

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

MS analýza proteinů a jejich posttranslačních modifikací se  
zaměřením na fosforylaci

Bc. Jiří Novotný

Diplomová práce

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jiří Novotný**  
Osobní číslo: **C16456**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **MS analýza proteinů a jejich posttranslačních modifikací se zaměřením na fosforylaci**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

- 1) Hmotnostní spektrometrie - princip metody, typy hmotnostních spektrometrů, detektory, instrumentace, interpretace spekter
- 2) Struktura proteinů s důrazem na posttranslační modifikace (PTM), PTM proteinů u prokaryot a eukaryot - srovnání
- 3) Fosforylace proteinů - charakterizace, enzymy, in vivo procesy, funkce a význam fosforylace pro lidský organismus, míra fosforylace jako marker patologických procesů v buňce, tkáni, organismu
- 4) Přehled metod (současný stav) používaných v proteomice pro izolace fosfopeptidů/fosfoproteinů
- 5) Nanomateriály používané (vyvíjené) pro izolace fosforylovaných biomolekul
- 6) použít relevantní internetové zdroje, průběžně sledovat novinky v oboru

Experimentální část: Elektroforetické metody pro analýzu proteinů a fosfoproteinů, standardní metody pro izolaci fosfopeptidů, práce s magneticky aktivními nanomateriály, separační techniky využívající nanotrubičky, optimalizace protokolů pro izolaci fosforylovaných biomolekul z biologického materiálu a buněčného lyzátu - provést srovnání s komerčními metodami (nosiči), příprava biologických vzorků, obsahujících fosforylované proteiny, pro MS analýzu, MS analýza fosfoproteinů, proteinových směsí.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

**prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Ostatní konzultanti:

**Mgr. Rudolf Kupčík**

Katedra biologických a biochemických věd

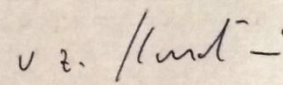
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2018

Bc. Jiří Novotný

## PODĚKOVÁNÍ

Za celou dobu vytváření této práce, a to jak v laboratoři, tak při jejím sepisování patří velký dík Mgr. Rudolfu Kupčíkovi, který mi byl neustále nápomocen. Díky patří celému kolektivu KBBV v čele s paní prof. Zuzanou Bílkovou, Ph.D. za vytvoření podmínek pro zpracování této práce, jmenovitě děkuji své vedoucí paní RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za její odborné vedení. Dále děkuji RNDr. Pavlu Řehulkovi, Ph.D., Mgr. Heleně Řehulkové, Ph.D. a zbytku týmu z ÚMP FVZ UNOB v Hradci Králové za jejich přispění při analýze komplexního vzorku.

Děkuji své rodině, za to, že mi umožnila naplno se věnovat studiu.



## **ANOTACE**

Posttranslační modifikace, které jsou přítomné na proteinech a peptidech, jsou nositeli mnoha funkcí, například se může jednat o signalizaci uvnitř buňky nebo vliv na strukturu a tvar samotného proteinu, který úzce souvisí s jeho funkcí a rovněž s odbouratelností v buňce, nebo mimo ni. Posttranslačními modifikacemi se dnes zabývá, mezi jinými, vědní obor proteomika. Proteomická analýza je různorodá směsice přístupů a strategií k přípravě vzorku a jeho analýze. Tato práce se konkrétně zabývá studiem fosforylací a využívá přístup přípravy vzorku afinitní chromatografií na oxidu titaničitém (MOAC), který je zde používán ve formě několika nosičů. Analýza z takto získaných vzorků probíhala na hmotnostním spektrometru LTQ-Orbitrap XL s MALDI ionizací a Q Exactive s nano-LC-ESI. Součástí této práce je testování vlastností nosičů (Titansphere, magnetické "core-shell" nanočástice a magnetické nanotrubičky z oxidu titaničitého, které jsou potaženy magnetickými  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočásticemi). Oba mag. nosiče byly vytvořeny v laboratořích FCHT-Univerzity Pardubice.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Posttranslační modifikace, Titansphere, Orbitrap, MALDI, LC-ESI,  $\text{TiO}_2$  nanotrubičky potažené  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetickými nanočásticemi, Core-shell nanočástice

## **TITLE**

MS analysis of proteins and its posttranslational modification with focus on phosphorylation

## **ANNOTATION**

Post-translational modifications of proteins and peptides have many functions, for example it may be cell signaling, or an effect on the structure and shape of the protein itself that is closely related to its function as well as its degradation within or outside the cell. In nowadays post-translational modifications are the object of proteomic studies, amongst others. Proteomic analysis is a diverse combination of approaches and strategies for sample preparation and analysis. This diploma thesis deals specifically with the study of phosphorylation and uses preparation of the sample by affinity chromatography on titanium oxide (MOAC), which is used in the form of several carriers. Analysis of these samples was carried out on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer analyzer with MALDI ionization and Q Exactive mass spectrometer with nano-LC-ESI. Part of this work is an evaluation of the properties of carriers (Titansphere, magnetic core-shell nanoparticles and magnetic nanotubes of titanium dioxide covered with magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles). These magnetic carriers were prepared in the FCHT laboratories of the University of Pardubice.

**KEYWORDS:** Post-translational modifications, Titansphere, Orbitrap, MALDI, LC-ESI, TiO<sub>2</sub> nanoparticles coated with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles, Core-shell nanoparticles

## SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1: STRUKTURA PKA .....	- 26 -
OBRÁZEK 2: STRUKTURA PKA DETAIL.....	- 27 -
OBRÁZEK 3: SCHÉMA VAZBY PROTEINU NA $\text{TiO}_2$ POVRCH NOSIČE .....	- 34 -
OBRÁZEK 4: TITANS-PHERE $10 \mu\text{M}$ VELKÉ SFÉRIKÉ ČÁSTICE $\text{TiO}_2$ ZVĚTŠENÍ 15 000 KRÁT (VLEVO), 100 000 KRÁT (V PRAVO) .....	- 36 -
OBRÁZEK 5: "CORE-SHELL" NANOČÁSTICE, $\text{TiO}_2$ SHELL - $\text{TiO}_2$ SCHRÁNKA, $\text{Fe}_3\text{O}_4$ CORE - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ JÁDRO.....	- 37 -
OBRÁZEK 6.: SNÍMEK ZE SKENOVAČÍHO ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU; A) NANOTRUBICE $\text{TiO}_2$ B) NANOTRUBICE $\text{TiO}_2$ POKRYTÉ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ PŘEVZATO A UPRAVENO Z KUPČÍK 2017.....	- 38 -
OBRÁZEK 7: ZÁKLADNÍ SCHÉMA HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU .....	- 41 -
OBRÁZEK 8: USPOŘÁDÁNÍ ESI.....	- 42 -
OBRÁZEK 9: MALDI IONIZACE .....	- 43 -
OBRÁZEK 10: SCHÉMA VÝBĚRU IONTOVÉHO SVAZKU PŘI PRŮLETU KVADRUPÓLOVÝM ANALYZÁTOREM.....	- 45 -
OBRÁZEK 11: SCHÉMA IONTOVÉ PASTI.....	- 47 -
OBRÁZEK 12: SCHÉMA TOF ANALYZÁTORU S REFLEKTRONEM .....	- 49 -
OBRÁZEK 13: ORBITRAP VE SPOJENÍ S ESI IONIZACÍ .....	- 50 -
OBRÁZEK 14: FRAGMENTY PEPTIDŮ VZNIKAJÍCÍ PŘI FRAGMENTACI .....	- 54 -
OBRÁZEK 15: SPEKTRUM TRYPTICKY NAŠTĚPENÉHO BSA; 700-4000; MATRICE CHCA S DAHC.....	- 76 -
OBRÁZEK 16: SPEKTRUM TRYPSINEM NAŠTĚPENÉHO ACAS; 700-4000; MATRICE DHB S $\text{H}_3\text{PO}_4$ .....	- 77 -
OBRÁZEK 17: SPEKTRUM TRYPTICKY NAŠTĚPENÉHO BSA Z POLYAKRYLAMIDOVÉHO GELU; 700-4000; MATRICE CHCA A DAHC .....	- 78 -
OBRÁZEK 18: SPEKTRUM SMĚSI BSA:ACAS 300:30 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TIS; 700-4000; MATRICE DHB S $\text{H}_3\text{PO}_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2.....	- 79 -



- OBRÁZEK 19: SPEKTRA SROVNÁNÍ SMĚSÍ BSA:ACAS 300:30 PO OBOHACENÍ NA NOSIČI TIS, PŘI POUŽITÍ ROZDÍLNÝCH PŘÍSTUPŮ; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ . A: ELUCE 1; B: ELUCE 1 OPTIMALIZOVANÁ; C: ELUCE 2; D: ELUCE 2 OPTIMALIZOVANÁ..... - 80 -
- OBRÁZEK 20: UKÁZKA TESTOVANÝCH ROZTOKŮ PO ROZPOUŠTĚNÍ V ULTRAZVUKOVÉ LÁZNI, OPTIMÁLNÍ ROZTOK JE OZNAČEN ČERVENĚ..... - 83 -
- OBRÁZEK 21: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 300:30 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TIS; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2..... - 86 -
- OBRÁZEK 22: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 300:30 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI NP; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2..... - 87 -
- OBRÁZEK 23: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 300:30 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TNT; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2..... - 88 -
- OBRÁZEK 24: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 300:30 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TIS; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: ELUCE 2; B ELUCE 2 S POUŽITÍM  $(NH_4)_2HPO_4$ ..... - 130 -
- OBRÁZEK 25: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 3000:30 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TIS; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2..... - 131 -
- OBRÁZEK 26: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 3000:30 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TNT; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2 ..... - 132 -
- OBRÁZEK 27: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 3000:30 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI NP; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2 ..... - 133 -
- OBRÁZEK 28: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 300:5 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TIS; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2..... - 134 -
- OBRÁZEK 29: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 300:5 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TNT; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2..... - 135 -
- OBRÁZEK 30: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 300:1 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TIS; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2..... - 136 -
- OBRÁZEK 31: SPEKTRUM SMĚSÍ BSA:ACAS 300:1 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TNT; 700-4000; MATRICE DHB S  $H_3PO_4$ , A: PŮVODNÍ VZOREK; B: ELUCE 1; C: ELUCE 2..... - 137 -

OBRÁZEK 32: SPEKTRUM SMĚSI BSA:ACAS 300:150 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TIS; 700-4000; MATRICE  
DHB S  $H_3PO_4$ , A: ELUCE 1; B: ELUCE 2 ..... - 138 -

OBRÁZEK 33: SPEKTRUM SMĚSI BSA:ACAS 300:150 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI NP; 700-4000; MATRICE  
DHB S  $H_3PO_4$ , A ELUCE 1; B: ELUCE 2 ..... - 139 -

OBRÁZEK 34: SPEKTRUM SMĚSI BSA:ACAS 300:150 PMOL PO OBOHOCENÍ NA NOSIČI TNT; 700-4000; MATRICE  
DHB S  $H_3PO_4$ , A ELUCE 1; B: ELUCE 2 ..... - 140 -

