quantification in proteome analysis: advantages and limitations. *Mass Spectrom Rev.* 2002; 21(4):287-302.

Han SY, Hwan Kim S. Introduction to chemical proteomics for drug discovery and development. *Arch Pharm (Weinheim).* 2007; 340(4):169-77.

Hechtman JF, Beasley MB, Kinoshita Y, Ko HM, Hao K, Burstein DE. Promyelocytic leukemia zinc finger and histone H1.5 differentially stain low- and high-grade pulmonary neuroendocrine tumors: a pilot immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 2013; 44(7):1400-5.

Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005; 40(4):430-43.

Huynh ML, Russell P, Walsh B. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. *Methods Mol Biol.* 2009; 519:507-13.

Jaeger S, Eriani G, Martin F. Results and prospects of the yeast three-hybrid system. *FEBS Lett.* 2004; 556(1-3):7-12.

Ju XD, Guo Y, Wang NN, Huang Y, Lai MM, Zhai YH, Guo YG, Zhang JH, Cao RJ, Yu HL, Cui L, Li YT, Wang XZ, Ding YQ, Zhu XJ. Both Myosin-10 isoforms are required for radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex.* 2014; 24(5):1259-68.

Kanoh N, Honda K, Simizu S, Muroi M, Osada H. Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005; 44(23):3559-62.

Kanoh N, Kumashiro S, Simizu S, Kondoh Y, Hatakeyama S, Tashiro H, Osada H. Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein-small-molecule interactions. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003; 42(45):5584-7.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988; 60(20):2299-301.

Kingsmore SF. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(4):310-20.

Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2001; 40(11):2004-2021.

Kolb HC, Sharpless KB. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today*. 2003; 8(24):1128-37.

Köster H, Little DP, Luan P, Muller R, Siddiqi SM, Marappan S, Yip P. Capture compound mass spectrometry: a technology for the investigation of small molecule protein interactions. *Assay Drug Dev Technol*. 2007; 5(3):381-90.

Lamotte Y, Faucher N, Sançon J, Pineau O, Sautet S, Fouchet MH, Beneton V, Tousaint JJ, Saintillan Y, Ancellin N, Nicodeme E, Grillot D, Martres P. Discovery of novel indazole derivatives as dual angiotensin II antagonists and partial PPAR γ agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24(4):1098-103.

Lewis JK, Wei J, Siuzdak G. (2000): Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 5880–5894, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Licitra EJ, Liu JO. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(23):12817-21.

Liu X, Ye L, Wang J, Fan D. Expression of heat shock protein 90 beta in human gastric cancer tissue and SGC7901/VCR of MDR-type gastric cancer cell line. *Chin Med J (Engl)*. 1999; 112(12):1133-7.

Lomenick B, Hao R, Jonai N, Chin RM, Aghajan M, Warburton S, Wang J, Wu RP, Gomez F, Loo JA, Wohlschlegel JA, Vondriska TM, Pelletier J, Herschman HR, Clardy J, Clarke CF, Huang J. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(51):21984-9.

Lomenick B, Olsen RW, Huang J. Identification of direct protein targets of small molecules. *ACS Chem Biol*. 2011; 6(1):34-46.

Molnar E, Hackler LJ, Jankovics T, Urge L, Darvas F, Feher L, Lorincz Z, Dorman G, Puskas L: Application of small molecule microarrays in comparative chemical proteomics. *QSAR & Combinatorial Sci.* 2006; 25:1020-1026.

Moshe T, Yehudith B. The specificity of proteinases from *Streptomyces griseus* (pronase). *Biochem J.* 1970; 116(1):19-25.

Nishio K, Masaike Y, Ikeda M, Narimatsu H, Gokon N, Tsubouchi S, Hatakeyama M, Sakamoto S, Hanyu N, Sandhu A, Kawaguchi H, Abe M, Handa H. Development of novel magnetic nano-carriers for high-performance affinity purification. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008; 64(2):162-9.

Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002; 1(5):376-86.

Ong SE, Li X, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA. Identifying cellular targets of small-molecule probes and drugs with biochemical enrichment and SILAC. *Methods Mol Biol.* 2012; 803:129-40.

Panek RL, Lu GH, Klutchko SR, Batley BL, Dahring TK, Hamby JM, Hallak H, Doherty AM, Keiser JA. In vitro pharmacological characterization of PD 166285, a new nanomolar potent and broadly active protein tyrosine kinase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283(3):1433-44.

Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Zivny J, Vulpe CD. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics.* 2008; 8(9):1744-9.

Převzalo ze serveru anglické wikipedie: <http://en.wikipedia.org/wiki/Indazole> ze dne 27.3.2014.

Převzato ze serveru databáze UniProt <http://www.uniprot.org/uniprot/P35580> ze dne 17.4.2014.

Převzato ze serveru databáza Uniprot <http://www.uniprot.org/uniprot/P05089> ze dne 18.4.2014.

Převzato ze serveru databáza Uniprot <http://www.uniprot.org/uniprot/Q96P63> ze dne 13.4.2014.

Převzato ze serveru databáza Uniprot <http://www.uniprot.org/uniprot/P20700> ze dne 13.4.2014.

Rix U, Superti-Furga G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat Chem Biol.* 2009; 5(9):616-24.

Rosenthal I, Wolfram E, Peter S, Meier B. Validated Method for the Analysis of Frangulins A and B and Glucofrangulins A and B Using HPLC and UHPLC. *J Nat Prod.* 2014. [Epub ahead of print]

Sakamoto S, Hatakeyama M, Ito T, Handa H. Tools and methodologies capable of isolating and identifying a target molecule for a bioactive compound. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(6):1990-2001.

Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(18):3033-46.

Sato S, Murata A, Shirakawa T, Uesugi M. Biochemical target isolation for novices: affinity-based strategies. *Chem Biol.* 2010; 17(6):616-23.

Sato S, Murata A, Shirakawa T, Uesugi M. Biochemical target isolation for novices: affinity-based strategies. *Chem Biol.* 2010; 17(6):616-23.

Saxena C, Higgs RE, Zhen E, Hale JE. Small-molecule affinity chromatography coupled mass spectrometry for drug target deconvolution. *Expert Opin Drug Discov.* 2009; 4(7):701-14.

Saxena C, Zhen E, Higgs RE, Hale JE. An immuno-chemo-proteomics method for drug target deconvolution. *J Proteome Res.* 2008; 7(8):3490-7.

Saxon E, Bertozzi CR. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science.* 2000; 287(5460):2007-10.

Shen Z, Thomas JJ, Averbuj C, Broo KM, Engelhard M, Crowell JE, Finn MG, Siuzdak G. Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2001; 73(3):612-9.

Shimizu N, Sugimoto K, Tang J, Nishi T, Sato I, Hiramoto M, Aizawa S, Hatakeyama M, Ohba R, Hatori H, Yoshikawa T, Suzuki F, Oomori A, Tanaka H, Kawaguchi H, Watanabe H, Handa H. High-performance affinity beads for identifying drug receptors. *Nat Biotechnol.* 2000; 18(8):877-81.

Sleno L, Emili A. Proteomic methods for drug target discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 2008; 12(1):46-54.

Speers AE, Cravatt BF. Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods. *Chem Biol.* 2004; 11(4):535-46.

Terstappen GC, Schlüpen C, Raggiaschi R, Gaviraghi G. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6(11):891-903.

Uga H, Kuramori C, Ohta A, Tsuboi Y, Tanaka H, Hatakeyama M, Yamaguchi Y, Takahashi T, Kizaki M, Handa H. A new mechanism of methotrexate action revealed by target screening with affinity beads. *Mol Pharmacol.* 2006; 70(5):1832-9.

Vila A, Tallman KA, Jacobs AT, Liebler DC, Porter NA, Marnett LJ. Identification of protein targets of 4-hydroxynonenal using click chemistry for ex vivo biotinylation of azido and alkynyl derivatives. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(2):432-44.

Wazir U, Ahmed MH, Bridger JM, Harvey A, Jiang WG, Sharma AK, Mokbel K. The clinicopathological significance of lamin A/C, lamin B1 and lamin B receptor mRNA expression in human breast cancer. *Cell Mol Biol Lett.* 2013; 18(4):595-611.

Yamamoto K, Yamazaki A, Takeuchi M, Tanaka A. A versatile method of identifying specific binding proteins on affinity resins. *Anal Biochem.* 2006; 352(1):15-23.

Yang P, Li Z, Fu R, Wu H, Li Z. Pyruvate kinase M2 facilitates colon cancer cell migration via the modulation of STAT3 signalling. *Cell Signal.* 2014; pii: S0898-6568(14)00122-3.