## SEZNAM GRAFŮ A TABULEK

TABULKA 1: SLOŽENÍ TESTOVANÝCH ELUČNÍCH ROZTOKŮ 2 .....	- 81 -
TABULKA 2: SLOŽENÍ TESTOVANÝCH ELUČNÍCH ROZTOKŮ 2 .....	- 82 -
TABULKA 3: FOSFORYLOVANÉ PEPTIDY NALEZENÉ NA FOSFORYLOVANÉM REKOMBINANTNÍ TAU-PROTEINU, PO OBOHACENÍ FOSFOPEPTIDŮ NA NOSIČ TIS.....	- 84 -
TABULKA 4: ANALÝZA SMĚSI BSA:ACAS N=300:150 PMOL PO OBOHACENÍ FOSFOPEPTIDŮ NA NOSIČÍCH TIS, NP A TNT .....	- 85 -
TABULKA 5: ANALÝZA SMĚSI BSA:ACAS V POMĚRU 300:30 PMOLPO OBOHACENÍ FOSFOPEPTIDŮ NA NOSIČÍCH TIS, NP A TNT.....	- 88 -
TABULKA 6: ANALÝZA 1 A 2; ANALÝZA SMĚSI BSA:ACAS V POMĚRU 3000:30 PMOLPO OBOHACENÍ FOSFOPEPTIDŮ NA NOSIČÍCH TIS, NP A TNT .....	- 89 -
TABULKA 7: ANALÝZA SMĚSI BSA:ACAS N=300:5 PMOL PO OBOHACENÍ FOSFOPEPTIDŮ NA NOSIČÍCH TIS A TNT .-	90 -
TABULKA 8: ANALÝZA SMĚSI BSA:ACAS N=300:1PMOL PO OBOHACENÍ FOSFOPEPTIDŮ NA NOSIČÍCH TIS A TNT .-	91 -
TABULKA 9: ANALÝZA LYZÁTU PO OBOHACENÍ NA TIS A TNT, VYJÁDŘENY POČTY IDENTIFIKACÍ (FOSFO)PEPTIDŮ V ZÁVISLOSTI NA MÍŘE JEJICH FOSFORYLACE .....	- 92 -
TABULKA 10: PROCENTUÁLNÍ SROVNÁNÍ ZASTOUPENÍ FOSFO A NEFOSFOPEPTIDŮ ANALÝZY LYZÁTU PO OBOHACENÍ NA TIS A TNT, VYJÁDŘENY POČTY IDENTIFIKACÍ (FOSFO)PEPTIDŮ .....	- 93 -
TABULKA 11: PŘEHLED PRAKTICKY IDENTIFIKOVANÝCH FOSFOPEPTIDŮ Z PROTEINŮ: A-KASEIN S1, A-KASEIN S2 A B-KASEIN .....	- 117 -
TABULKA 12: ACAS S1 TEORETICKÉ VARIANTY FOSFOPEPTIDŮ PO NAŠTEPENÍ TRYPSINEM.....	- 118 -
TABULKA 13: ACAS S2 TEORETICKÉ VARIANTY FOSFOPEPTIDŮ PO NAŠTEPENÍ TRYPSINEM.....	- 122 -
TABULKA 14: BETA KASEIN TEORETICKÉ VARIANTY FOSFOPEPTIDŮ PO NAŠTEPENÍ TRYPSINEM .....	- 128 -

- GRAF 1: ZOBRAZENÍ ABSOLUTNÍHO ZASTOUPENÍ FRAKcí V JEDNOTLIVÝCH ELUCÍCH ANALÝZY LYZÁTU PO OBOHACENÍ NA TIS A TNT, VYJÁDŘENY POČTY IDENTIFIKACÍ (FOSFO)PEPTIDŮ V ZÁVISLOSTI NA MÍŘE JEJICH FOSFORYLACE ..... - 92 -
- GRAF 2: ABSOLUTNÍ ZASTOUPENÍ FOSFORÝLOVANÝCH A NEFOSFORÝLOVANÝCH PEPTIDŮ VE VZORKU LYZÁTU PO OBOHACENÍ NA NOSICÍČCH TIS A TNT..... - 93 -

## SEZNAM ZKRATEK

ACN - Acetonitril

Akt - Proteinkináza A

AMP - Adenosinmonofosfát

API - (Atmospheric pressure ionization) Ionizace za atmosférického tlaku

ATP - Adenosintrifosfát

cAMP - Cyklický AMP

Cdk5 - proteinkináza 5CHCA - (Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) Alfa-kyano-hydroxyskořicová kyselina

CID - (Collision induced dissociation) Kolizně indukovaná disociace

CLK - (CD-like kinase) Kináza podobná CD kinázám

CMCG - Rodina proteinových kináz

DAHC (Diammonium hydrogen citrate) hydrogencitrát dvojamonný

DC - (Direct current) Stejnoseměrný proud

DHB - Dihydroxybenzoová kyselina ECD - (Electron capture dissociation) disociace záchytem elektronu

ERK - (Extracellular signal regulated kinase) Extracelulární kináza regulovaná signálem

ESI - Elektrosperjová ionizace

ERLIC - (Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography) Elektrostatická repulzní hydrofilní interakční chromatografie

FT - Fourierova transformace

FWHM -(Full width at half maximum) plná šířka v polovině maxima

GSK - Glykogensyntáza kináza

HAC - Hydroxyapatitová afinitní chromatografie

HILIC - Hydrofobní interakční kapalinová chromatografie

ICR - Iontová cyklotronová rezonance

IEF - Isoelektrická fokusace  
IMAC - (Immobilized metal ion affinity chromatography)  
Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech

IT - (Ion trap) Iontová past

LC – (Liquid chromatography) Kapalinová chromatografie

LDI - (Laser desorption ionization) Desorpční ionizace laserem

LIT - (Linear ion trap) Lineární iontová past

MALDI -(Matrix assisted laser desorption/ionization) Laserová desorpční ionizace za účasti matrice

MAPK - Mitogenem aktivovaná proteinkináza

MD - Multidimenzionální

MEK - (Mitogen-activated protein kinase kinase) MAPK aktivující kináza

MOAC - (Metal oxide affinity chromatography) Afinitní chromatografie na oxidech kovů

mRNA - Mediátorová ribonukleová kyselina

MS - (Mass spectrometry) Hmotnostní spektrometrie/hmotnostní spektrometr

NA - (Nucleic acid) Nukleová kyselina

NFT - (Neurofibrillary tangles) Neurofibrilární spletnice

NSI - nano ESI

O - Oxidace

P - Fosforylace

pE - pyro-Glutámová kyselina

PKA -Proteinkináza A

PKC - Proteinkináza C

PSD - (Post-source decay) Rozpad za zdrojem

PTM - Posttranslační modifikace

Q - Glutamát

QqQ - Trojtý kvadrupol

qTOF - Spojení kvadrupólu s TOF

Raf - Rodina serin/threoninových kináz

Ras - Gen kódující kinázy

RF - Radiofrekvenční potenciál

RP - (Reverse phase) Reverzní fáze

SAPK - Stresem aktivovaná proteinkináza

SAX - (Strong anion exchange chromatography) Iontově výměnná chromatografie na silném anexu

SCX - (Strong cation exchange chromatography) Iontově výměnná chromatografie na silném katexu

SELDI - (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) Povrchem zlepšená desorpční ionizace laserem

SRC -Protoonkogenová kináza Src

SRM - (Selected reaction monitoring) Režim monitorování vybraných reakcí

THAP - (Trihydroxyacetophenone) Trihydroxyacetofenon

TOF - (Time of flight) analyzátor doby letu

Wnt - způsob přenosu signálů pomocí proteinů



## OBSAH

0	Úvod a cíle práce .....	- 20 -
1	Teoretická část.....	- 21 -
1.1	Studium proteinů.....	- 21 -
1.2	Posttranslační modifikace.....	- 21 -
1.3	Fosforylaceproteinů a její funkce.....	- 21 -
1.4	Kinázy .....	- 23 -
1.4.1	Glykogen syntáza kináza 3 $\beta$ .....	- 25 -
1.4.2	PKA .....	- 26 -
1.4.3	MAPK-1 ERK2 .....	- 28 -
1.4.4	Proto-onkogenová tyrosin-proteinová kináza Src .....	- 30 -
1.5	Tau protein a neuropatologie .....	- 30 -
1.6	Strategie a specifika přípravy vzorku v proteomické analýze .....	- 32 -
1.6.1	Obohacování fosfopeptidů .....	- 33 -
1.6.2	Vlastnosti TiO <sub>2</sub> .....	- 35 -
1.6.2.1	Titansphere .....	- 36 -
1.6.2.2	Magnetické core-shell nanočástice .....	- 36 -
1.6.2.3	Titanové nanotrubičky s magnetickými vlastnostmi.....	- 37 -
1.6.3	Příprava vzorku pro MS analýzu po obohacení .....	- 38 -
1.7	Hmotnostní spektrometrie .....	- 39 -

1.7.1	Princip MS .....	- 39 -
1.7.2	Základní části hmotnostního spektrometru .....	- 40 -
1.7.3	Ionizace .....	- 41 -
1.7.3.1	Ionizace elektrosprejem.....	- 41 -
1.7.3.2	Ionizace MALDI.....	- 42 -
1.7.4	Analyzátoři v hmotnostní spektrometrii .....	- 44 -
1.7.4.1	Kvadrupólový analyzátoř .....	- 44 -
1.7.4.2	Iontová past.....	- 46 -
1.7.4.3	Hmotnostní analyzátoř doby letu .....	- 47 -
1.7.4.4	Orbitrap – Elektrostatická orbitální past .....	- 49 -
1.7.4.5	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací .....	- 50 -
1.7.5	Vybrané detektory v hmotnostní spektrometrii.....	- 51 -
1.7.5.1	Faradayova klec .....	- 51 -
1.7.5.2	Elektronové násobiče .....	- 51 -
1.7.5.3	Detektotř pro Orbitrap a FT-ICR.....	- 51 -
1.8	Fragmentace a tandemová hmotnostní spektrometrie .....	- 52 -
1.8.1	Iontové aktivační metody.....	- 52 -
1.9	Spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií .....	- 54 -
1.9.1	Mikrogradientová kapalinová chromatografie .....	- 57 -
1.10	Identifikace peptidů z analyzovaných dat .....	- 57 -

2	Experimentální část .....	- 58 -
2.1	Přístroje a pomůcky.....	- 58 -
2.2	Polyakrylamidová gelová elektroforéza pro analýzu proteinů a peptidů .....	- 59 -
2.2.1	Roztoky .....	- 60 -
2.2.2	Vzorky: .....	- 60 -
2.2.3	Postup.....	- 60 -
2.3	Štěpení bovinního sérového albuminu solubilním trypsinem .....	- 62 -
2.3.1	Roztoky .....	- 62 -
2.3.2	Postup.....	- 62 -
2.4	Štěpení alfa kaseinu solubilním trypsinem.....	- 63 -
2.4.1	Roztoky .....	- 63 -
2.4.2	Postup.....	- 63 -
2.5	Štěpení vzorku z polyakrylamidového gelu .....	- 64 -
2.5.1	Roztoky .....	- 64 -
2.5.2	Postup.....	- 64 -
2.6	Odsolování vzorku na reverzní fázi a příprava vzorku pro MS analýzu .....	- 65 -
2.6.1	Roztoky .....	- 66 -
2.6.2	Postup.....	- 66 -
2.7	Mikrogradientová separace na reverzní fázi.....	- 66 -
2.7.1	Roztoky .....	- 67 -

2.7.2	Postup.....	- 67 -
2.8	Obohacování modelové směsi peptidů (BSA a ACAS) afinitní chromatografií na TiO <sub>2</sub> .....	- 68 -
2.8.1	Roztoky.....	- 68 -
2.8.2	Vzorky.....	- 69 -
2.8.3	Postup.....	- 69 -
2.9	Optimalizace složení elučního roztoku 2.....	- 70 -
2.9.1	Postup.....	- 70 -
2.10	Změna složení elučního roztoku 2.....	- 70 -
2.10.1	Postup.....	- 71 -
2.11	Analýza <i>in-vitro</i> fosforylovaného rekombinantního Tau proteinu.....	- 71 -
2.11.1	Vzorky.....	- 71 -
2.11.2	Roztoky.....	- 71 -
2.11.3	Postup.....	- 71 -
2.12	Příprava buněčného lyzátu.....	- 71 -
2.13	Obohacení a analýza fosfopeptidů z komplexního vzorku.....	- 72 -
2.13.1	Roztoky.....	- 72 -
2.13.2	Vzorky.....	- 72 -
2.13.3	Postup.....	- 72 -
3	Výsledky a diskuze.....	- 74 -

3.1	MS analýza peptidů bovinního sérového albuminu a $\alpha$ -kaseinu naštěpených solubilním trypsinem.....	- 74 -
3.1.1	Analýza vzorků rozdělených pomocí polyakrylamidové elektroforézy .....	- 77 -
3.2	Analýza fosfopeptidové obohacovací účinnosti nosiče Titansphere .....	- 78 -
3.2.1	Optimalizace metodiky .....	- 79 -
3.2.2	Využití mikrogradientové kapalinové chromatografie při zvyšování pokrytí peptidové sekvence.....	- 80 -
3.3	Optimalizace složení elučního roztoku 2 .....	- 81 -
3.4	Analýza fosfopeptidů v reálném vzorku Tau-proteinu na nosiči Titansphere..	- 83 -
3.5	Srovnání sorbčních vlastností nosičů Titansphere, magnetických nanočásticích a TiO <sub>2</sub> nanotrubic s Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> magnetickými nanočásticemi .....	- 84 -
3.5.1	Mapování vlastností nosičů na různých poměrech látkových množství ve směsi .....	- 85 -
3.6	Mapování rozsahu obohacovací účinnosti titanových nanotrubic ve srovnání s nosičem Titansphere.....	- 90 -
3.7	Analýza komplexní peptidové směsi .....	- 92 -
4	Závěr .....	- 95 -
5	Seznam použité literatury.....	- 97 -
6	Přílohy.....	- 117 -

## 0 Úvod a cíle práce

---

Tato práce se věnuje jednomu z přístupů studia a proteomické analýzy posttranslačních modifikací, konkrétně fosforylací, které jsou zodpovědné za širokou škálu pochodů v buňce. Jejich vliv sahá i do degradability některých buněčných proteinů, které se vyskytují v neurálních buňkách. Hyperfosforylace těchto proteinů je pokládána za jednu z příčin neurodegenerativních onemocnění typu Alzheimerova choroba, frontotemporální demence aj. Pro analýzu komplexních vzorků jako je lidské sérum, likvor nebo buněčný lyzát je zásadní získat vzorky s vysokým zastoupením fosforylovaných proteinů, případně peptidů. Jejich zastoupení je v takových vzorcích minimální a pro zvýšení lze využít obohacovací techniky, například afinitní chromatografii na oxidech kovů. Tato práce si klade za cíl optimalizovat protokoly afinitní chromatografie na magnetických a nemagnetických nosičích obsahující oxid titaničitý pro MS analýzu fosforylací. Dále bylo cílem této práce porovnat vlastnosti používaných nosičů a vyhodnotit jejich účinnost z hlediska zastoupení fosforylovaných peptidů v komplexních vzorcích.

# 1 Teoretická část

---

## 1.1 Studium proteinů

Studiem proteinů se zabývá vědní obor proteomika, ta souvisí s mnoha dalšími obory studia buňky, jako je genomika, metabolomika aj. Pod proteomiku spadá studium posttranslačních modifikací (PTM), mezi které se řadí fosforylace, hydroxylace, N-glykosylace, acetylace, methylace, karboxylace, proteolýza a vůbec všechny úpravy a sestřihy, které se dějí po translaci.

## 1.2 Posttranslační modifikace

PTM se rozumí změna struktury proteinu mimo řetězec peptidových vazeb mezi jednotlivými aminokyselinami. Je to modifikace, která probíhá po translaci proteinu z mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA). Existuje také skupina, která se nazývá kotranslační, a často bývá řazena pod PTM. S PTM se setkáváme u všech buněčných organizmů, ovšem nalézáme mezi nimi rozdíly. Například *E. coli* produkují proteiny bez glykosylací - důvod selhávání produkovaných protilátek při rozeznávání savčích proteinů. (Jenkins, 1994). Mezi další hojně zastoupení PTM patří tvorba disulfidických můstků, degradace signálních částí na proteinu a také fosforylace.

Enzymy potřebné ke katalýze fosforylace, kinázy, se nacházejí jak v prokaryotických tak v eukaryotických buňkách. V eukaryotických buňkách nacházíme fosforylace (esterová vazba) serinu, threoninu a tyrosinu. Rozdíl mezi prokaryoty a eukaryoty je popisován ve složitosti regulace fosforylací, jejichž účel často spočívá v přenosu signálu. O rozdílech mezi kinázami pojednává např. Kyriakis 2014.

## 1.3 Fosforylace proteinů a její funkce

Fosforylace se řadí k nejdůležitějším z PTM vzhledem ke své úloze v biologických procesech. Četností výskytu patří mezi nejčastější modifikace proteinů. K jejímu studiu byl vyčleněn speciální podobor proteomové analýzy - fosfoproteomika, která zkoumá fosfoproteiny v biologickém systému (Halada 2005).



Fosforylací rozumíme připojení fosfátu k postrannímu řetězci aminokyseliny přes akceptorovou skupinu za vzniku kovalentní vazby. Donorem fosfátu pro takovou reakci je většinou adenosintrifosfát (ATP). Většinou se tak děje za katalýzy enzymů, které se souhrnně označují jako kinázy.

Fosforylace může probíhat na skupinách -OH za vzniku *O*-fosfátu (serin, tyrosin a threonin), -NH<sub>2</sub> za vzniku *N*-fosfátu (histidin na pozicích 1 a 3, arginin a lysin), -COOH za vzniku *acyl*-fosfátu (asparágová a glutámová kyselina) a -SH skupiny za vzniku *S*-fosfátu (cystein). U eukaryot probíhá vznik *O*-fosfátů.

Vycházíme-li z formy nepatologického proteinu, který je fosforylován na určitých místech ve svém řetězci, určitým počtem fosfátových skupin, pak za patologický stav můžeme považovat fosforylací, která se liší ať místem nebo počtem fosfátových skupin (Delobel 2008). Fosforylace mohou vznikat na nových místech *de novo*, k čemuž může docházet při mutaci na úrovni nukleových kyselin (NA), tedy záměnou aminokyseliny v řetězci proteinu. Může dojít také k nesprávnému poskládání proteinu, díky tomu se zpřístupní aminokyselina, která může podléhat fosforylací. Takový protein ovšem musí existovat tak dlouho, aby se funkčně projevil jako patologický nebo se projevila absence jeho fyziologické funkce. Správně je defektní protein označen jako chybný ubiquitinilací a odbourán v proteasomu. Tato teze ovšem neplatí při neuropatologiích, kdy se proteiny agregují v neurálních buňkách a tkáních, protože nepodléhají odbourání v proteasomu, ačkoli jsou ubiquitinylované (Tai 2008).

Proteinová fosforylace může zvýšit nebo snížit enzymovou aktivitu a může měnit jiné biologické aktivity, jako je například transkripce a translace. Navíc některé fosforylační místa na daném proteinu jsou stimulační, zatímco jiné jsou inhibiční (Roskoski 2015). Proteinová fosforylace zahrnuje vyvážený účinek protein kináz a fosfoproteinových fosfatáz, díky čemuž je fosforylace a defosforylace celkově reverzibilní proces.



Pro reakci je nutný dvojjazvý kation, jako je Mg<sup>2+</sup>. Aktivita některých protein kináz *in vitro* je větší s Mn<sup>2+</sup> než s Mg<sup>2+</sup>, ale buněčná koncentrace Mg<sup>2+</sup> je mnohem větší než Mn<sup>2+</sup>, takže fyziologicky převládající substrát je MgATP<sup>-</sup>. Serin a threonin obsahují alkoholový

boční řetězec, zatímco tyrosin obsahuje fenolický postranní řetězec. Na základě fosforylované skupiny -OH (alkohol nebo fenol) jsou tyto proteiny klasifikovány jako protein-serin/threonin kinázy (385 členů), protein-tyrosin kinázy (90 členů) a tyrosin-kinázové proteiny (43 členů). Z 90 protein-tyrosin kináz je 58 receptorových a 32 je nereceptorových proteinů

V roce 1988 byly analyzovány sekvence asi pěti desítek serin/threonin a tyrosin-kináz a byly rozděleny podle primární struktury do 11 domén (I-XI), které obsahují 250 až 300 aminokyselin. Doména I je bohatá na Gly, obsahuje "GxGxxG" motiv, o které se později zjistilo, že překryje vazbu s ATP. Doména II obsahuje Lys 72, který je vysoce konzervován a nalézá se v motivu Ala-Xxx-Lys. Pravděpodobně je tento Lys zodpovědný za zprostředkování přenosu protonu. Doména III má invariantní glutamátový zbytek, který vytváří solný můstek Lys s Ala-Xxx-Lys v aktivní konformaci. Doména IV obsahuje variabilní sekvenci, ve které se vyskytuje konzervovaný hydrofobní zbytek (Leu, Ile nebo Val). Doménu V tvoří další variabilní sekvence. Nejvyšší výskyt konzervovaných aminokyselin obsahují domény VI až IX. Doména VI je dělena na VIa a VIb. VIa obsahuje malý zbytek, glycin, dvě libovolné aminokyseliny a dva hydrofobní zbytky, jako je tyrosin/leucin, a doména VIb obsahuje konzervovanou sekvenci Tyr/HisArgAsp, která spoluvytváří katalytickou smyčku. Doména VII obsahuje signaturu AspPheGly. Aspartátové zbytky mohou reagovat s fosfátovou skupinou z ATP přes spólný můstek, který mohou vytvářet za pomoci  $Mg^{2+}$  kationtu. Doména VIII obsahuje konzervovanou sekvenci AlaProGlu, které představuje počátek a konec segmentu sloužícího k aktivaci proteinkinázy, což naznačují studie mutagenity Src kinázy, která tento motiv rovněž obsahuje. Doména IX obsahuje konzervovaný aspartát oddělený od konzervovaného glycinu a doména X se skládá z variabilní sekvence, o které se později zjistilo, že tvoří  $\alpha$ -helix. Doména XI obsahuje konzervovaný hydrofobní zbytek oddělený od spodního argininu, z něhož vzniká solný můstek s Glu z AlaProGlu domény VIII (Hanks 1988, Roskoski 2015, Obrázek 1: **Struktura PKA**).

## 1.4 Kinázy

Jedná se o skupinu enzymů, které jsou schopné svou aktivitou katalyzovat připojení fosfátu k molekule. Jejich funkčními protějšky jsou enzymy zvané fosfatázy, které katalyzují rozpojení vazby mezi fosfátem a zbytkem molekuly, tzv. defosforylaci.

Rodina genů lidské proteinové kinázy se sestává z 518 členů a ze 106 pseudogenů. Asi 50 z 518 nazýváme proteinové pseudokinázy, které coby genové produkty postrádají důležité katalytické zbytky (Manning 2002). Téměř všechny aktivní proteinkinázy obsahují sekvenci Lys/Glu/Asp/Asp, která hraje důležitou strukturní a katalytickou roli. Proteinkinázy obsahují hydrofobní katalytické, regulační trny a další struktury, které jsou potřebné k sestavení aktivního enzymu (Roskoski 2015).

Prvním biochemicky charakterizovaným enzymem asociovaným s katalýzou reakce, při níž je transportován fosfát byla fosforyláza a mechanismus její regulace vedl k objevení proteinové kinázy (protein kináza A nebo PKA), která je cyklický adenosin monofosfát (cAMP) dependentní. PKA katalyzuje fosforylaci a také aktivaci fosforyláz. Děj, do kterého je tato kináza zapojena je první objasněnou proteinkinázovou kaskádou. Jedná se o signál receptoru epidermálního růstového faktoru, který je znám jako Ras-Raf-MEK-ERK, což znamená "kináza aktivující mitogenem aktivovanou proteinovou kinázu (MAPK)-extracelulárním signálem regulovanou kinázu (ERK)". Tento model zahrnuje protein-tyrosin kinázu, protein-serin/threonin kinázu a proteinkinázy s duální specifitou. PKA je v tomto případě charakteristickým zástupcem této rodiny enzymů a je nejvíce popsanou proteinkinázou (Roskoski 2015).

Proteinkinázy a pseudokinázy mohou interagovat s jinými proteiny, jde o nekatalytické alosterické interakce. Stávají se tak důležitými regulačními prvky z pohledu biochemie a buněčné biologie, které studují proteinkinázovou super-rodinu (Roskoski 2015). Významné místo zde zaujímá regulace, velmi vzácně je pro reakci vyžadován dvojjazyčný kation, například  $Mg^{2+}$ . Proteinkinázy mohou existovat v bazálním stavu a aktivovat se různými regulačními stimuly pouze v případě nutnosti (Roskoski 2015).

Existují dva obecné druhy konformačních změnu většiny proteinkináz. První konformační změna zahrnuje vytvoření neporušené regulační páteře pro vytvoření aktivního enzymu. Druhá konformační změna nastává u aktivních kináz, jde o přepínání mezi otevřenými a uzavřenými konformacemi během svých katalytických cyklů (Roskoski 2015).

Kinázy můžeme rozdělit pro účel této práce například podle toho, na které aminokyseliny jsou schopny vázat fosfát. Prolin dependentní glykogen syntáza kináza 3 beta forma (GSK-3 $\beta$ ) fosforyluje serin a threonin, a to na prefosforylovaných peptidech

(Hromádková 2018, Golpich 2015). CAMP dependentní PKA je schopná oproti GSK-3 $\beta$  fosforylovat i tyrosin (Visconti 1995). MAPK1 ERK2 je schopná vázat fosfátovou skupinu na serin a treonin (Yang 1999). Protoonkogenová tyrosinová proteinkináza Src (SRC) katalyzuje vazbu fosfátu pouze na tyrosin (Tang 2017).

Mimo jiné na výše popsané skutečnosti se zakládají některá léčiva, která se používají k inhibici těchto enzymů. Jsou to látky, které se váží na ATP-vazebné místo cílových enzymů a rozšiřují je do blízkosti hydrofobní kapsy.

### 1.4.1 Glykogen syntáza kináza 3 $\beta$

GSK 3 patří do skupiny CMCG, která dostala název podle kináz, které ji tvoří. Jedná se o několik prolinem řízených kináz zahrnující cyklin-dependentní kinázy (CDK), mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK), glykogen syntázové kinázy (GSK) a kinázy podobné CDK (CDK-like kinases, CLK). Existuje ve dvou isoformách, tj. GSK-3 $\alpha$  a GSK-3 $\beta$ , o hmotnosti 51 respektive 47 kDa. GSK-3 $\beta$  je regulovaná posttranslační fosforylací Ser9 (inhibiční) a Tyr216 (aktivující) zatímco u GSK-3 $\alpha$  je Ser21 a Tyr279 (Prasanth Saraswati 2017).

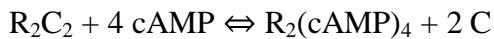
Fosforylace GSK-3 $\beta$  vyžaduje předchozí fosforylace jinou protein kinázou. GSK-3 $\beta$  postupně fosforyluje např: Ser 652, Ser 648, Ser 644 a Ser 640 ve směru od karboxylového konce k amino-konci, přičemž pozice každé následující fosforylace závisí na předchozí fosforylaci P + 4 (Dajani 2001). Jedná se o enzym s délkou 420 aminokyselin. Fosforylace v řetězci můžeme najít na pozicích 9, 216, 390 a 402. V buňkách se vyskytuje spolu s isoenzymem GSK 3 alfa (Bax 2001, Zhang 2011). GSK-3 $\beta$  je konstitutivně aktivní kináza, jejíž aktivita je negativně regulována proteinkinázou B (Akt), která zprostředkovává fosforylací Ser9. Inhibice GSK-3 není zprostředkována pouze fosforylací Akt. I jiné proteinové kinázy, jako je třeba PKA a protein kináza C (PKC) mohou inhibovat GSK-3  $\beta$ . Dokonce také MAPK sehrává roli v inhibici GSK-3 $\beta$  (Golpich 2015).

Lze shrnout, že obecně velmi důležitými vlastnostmi jsou působení jakožto negativní regulátor při hormonální regulaci glukózové homeostázy, Wnt signalizaci a regulaci transkripčních faktorů a mikrotubulů, MAPT/TAU a jiných (Atkins 2013, Maqbool 2016).

## 1.4.2 PKA

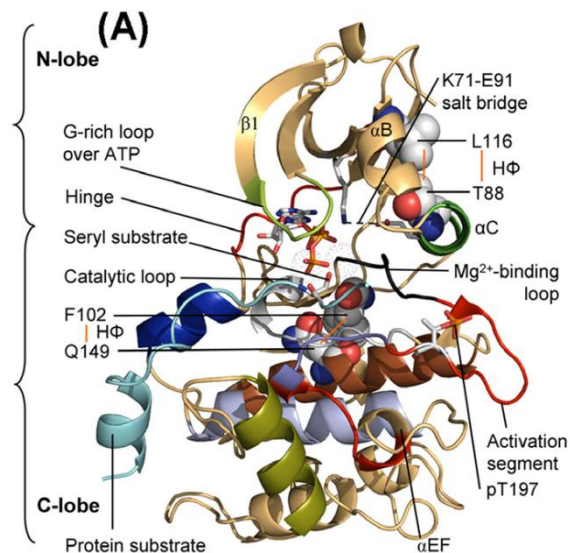
Podle Taylor 2012 se PKA skládá ze dvou obecných typů (I a II). Existují čtyři neredundantní R-podjednotky (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  a RII $\nu$ ) u lidí a myši. Tyto podjednotky se liší ve svých vzorech exprese a celulární lokalizaci, tři katalytické podjednotky (C $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ ) u lidí a dvě u myši (C $\alpha$  / $\beta$ ), jak shrnuje Kirschner 2009.

Neúčinný PKA holoenzym obsahuje dvě regulační a dvě katalytické podjednotky. Regulace aktivity PKA pomocí cAMP, jejího druhého posla, je jedinečná v tom, že nezahrnuje fosforylační defosforylaci segmentu, který je zodpovědný za aktivaci, ale zahrnuje vazbu cAMP na regulační podjednotky holoenzymu proteinkinázy. Po vazbě molekul cAMP se holoenzym disociuje do dimeru regulační podjednotky (každý monomer váže dva cAMP) a dvou aktivních katalytických podjednotek podle následující chemické rovnice (Corbin 1978):



Protein kináza A a všechny ostatní proteinové kinázové řetězce mají malý aminoterminální lalok (N-lalok) a velký karboxyterminalní lalok (C-lalok) (Taylor 2012).

N-lalok a C-lalok tvoří štěrbinu, která slouží jako dokovací místo pro ATP pod smyčkou bohatou na Gly, což je patrné z **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**



**Obrázek 1:** Struktura PKA

Převzato z Roskoski 2015

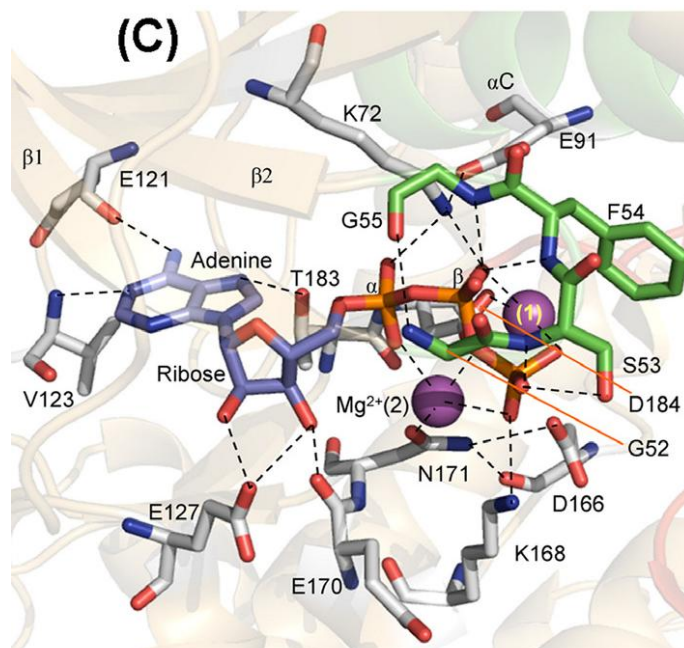
N-lobe - N-lalok, G-rich loop over ATP - smyčka bohatá na Glu kolem ATP, Hinge - závěs, Seryl substrát- postranní žetezec serinu, Catalytic loop - katalytická smyčka, C-lobe - C-lalok, Protein

substrate - proteinový substrát, salt bridge - solný můstek,  $Mg^{2+}$  binding loop - vazebná smyčka pro  $Mg^{2+}$ , Activation segment- aktivační segment.

Malé N-a velké C-laloky přispívají k nukleotidové vazbě, většina interakcí zahrnuje N-lalok. Malý lalok proteinkináz obsahuje konzervovanou na glycin bohatou (GxGxΦG) ATP-fosfátovou vazebnou smyčku (Zhang 1993).

Na Převzato z: Roskoski 2015

je vidět smyčka PKA bohatá na glycin, která obsahuje  $^{50}GTGSFG^{55}$ . Z terciární struktury je patrné, že předposlední fenylalanin 54 a třetí glycin 55 kotví  $\alpha$ -fosfát z ATP. Aminokupina a hydroxylová skupina Ser53 z výše uvedené smyčky reagují  $\gamma$ -fosfátem. Třetí glycin G52 tvoří vodíkovou vazbu s G55. Lys72 z  $\beta$ -řetězce drží  $\alpha$ - a  $\beta$ -fosfáty v poloze. Glu91 z  $\alpha$ -helixu vytváří solný můstek s Lys72 a přispívá ke stabilizaci jeho interakce s těmito fosfáty. Aminokupina číslo 6 adeninové báze ATP vytváří vodíkový můstek s karbonylovým kyslíkem Glu121, prvním globulárním zbytkem PKA. N-1 a N-7 adeninového kruhu tvoří vodíkovou vazbu s hlavním řetězcem aminokupiny zbytku kloubu Val123 a hydroxyskupiny Thr183 blízko počátku aktivačního segmentu. Thr183 je jedinečný pro PKA a není zakonzervován v rodině proteinkinázy. Adeninová báze interaguje s několika hydrofobními zbytky v ATP-vazebné kapse, zahrnující Leu49, Val57, Ala70, Met120, Tyr122, Val123 z N-laloku a Leu173 z C-laloku (Zhang 1993).



Obrázek 2: **Struktura PKA detail**; Adenine - adenin, Ribose - ribóza

Převzato z: Roskoski 2015

Jak již bylo zmíněno výše,  $\alpha$ 3-vláknko všech proteinových kináz typicky obsahuje sekvenci Ala-Xxx-Lys, jejíž lyzin v PKA Lys 72 vytváří solný můstek s konzervovaným glutamátem blízko středu  $\alpha$ C-helixu Glu91. Přítomnost solného můstku mezi  $\beta$ -Lys a  $\beta$ -Glu je zásadní pro tvorbu aktivních proteinových kináz. C-lalok, který významně přispívá k vazbě proteinu/peptidu se substrátem, se podílí také na nukleotidové vazbě.  $\Gamma$ -fosfát interaguje s Lys168 v katalytické smyčce. Zbytek tohoto lysinu konzervován ve skupině serin/threoninových kináz.

Lys72 z PKA také vytváří solné můstky s oběma  $\alpha$ - a  $\gamma$ -fosfáty ATP. Dva aspartátové zbytky v motivu Lys Glu Asp Asp se vyskytují ve velkém laloku (Roskoski 2015). V PKA funguje Asp166 jako katalytická báze, která odebírá proton ze substrátů protein-serin/threonin, čímž usnadňuje nukleofilní zásah do atomu  $\gamma$ -fosforu MgATP (Zhou 1997). Tato báze se vyskytuje v katalytické smyčce protein-serin/threonin kinázy s kanonickou "H/YRDKPEN" sekvencí (Hanks 1988). V nereceptorových protein-tyrosin kinázách má katalytická smyčka kanonickou "HRDLRAAN" sekvenci, zatímco v receptorových protein-tyrosin kinázách je sekvence "HRDLAARN" (Roskoski 2015).

Ze studie struktury katalytické podjednotky myšního PKA navázaného na  $Mg^{2+}$  peptidový substrát a analog ATP (AMP-PNP, 5p-adenylyl-a,  $\gamma$ -imidodifosfát) vyplývá, že mechanismus všech proteinkináz bude vyžadovat dva magnézieové ionty pro katalýzu (Roskoski 2015).

### 1.4.3 MAPK-1 ERK2

Je obecně známo, že ERK1 a ERK2 jsou příbuzné serin/threonin kinázy, které se účastní Ras (proteiny kódované genem c-ras)-Raf (rodina serin/threoninových kináz)-MEK-ERK-MAPK kaskády přenosu signálu. Tato kaskáda se podílí na regulaci širokého spektra procesů, které zahrnují buněčnou adhezi, buněčnou migraci, přežití buněk, diferenciaci, metabolismu a mnoha dalších. Vzhledem k tomu, že rodiny Raf kinázy a MEK mají úzkou substrátovou specifitu, ERK 1/2 katalyzuje fosforylaci stovek cytoplazmatických a nukleárních substrátů včetně regulačních molekul a transkripčních faktorů (Kondoh 2007). Mezi důležité funkce MEK1/2 patří katalýza fosforylace lidského ERK1/2 na Thr183/Tyr185



a Thr202/Tyr204. Pro aktivaci enzymu je nutná fosforylace jak tyrosinu, tak treoninu (Zhang 1993).

ERK1/2 jsou prolinem řízené kinázy, které upřednostňují katalýzu fosforylace substrátů obsahujících sekvenci Pro-Xxx-Ser/Thr-Pro (Davis 1993). Mimo těchto primárních strukturních požadavků, mnoho substrátů ERK1/2 má D-dokovací místo, F-dokovací místo nebo obojí (Zhang 1994).

Regulační defosforylace ERK1/2 je zprostředkována protein-tyrosinovou fosfatázou, protein-serinovou/threoninovou fosfatázou a fosfatázou s dvojí specificitou. Kombinace kináz a fosfatáz činí celkový proces reverzibilní. Fosforylace nukleárních transkripčních faktorů Ets, Elk a c-Fos za katalýzy ERK 1/2 představuje důležitou funkci a vyžaduje translokaci ERK1/2 do jádra aktivními a pasivními přenašeči, které obsahuje jaderný pór. Tyto transkripční faktory se podílejí na bezprostřední časné genové reakci (Owens 2007, Farooq 2004).

MAPK je serin/threoninová kináza. Allesi 1995 shrnuje, že její aktivace a deaktivace se děje na podkladě fosforylací a defosforylací treoninových a tyrosinových zbytků v aktivační smyčce. Tyto zbytky se nacházejí v uspořádání Thr–Glu–Tyr (183–185 na p42MAPK isoformě). MAPK fosforylují substrát na serinovém nebo tyrosinovém zbytku, který je následován prolinem. Substrátová selektivita je dána specifickými motivy, které se fyziologicky na těchto substrátech vyskytují. Specificita MAPK kaskády je dána interakcí s více segmenty proteinové kostry (Roux 2004).

MAPK/ERK kaskáda ovlivňuje regulaci velkého počtu buněčných procesů, jako například embryogenezi, proliferaci, diferenciaci a apoptózu indukovanou podněty, které souvisí se změnami na povrchu buněk, metabolického stavu a prostředí buňky. Kaskáda MAPK/ERK zprostředkovává také různé biologické funkce, jako je růst buněk, adheze, diferenciaci prostřednictvím regulace transkripce, translace a cytoskeletálního přeskupení. Kaskáda MAPK/ERK hraje také určitou úlohu při iniciaci a regulaci meiózy, mitózy a postmitotních funkcí (Carnegello 2011, Pearson 2001).

#### **1.4.4 Proto-onkogenová tyrosin-proteinová kináza Src**

Nereceptorová proteinová tyrosinkináza, která se aktivuje po zapojení mnoha různých tříd buněčných receptorů, včetně receptorů imunitní odezvy, integrinů a dalších adhezních receptorů, tyrosinkináz receptorových proteinů, receptorů sdružených s G proteinem a také cytokinových receptorů. Účastní se v signalizačních cestách, které kontrolují různorodé spektrum biologických aktivit, mezi které patří genová transkripce, imunitní odpovědi, buněčná adheze, progresse buněčného cyklu, apoptózy, migrace a transformace.

Proto-onkogenní cytoplazmatická tyrosinkináza rodiny SRC je exprimovaná v určitých plně diferencovaných buňkách, jako jsou neurony, destičky a makrofágy. Fosforylace aktivační smyčky tyrosinu aktivuje enzym. Fosforylace tyrosinu na C-konci pomocí Csk inhibuje enzym (Ma 2002).

Sekvence "ETEVELYNEF" lokalizovaná na 176-186 v Rab7 je optimální substrátovou sekvencí pro Src kinázu, protože zbytek Y183 může být fosforylačním místem pro Src kinázu. Pro ověření této hypotézy byl vygenerován Rab7Y183F mutant v buňkách HeLa. Buněčné lyzáty byly zpracovány pro detekci fosforylace tyrosinu Rab7. Výsledkem, podle očekávání, byla zábrana fosforylace tyrosinu v Rab7Y183F, což naznačuje, že substituce hydrofobním fenylalaninem za Y183 ruší tyrosinovou fosforylaci Rab7 (Lin 2017).

Protein-tyrosin kinázy obsahují region Pro-Ile/Val-Lys/Arg-Trp-Thr/Met-Ala-Pro-Glu, zatímco protein-serin/threoninové kinázy region Gly-Thr/Ser-X-X-Tyr/Phe-X-Ala-Pro-Glu. Tyto regiony se nacházejí v doménách VI a VII a přispívají k substrátové specifitě kinázy (Hanks 1988).

#### **1.5 Tau protein a neuropatologie**

Alonso 2004 uvádí výčet míst na Tau, která patří mezi kritická pro hyperfosforylaci Ser199/Ser202/Thr205, Thr212, Thr231/Ser235, Ser262/Ser356, a Ser422. Další místa a posttranslační modifikace Tau popisuje Hanger 2007. Ferrer 2001 uvádí výčet kináz, které mohou fosforylovat neurofilamenty a Tau protein. Jsou to PKA, PKC, cyklin-dependentní kinázy 5 (Cdk5), extracelulární signál-regulující kinázy (ERK), GSK-3, proteinkinázy

aktivované stresem (SAPK) a kaseinové kinázy I a II (CAMK1 a CAMPK2). Většina fosforylačních míst se skládá z motivu opakovaných sekvencí Lys-Ser-Pro.

Dále uvádí, s odvoláním na Robinson 1997, že bovinní Tau nebo rekombinantní lidské Tau proteiny mohou být hyperfosforylovány proteinovou kinázou PK40, která zkříženě reaguje s ERK-specifickými protilátkami (PK40erk) a vytváří párová šroubovitá vlákna připomínající ty, které se vyskytují u AD. Přesto fosforylace Tau různými kinázami závisí na pořadí, ve kterém kinázy fosforylují Tau. Výše zmíněná fosforylace PKA částečně inhibuje působení PK40erk.

Intraneuronální inkluze vytvořené z hyperfosforylované mikrotubuly asociované s Tau proteinem a extracelulární depozity  $\beta$ -amyloidního proteinu ( $A\beta$ ) jsou definující pro neuropatologickou charakteristiku Alzheimerovy choroby (Alzheimer disease, AD) (Goedert 2006). Mezi charakteristické znaky AD patří  $A\beta$  plaky, neurofibrilární spleť (Neurofibrillar Tangles, NFT) a neurodegenerace.  $A\beta$  peptid je hlavní složkou senilních plaků a bylo dokázáno, že  $A\beta$  vlákna z pórů v neuronech jsou zodpovědná za příliv vápníku do neuronu a působí tak jeho smrt (Demuro 2011). NFT se skládají z neurofibrilárních proteinových agregátů, které se tvoří na podkladě hyperfosforylovaného Tau proteinu, což je jeden z mikrotubulárních proteinů (Kuhla 2007). Roberson 2007 uvádí, že  $A\beta$  mohou být zodpovědné za akceleraci agregace Tau proteinu v NFT. Je prokázáno, že vliv na tvorbu NTF má i chybné štěpení Tau proteinu za Asp421 kaspázou, kdy dochází k tvorbě peptidu o velikosti 20 AK, který snadno tvoří amfipatický alfa-helix (Gamblin 2003).

Tau inkluze při absenci extracelulárních depozitů jsou charakteristické pro AD a několik dalších neurodegenerativních onemocnění, včetně progresivní supranukleární paralýzy, kortikobazální degenerace, Pickovy nemoci, dědičné frontotemporální demence a parkinsonismu asociovaného s chromozómem 17(FTDP-17T) (Poorkaj 1998). Identifikace mutací v Tau v FTDP-17T byla stanovena jako kauzální dysfunkce Tau proteinu v neurodegenerativních chorobách (Poorkaj 1998).

Všechna výše uvedená onemocnění byla spojena s abnormálně vláknitou helikální formou hyperfosforylované frakce Tau. Například fosforylace na serinu 422 (S422) a trojnásobná fosforylace na tyrosinu 212 (T212), S214 a T217 je abnormální, protože není přítomná u Tau v normálním dospělém lidském mozku (Yoishida 2006). K fosforylaci

dochází i na dalších místech na Tau v normálním mozku, ovšem méně než na vláknitém Tau (Delobel 2008).

Patologická cesta vedoucí z normálního rozpustného na nerozpustný Tau protein je pravděpodobně zdrojem neurodegenerace u těchto onemocnění. Na základě výsledků v linii myši exprimující lidský Tau s mutacemi FTDP-17T bylo zjištěno, že hyperfosforylace Tau vyskytující se na mnoha místech předchází zformování Tau do vláknité nerozpustné formy (Allen 2002). Navíc zvýšení fosforylace rozpustného Tau vedlo ke zvýšení tvorby vláken, což naznačuje, že fosforylace může vést k zformování vláken (Schneider 1999).

Studie (Schneider 1999) uvádí, že fosforylace Tau na některých místech brání sestavení vláken, a že její abnormální fosforylace není dostatečná pro tvorbu vláken v buněčných modelech.

Termínem Tauopatie rozumíme směšnou skupinu neurodegenerativních onemocnění, které se projevují vzrůstem fosforylace na Tau proteinu v cytoplazmě neuronů a gliových buněk a v jejich procesech. Ferrer 2001 shrnuje, že abnormální kumulace takového Tau je pro tyto nemoci charakteristická. Navíc isoformy tohoto proteinu mezi sebou produkují specifické Tau vazby, které jsou patrné po označení specifickými protilátkami proti fosforylovanému Tau podrobené technice Western blot (Ferrer 2001).

## **1.6 Strategie a specifika přípravy vzorku v proteomické analýze**

Dnešní proteomická analýza využívá mnoha různých přístupů k samotné analýze. Například protilátky proti fosforylovaným proteinům 2-D elektroforézu nebo proteinové čipy. Jedním z využívaných přístupů je hmotnostně spektrometrická analýza například ve spojení s kapalinovou chromatografií. V tomto uspořádání jsou proteázou naštěpené proteiny z komplexního vzorku nejprve podrobeny separaci kapalinovým chromatografem a eluce je vedena přímo na iontový zdroj hmotnostního analyzátoru. Při takovém uspořádání se většinou užívá elektrosprejová ionizace vzorku (ESI) případně ESI s nanosprejem (NSI).

V proteomice se často setkáváme s využitím Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI), která naopak vyžaduje vzorek v pevném stavu. Z toho vyplývá, že různé ionizační zdroje vyžadují, různé metody přípravy vzorků. Přístupu, kdy je

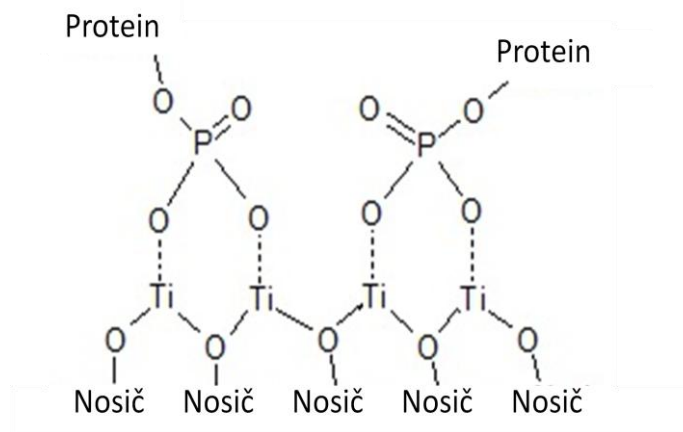
prvně protein štěpen proteázou říkáme "bottom-up". Dalším přístupem je "top-down", kdy jsou analyzovány intaktní proteiny (Ivanov 2011).

Pro zkoumání proteinů resp. fosfopeptidů v reálných vzorcích hmotnostní spektrometrií je třeba při zpracování těchto vzorků, myslet na jejich komplexnost. Právě složitost a množství peptidů, které nejsou předmětem studia, ale jsou přítomny ve vzorku a stěžují analýzu fosfopeptidů. Z tohoto důvodu je zapotřebí vzorky obohatit, což ve fosfoproteomice znamená zvýšit podíl fosfopeptidů k balastním, nefosforylovaným, peptidům.

### **1.6.1 Obohacování fosfopeptidů**

Existuje několik technik, které jsou založeny na principu afinitní chromatografie, kterými lze vzorek obohatit. Jsou to například afinitní chromatografie na imobilizovaných kovech (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC), chromatografie s hydroxyapatitem (Hydroxy Apatite chromatography, HAP), afinitní chromatografie na oxidech kovů (Metal Oxide/hydroxide Affinity Chromatography, MOAC) aj. Tyto techniky mohou být doplněny o iontově výměnou chromatografií na silných katexech (Strong Cation-eXchange chromatography, SCX), hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC), interakční chromatografie s elektrostatickou repulzí (Electrostatic Repulsion hydrophilic Interaction Chromatography, ERLIC) (Šalovská 2012).

Princip MOAC byl využíván v této práci a spočívá v afinitě fosfopeptidů k oxidům kovů, jako je např.  $\text{TiO}_2$ . Při nízkém pH dochází k protonizaci fosfátů a kyselých zbytků na peptidu. Principiálně se jedná o sdílení iontů ve vazbě mezi Lewisovými kyselinami (fosfokupinou na fosfopeptidu) a Lewisovými zásadami ( $\text{TiO}_2$ ), jak je patrné z Obrázek 3 (Beltran 2012). Peptidy, které nemají ve své struktuře fosforylované aminokyseliny, jsou na  $\text{TiO}_2$  zadržovány méně.



**Obrázek 3:** Schéma vazby proteinu na TiO<sub>2</sub> povrch nosiče

Nespecificky mohou být vázány i peptidy s vyšším obsahem aminokyselin s karboxylovými skupinami v postranním řetězci (asparagové a glutamové) (Klemm 2006). Ke snížení nespecifické sorpce se mimo jiné používají některé monokarboxylové a dikarboxylové kyseliny např. kyselinu mléčnou, glutamovou, dihydroxybenzovou kyselinu (DHB) aj., které soutěží o vazebná místa na nosiči s nefosforylovanými peptidy (Sugiyama 2009).

Mezi další chemikálie pro zvýšení vazebné specifity patří např. kyselina trifluoroctová nebo mravenčí pro úpravu pH a acetonitril, který potlačuje hydrofobních interakce se sorbentem. Použití vysoké koncentrace karboxylové kyseliny ve fázi navazování fosfopeptidu na nosič může zvýšit specifitu vazby, ale současně může docházet ke ztrátám slaběji vázaných fosfopeptidů. Toto se týká především peptidů monofosforylovaných (Šalovská 2012).

Samotné provedení obohacení fosfopeptidů je v literatuře popisováno několika způsoby, offline a online. Off-line přístup je rozšířenější a dělí se ještě na dva způsoby provedení. Sorbent lze umístit buď do špičky pipety a obohacení se provádí opakovaným průchodem roztoku peptidů přes sorbent, nebo se v mikrozkumavce, kde jsou částice s oxidem kovu smíchány s roztokem peptidů, což může být výhodnější díky delšímu kontaktu vzorku s částicemi (Beltran 2012, Šalovská 2012).

Po provedení patřičného počtu promytí sestupnou řadou roztoků acetonitrilu a trifluoroctovou kyselinou (trifluoroacetic acid, TFA), které zajišťují vymytí nespecificky

navázaných peptidů, je obvykle provedena bazická eluce. Eluce monofosforylovaných peptidů byly provedeny například roztokem 1 % TFA ve 20 % acetonitrilu a multifosforylované v zásaditém pH vodným roztokem hydroxidu amonného (Šalovská 2012). Z důvodů, které uvádí Beltran 2012, se vícenásobně fosforylované peptidy vážou silněji na  $\text{TiO}_2$  a k překonání tohoto limitu je třeba použít bazický eluční pufr, o určité iontové síle. Takový pufr musí být schopen hydrolyzovat fosfát, který se váže na  $\text{TiO}_2$ . Online přístup je popsán v Kapitole 1.9.

$\text{TiO}_2$  je pravděpodobně nejpoužívanějším typem sorbentu pro obohacování fosfopeptidů. Může být použit i oxid zirkoničitý ( $\text{ZrO}_2$ ), který vykazuje podobné vlastnosti jako  $\text{TiO}_2$ , který ovšem má vyšší afinitu k multifosforylovaným peptidům (Kweon 2006). Podobné vlastnosti jako MOAC vykazuje i IMAC, který využívá Al, Ga, Fe aj. Srovnáním IMAC s MOAC se podrobněji zabývá Beltran 2012, Larsen 2005 a Tichý 2011.

### 1.6.2 Vlastnosti $\text{TiO}_2$

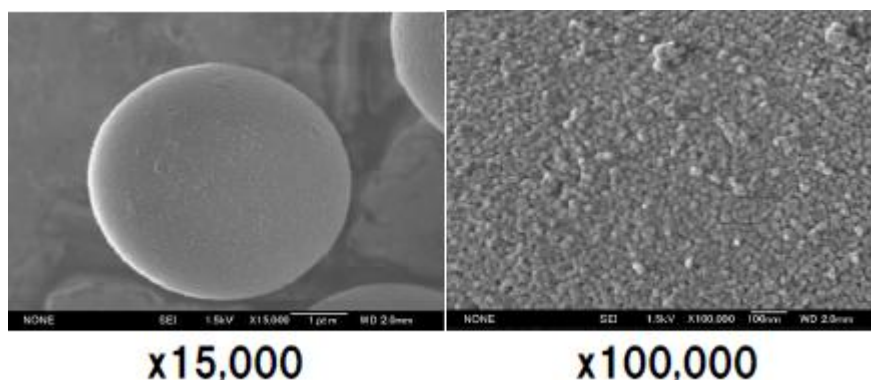
$\text{TiO}_2$  je dobře dostupný a tedy nejužívanější sorbent k obohacování fosfopeptidů. Je vysoce selektivní k fosfopeptidům, udržuje stabilní vazbu s fosfopeptidy při promývání, které je nedílnou součástí obohacování (Klemm 2006). Struktura a zadržovací schopnosti titanu jsou silně závislé na technice tepelného zpracování částic (Tani 2002). Efektivitu obohacování oxidem titaničitým lze ovlivnit přidáním různých činidel (Larsen 2005), což je popsáno v Kapitole 1.6.1.

Dalšími činidly, která mají vliv na sorpční vlastnosti, jsou substituované karboxylové kyseliny s aromatickým jádrem, monokarboxylové aromatické kyseliny nebo alifatické kyseliny např. mléčná, trifluoroctová nebo octová. U těchto kyselin byla prokázána vysoká účinnost (Breitkopf 2012). Nejúčinnější z aromatických karboxylových kyselin obsahují hydroxylovou skupinu v poloze *ortho*, což zajišťuje redukci nespecifické vazby peptidů lépe než v případě hydroxylové skupiny v poloze *meta* (Dobson 2000). Podle studie Sugiyama 2007 se jeví jako nejvhodnější mezi alifatickými kyselinami, kyselina mléčná, jejíž schopnost potlačit nespecifickou vazbu byla nejvyšší. Titanový sorbent použitý ve studii, který byl modifikován kyselinou mléčnou, měl oproti ostatním porovnávaným látkám nejvyšší počet identifikovaných fosfopeptidů a také nejvyšší poměr fosforylovaných k nefosforylovaným peptidům.

Dalším podstatným faktorem pro selektivitu obohacování je hmotnostní poměr peptidů a  $\text{TiO}_2$ . Podle studie Li 2009, která pracovala s lyzátem HeLa buněk je optimální hmotnostní poměr od 1:2 do 1:8. Vyšší nebo nižší poměr selektivitu nezvyšoval. Ve studii je zmíněno, že mnohonásobně fosforylované peptidy byly lépe identifikovány při malém množství částic  $\text{TiO}_2$ , a monofosforylované peptidy při vyšším množství částic.

### 1.6.2.1 Titansphere

Jedná se o komerčně vyráběný produkt (GL Sciences, Japan). Jde o 10  $\mu\text{m}$  velké sférické částice  $\text{TiO}_2$ , které mají částečně porézní povrch a ideální fyzikální vlastnosti pro chromatografii. Výrobce uvádí, že ve srovnání s běžnými materiály na bázi oxidu křemičitého má Titansphere několik výhod. Vykazuje velmi dobré vlastnosti mj. při sorpci fosfopeptidů, vysokou selektivitu k fosforylovaným peptidům, kterou lze podpořit alifatickou hydroxykyselinou, snadno se s ním zachází při promývání a eluci. Práce s ním nevyžaduje žádné speciální podmínky. Jeho pracovní schopnost není omezena na jednoduché směsi peptidů, ale lze ho použít i pro buněčné lyzáty (Pinkse 2004, Deng 2016, Tan 2013).



**Obrázek 4:** Titansphere 10  $\mu\text{m}$  velké sférické částice  $\text{TiO}_2$  zvětšení 15 000 krát (vlevo), 100 000 krát (vpravo)

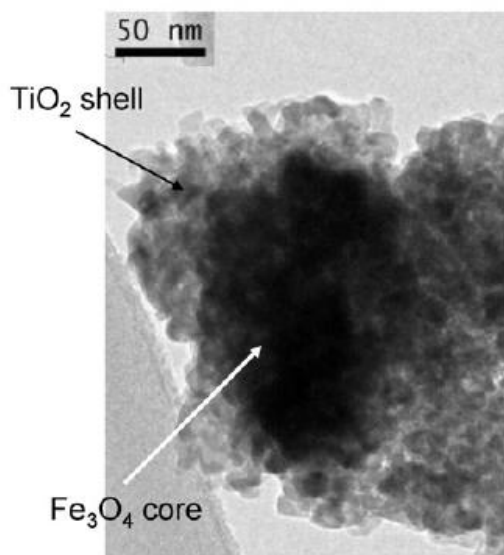
Převzato z internetového zdroje 1

### 1.6.2.2 Magnetické core-shell nanočástice

Výhoda magnetických nosičů spočívá v možnosti snadné separace na magnetickém separátoru, při zacházení se vzorkem. Magnetické jádro  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a povrch  $\text{TiO}_2$  spolu tvoří částice o vel. 100 nm. Příprava částic použitých v této práci vychází z práce Alvarez 2010, ačkoli množství a druh reagentů pro přípravu částic používaných v této práci byly upraveny.



Vývoj magneticky aktivních nosičů je v posledních letech předmětem mnoha projektů a výzkumné činnosti. Je předmětem mnoha úprav, při snaze o zachování magnetických vlastností a vysoké selektivity. Další důležitou vlastností je citlivost, tato se liší v závislosti na výrobní metodě a provedené modifikaci. Nosič má stejně jako Titansphere výborné selekční vlastnosti a v tomto ohledu se od něj velmi neliší, avšak jeho velkou devizou je magnetismus, který umožňuje z postupu separace vyloučit centrifugu.

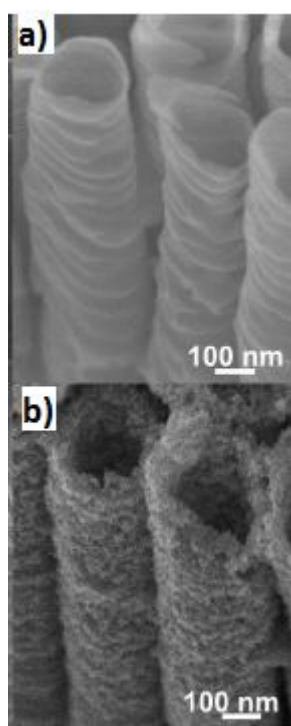


**Obrázek 5:** "Core-shell" nanočástice; TiO<sub>2</sub> shell - TiO<sub>2</sub> schránka, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core - Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> jádro  
Převzato z: Alvarez 2010

### 1.6.2.3 Titanové nanotrubicе s magnetickými vlastnostmi

Kulovité magnetické materiály nabízejí svůj sférický povrch pro sorpci vzorku, ale lze využívat i jiné tvary, které mohou dosahovat vyššího aktivního povrchu, případně mohou být pokryty magnetickými nanočásticemi. Dalším faktorem je nižší cena oproti mezoporéznímu Titansphere. Ve studii Wijeratne 2015 byly použity titanové nanotrubicе radiálně tvořené na titanových drátech. Výsledky ukazují, že tato architektura může poskytovat fosfopeptidové obohacení s podobnou kapacitou jako komerčně dostupný Titansphere, který je obecně považován za jeden z nejlepších. Dále je třeba zmínit, že rozměry mohou být měněny v délce a průměru, takže je možné přesně nastavit parametry a optimalizovat jejich funkčnosti. Dále bylo prokázáno, že TNT nabízejí podobnou účinnost pro obohacení fosfopeptidů ve srovnání se současným nejlepším nosičem. Na jejich vnitřní a vnější povrch lze umístit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočástice o velikosti 8 nm, díky kterým má nosič magnetické vlastnosti. Shresha 2012

shrnuje ve své práci vlastnosti, kterými disponují trubice a které lze využít napříč medicínami a průmyslovými aplikacemi. Přípravu nanotrubic, tak jako např. v této práci, lze provést podle práce (Macák 2013), jejímž produktem byly trubice s vnitřním průměrem asi 125 nm a práce (Das 2017), kde byl vnitřní průměr trubic 230 nm. Poté byl produkt sonifikován v 5% isopropanolu. Potažení magnetickými nanočásticemi bylo provedeno prolitím roztoku nanočástic přes trubice, pod kterými byl umístěn silný magnet. Pro pokrytí nanotrubic bylo, navzdory poznatkům z literatury, použito 10  $\mu\text{l}$  na 1  $\text{cm}^2$  povrchu nanotrubic (Kupčik 2017). Množství adsorbovaného proteinu závisí na vnitřním průměru, délce nanotrubic, tedy sorbčním povrchu i na náboji (Kulkarni 2016).



**Obrázek 6.:** Snímek ze skenovacího elektronového mikroskopu; a) nanotrubice  $\text{TiO}_2$  b) nanotrubice  $\text{TiO}_2$  pokryté  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  Převzato a upraveno z Kupčik 2017

### 1.6.3 Příprava vzorku pro MS analýzu po obohacení

Eluční roztoky, které vznikají při zpracování vzorku, by měly mít co nejmenší objem a je proto potřeba je zakoncentrovat. V tomto stavu jsou vzorky podrobeny kapalinové chromatografii na reverzní fázi k odstranění zbylých nečistot. Její princip spočívá v interakci analytu s nepolární stacionární fází (silikagel s krátkými řetězci uhlovodíků) a s polárním rozpouštědlem. Polární a iontové sloučeniny, kterými sole bez pochyby jsou, jsou unášeny polárním rozpouštědlem (voda) a analyt s afinitou k nepolární fázi je zadržován na koloně.

Eluce analytu z kolony probíhá méně polárním rozpouštědlem (acetonitril), které dostatečně narušuje hydrofobní interakce mezi analytem a stac. fází (Gobom 1999).

## 1.7 Hmotnostní spektrometrie

Ve fosfoproteomice se uplatňují především MALDI, ESI případně NSI ve spojení s lineární iontovou pastí + orbitrap (LTQ-Orbitrap) nebo s cyklotronovou iontovou rezonancí s Fourierovou transformací (Fourier transformation-ion cyclotron resonance, FT-ICR) nebo průletovým analyzátozem (time of flight, TOF). Různé hmotnostní spektrometry vyžadují různé metody přípravy vzorků. Pro NSI musí být množství vzorku a činidel upraveno ze specifických postupů pro ESI. Navíc v NSI (Du 2009) mohou být v porovnání s ESI vyžadovány další postupy, jako je odsolení ZipTip, což je jednokrokové odsolení pro peptidy a proteiny přes C4 sorbent.

MALDI-TOF vyžaduje matrici pro ionizaci v pevné fázi, LTQ analyzuje jen proteolyticky štěpené peptidy, zatímco LTQ-Orbitrap je schopen analyzovat jak peptidy, tak intaktní proteiny. Vzorky musí být připraveny odlišně pro různé hmotnostní spektrometry, různé aplikace stejného nástroje, jako je ESI a nanosprejem ESI (NSI) v LTQ Orbitrap. Mohou také vyžadovat odlišné metody přípravy vzorků.

### 1.7.1 Princip MS

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) je analytická technika, jejíž princip spočívá v měření poměru hmotnosti a náboje vzorku v závislosti na pohybu v elektrickém nebo magnetickém poli. V první fázi je třeba vzorek převést na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty pak separovat právě podle hodnoty poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), kde náboj nabývá celočíselné kladné hodnoty. Výsledkem je tzv. hmotnostní spektrum, na jehož ose  $x$  je vynesena interval hodnot  $m/z$  a na ose  $y$  intenzita odezvy detektoru. Jedná se o destruktivní metodu, která je velmi citlivá. Množství vzorku, které je zapotřebí k analýze se pohybuje v řádu nano až mikrogramů, potažmo femtomolů. McLafferty 1996 publikoval detekční limit 0.7–3.0 attomolů na FT-ICR.

Posloupnost dějů, probíhajících při MS: převedení vzorku z pevné nebo kapalné fáze na plynné ionty, jejich separace podle  $m/z$  a detekce. Schematicky vyjádřená ionizace molekuly vzorku a její fragmentace, probíhající při MS:



ionizace molekuly za vzniku molekulárního iontu



rozpad molekulárního (prekursorového) iontu na fragmentový (produktový) ion a elektroneutrální částici

Pro analýzu iontů v hmotnostním spektrometru, včetně těch obsahující analyzátory Orbitrap, FT-ICR a TOF, je naprosto klíčové vakuum v zařízení ( $10^{-4}$ – $10^{-8}$ Pa), které brání vzájemným kolizím částic v plynné fázi. Různé typy analyzátorů pracují za různě silného vakua. Přístroje s dlouhou dráhou letu iontů potřebují vysoké vakuum, protože umožňuje delší střední dráhu letu molekulových iontů a svazek iontů letících na detektor je lépe fokusován. Na druhou stranu vysoké vakuum značně prodražuje přístroj. Pro měření iontů v přístroji slouží i iontová optika (C-past, kvadrupól, oktapól, filtry neutrálních částic aj.), jejichž zapojení do přístroje se odráží také na ceně.

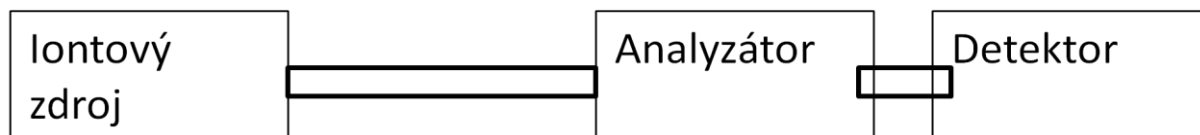
Srážky iontů ovšem lze využít k fragmentaci molekulových iontů. Lze vybrat svazek iontů podle  $m/z$  a namísto okamžitého odeslání na detektor, je možné ho podrobit fragmentaci. Tím vzniknou nové ionty, které jsou analyzovány. Tato technika vzniku se nazývá tandemová hmotnostní spektrometrie, (El-Aneed 2009; Glish 2003).

### 1.7.2 Základní části hmotnostního spektrometru

Základem každého hmotnostního analyzátoru je iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Iontové zdroje užívané k proteomické analýze jsou v zásadě dva, MALDI a ESI. Pokročilé přístroje obsahují soustavu tzv. skimerů, na něž je přivedeno vztupné napětí, a svou konstrukcí zaostřují svazek iontů.

Jako hmotnostní analyzátor jsme v praktické části této diplomové práce využívali hybridní hmotnostní spektrometr využívající Orbitrap v kombinaci s lineární iontovou pastí (linear ion trap, LIT) s možností indukované kolizní disociace (CID), která probíhá

v LIT, nebo vysokoenergetické kolizní disociace (HCD) probíhající v dedikované fragmentační cele. Obě tyto možnosti, případně jejich kombinace, lze využít při fragmentaci. Více je popsáno v Kapitole 1.8.



**Obrázek 7:** Základní schéma hmotnostního spektrometru

### 1.7.3 Ionizace

Obecně dělíme ionizační techniky na "*tvrdé a měkké*" podle energie, která je potřebná pro ionizaci vzorku nebo podle tlaku, za kterého jsou schopny pracovat. Rozeznáváme iontové zdroje pracující za atmosférického tlaku (API) a zdroje operující za vakua. Nelze určit univerzální způsob ionizace. Různé způsoby ionizace jsou vhodné pro různou chemickofyzikální povahu vzorku.

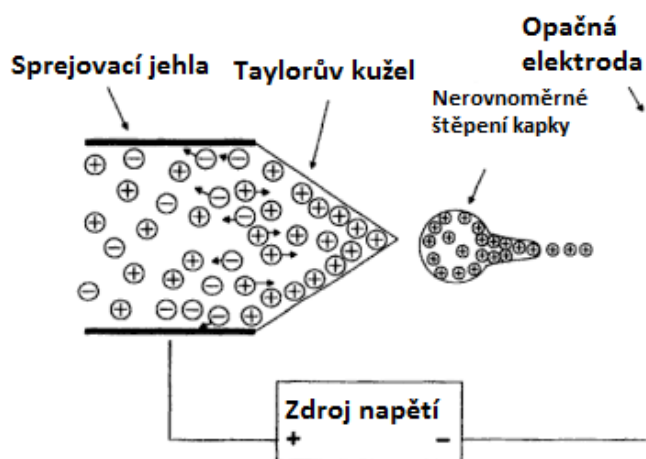
#### 1.7.3.1 Ionizace elektrosprejem

V ESI je vzorek rozpuštěn v polárním, těkavém rozpouštědle (voda, metanol, etanol nebo ACN) a prochází přes jehlu s vysokým kladným nebo záporným potenciálem (vzhledem k povrchu trysky) Vysoký napětí (1 až 4 kV) mezi jehlou a tryskou způsobuje, že tekutina vytváří Taylorův kužel, který je na špičce obohacen pozitivními nebo zápornými ionty. Sprej nabitých kapiček vylétává z kuželu díky elektrickému poli. Kapky se smršťují odpařováním, kdy je trhá náboj na jejich povrchu, což jim usnadňuje proud dusíku, který prochází přes přední stranu ionizačního zdroje.

Ionty se vytvářejí při atmosférickém tlaku a procházejí skrze otvor do vakuové oblasti a odtud přes malý otvor do vysokého vakua MS analyzátoru (Aleksandrov 1984, Fenn 1989, Yamasitha 1984). K protonaci v pozitivním ionizačním módu je často přidáno malé množství kyseliny mravenčí nebo kyseliny octové. V režimu negativní ionizace je přidán roztok amoniaku nebo těkavý amin, aby se podpořila deprotonace analytu molekul.

ESI-MS může být použit pro analýzu polárních molekul v rozmezí od méně než 100 Da až po celý virus s hmotností 2 MDa (Tito 2000) a dokonce i 100 MDa jediný iont DNA

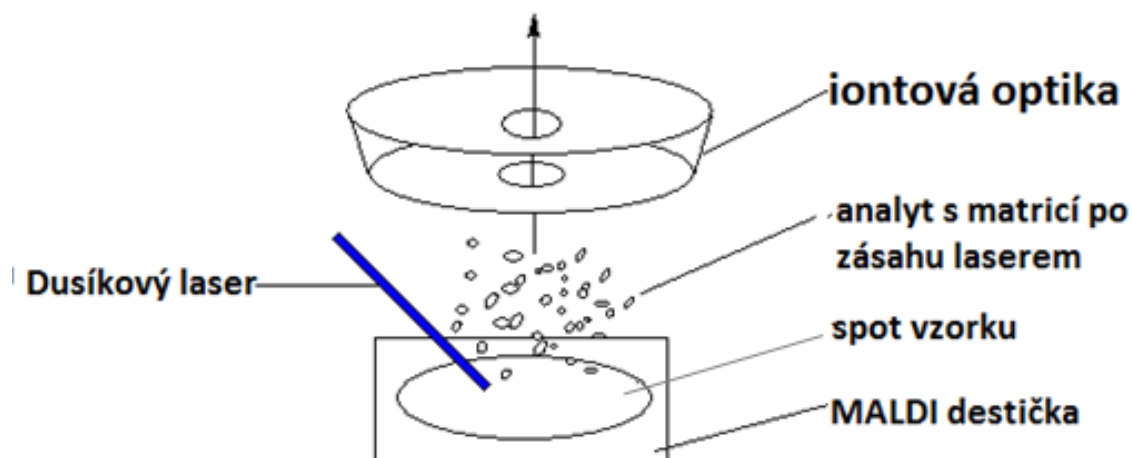
(Chen 1995). Tuto techniku můžeme označit za poměrně šetrnou. Důležitým rysem ESI je schopnost generovat násobně nabité ionty, což umožňuje analýzu velkých proteinů v MS analyzátořech s omezeným rozsahem  $m/z$ . Nevýhodou ovšem je, že vzorky poskytují komplexní spektra vícenásobně nabitých iontů, což činí z interpretace ESI spekter obtížnou disciplínu a v praxi musí počítače transformovat nabité iontové obálky na jednotlivé píky o příslušné molekulové hmotnosti. ESI umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní stanovení v omezeném koncentračním rozsahu. (Pramanik 2002, El-Aneed 2009)



**Obrázek 8:** Uspořádání ESI  
Převzato a upraveno z Pramanik 2002

### 1.7.3.2 Ionizace MALDI

MALDI ionizace je měkká technika, která se používá například pro ionizaci molekul biopolymerů, např. proteinů, lipidů (Balazy 2004), a nukleové kyseliny (Gut 2004). Co se týče polarit, lze MALDI uplatnit u látek nepolárních až polárních. Pro MALDI je extrémně důležitá matrice, mezi jejíž funkce patří absorpce laserové energie a přeměna většiny z ní na teplo. Matrice v plynném stavu má dostatečnou energii, aby zachytila a poté vyloučila analyt, který byl v ní nebo na ní kokrystalován. Typické lasery pro MALDI používají impulsy od několika stovek nanosekund (např.  $N_2$  337 nm, 3 ns nebo trojnásobné Nd: YAG, 355 nm, 4-7 ns, Er: YAG 2,98  $\mu$ m 200 ns) (Cole 2012). Tato ionizace pracuje především se vzorky v pevné fázi. Ionizace probíhá obvykle za sníženého tlaku: ( $< 1$  Pa). Vznikají většinou jednou či dvakrát nabité ionty (Croxatto 2007) a může docházet k tvorbě aduktů s alkalickými kovy.



**Obrázek 9:** MALDI ionizace

Technika nanášení vzorku společně s matricí na desku určenou pro MALDI se provádí několika způsoby. Vzorek se může smíchat s matricí a společně nanést na desku, což je obvyklý způsob, případně se nanáší vzorek na desku a poté se převrství matricí. Existuje i způsob, kdy se nanáší vzorek na spotu, na kterou je prve nanesena matrice a poté je vzorek převrstven matricí. Dalšími modifikacemi vznikly metody odvozené od MALDI jsou to: laserová ionizace (Laser Desorption/Ionization, LDI), Povrchem zlepšená laserová ionizace (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation, SELDI) a Desorpční ionizace na porézním silikonu (Desorption Ionization On porous Silicon, DIOS). DIOS využívá na terčiku porézní silikon. LDI je metoda, kdy samotný analyt plní funkci matrice, není tedy nutné přidávat matrici. SELDI využívá imobilizovanou skupinu na terčiku, na kterou se specificky váží určité proteiny, následuje aplikace matrice a MALDI ionizace.

Po nanesení na desku z pravidla dochází k odpaření rozpouštědla matrice a jejího vykrystalizování. Vzorek společně s matricí je krátkým pulsem dusíkového laseru desorbován a unášen do analyzátoru (EI-Aneed 2009). MALDI je pulzní technika, která je často spojená s TOF analyzátozem a poskytuje tak vysokou citlivost a jednoduché

provedení na kondenzovaném vzorku (Fuchs 2009), je možné MALDI spojit i s FT-ICR, qTOF nebo orbitrapem, případně s iontovou pastí, v naší laboratoři jsme využívali spojení MALDI a LTQ-Orbitrap.

Mezi vhodné typy matrice patří aromatické karboxylové kyseliny, které absorbují UV záření při vlnové délce laseru: kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicovou (CHCA) s přídavkem hydrogencitrátu diamonného (DAHC), 2,5-dihydroxybenzoová (DHB), chlorsalicylová, sinapová, trihydroxyacetofenon (THAP) jejich deriváty aj. Podrobněji se tímto zabývá Fukuyama 2011. Je obecně známo, že CHCA je vhodná pro vzorky do 5000 Da měřené v pozitivním módu, u kterých není očekáván obsah fosforylovaných peptidů. DHB samotná je vhodná pro detekci menších molekul, s přídavkem kyseliny ortofosforečné, která podporuje ionizaci fosfopeptidů, lze ji použít pro jejich detekci. THAP je vhodná pro detekci fosfopeptidů. Sinapová kyselina je vhodná pro detekci molekul větších než 5000 Da.

#### **1.7.4 Analyzátory v hmotnostní spektrometrii**

Účelem hmotnostního analyzátoru je dělení iontů po ionizaci podle poměru  $m/z$ . Analyzátor je umístěn mezi iontovým zdrojem a detektorem. Dělení iontů probíhá za vysokého vakua, které se liší podle typu analyzátoru. Analyzátory se od sebe navzájem liší v mnoha směrech, např. rozlišení, pořizovací náklady přesnost a především princip. Obecně platí, že nejméně přesné s nejmenším rozlišením jsou kvadrupól a iontová past. Společně s přesností a rozlišením stoupají i pořizovací náklady. Mezi analyzátory s nejvyšší přesností patří Orbitrap, FT-ICR a TOF (Hu 2005).

Hlavní analyzátory, se kterými setkáme při proteomické analýze jsou kvadrupól, Orbitrap, LIT včetně jejich kombinací a TOF analyzátor. Dalšími využívanými analyzátory jsou FT-ICR a sférická iontová past (IT).

##### **1.7.4.1 Kvadrupólový analyzátor**

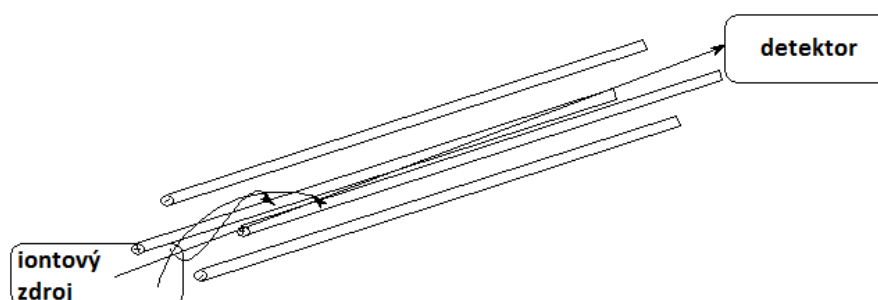
Základním principem kvadrupólového (dnes se můžeme setkat i s oktapólovým) hmotnostního filtru jsou tyče elektricky spojeny v párech. Dva protilehlé páry vždy dávají DC a RF potenciály o stejné velikosti, ale s opačným znaménkem. Ionty vystupující ze zdroje,



typicky zrychlené potenciálem 5 až 20 V vstupují do oblasti analyzátoru mezi tyčemi a pohybují se rovnoběžně s tyčemi. Při daných hodnotách potenciálů DC a RF budou mít pouze ionty v určitém úzkém rozmezí  $m/z$  stabilní trajektorie. Rozsah  $m/z$  iontů, které procházejí, závisí na poměru mezi potenciálem DC a RF. Ionty, které nemají stabilní trajektorii, narazí na tyče, nikdy tedy nedosáhnou detektoru. Pohyb iontu letícího v kvadrupólovém poli je popsán Mathieuovou rovnicí (Mathieu 1868, McLachlan 1947).

Kvalitativně, těžké (inertnější) ionty většinou reagují na DC složku pole, zatímco lehčí (rychlejší) ionty reagují na RF složku. Jeden pár tyčí funguje jako vysoko propustný filtr a nutí těžké ionty zůstat uprostřed mezi elektrodami. Lehčí ionty reagují rychleji a jednou za cyklus jsou přitaženy k elektrodě změnou jedné ze složek (DC nebo RF) na krátký okamžik. Jestliže je hmotnost iontu dostatečně nízká, je takto zrychlen a zasáhne elektrodu předtím, než se síla znovu změní. Opačný pár tyčí funguje jako nízkoprůchodový filtr. Ionty s vysokou hmotou jsou přitaženy a narazí na jednu z elektrod (Ekman 2009).

Při zkoumání určitého rozsahu  $m/z$  jsou hodnoty výše zmíněných veličin měněny podle algoritmu výrobce tak, aby došlo k analýze co nejširšího spektra. Šíři spektra si může uživatel zvolit. Tento hmotnostní analyzátor je velmi rychlý, umožňuje kvantifikaci (s kontinuálním iontovým zdrojem) a je poměrně levný a hlavně můžeme v něm provádět fragmentaci iontů. Jeho nevýhodami jsou relativně nízká citlivost ve srovnání s moderními konstrukcemi (Orbitrap, FT-ICR atd.), malé rozlišení, a jeho rozsah je omezený, přibližně  $m/z < 4000$ .



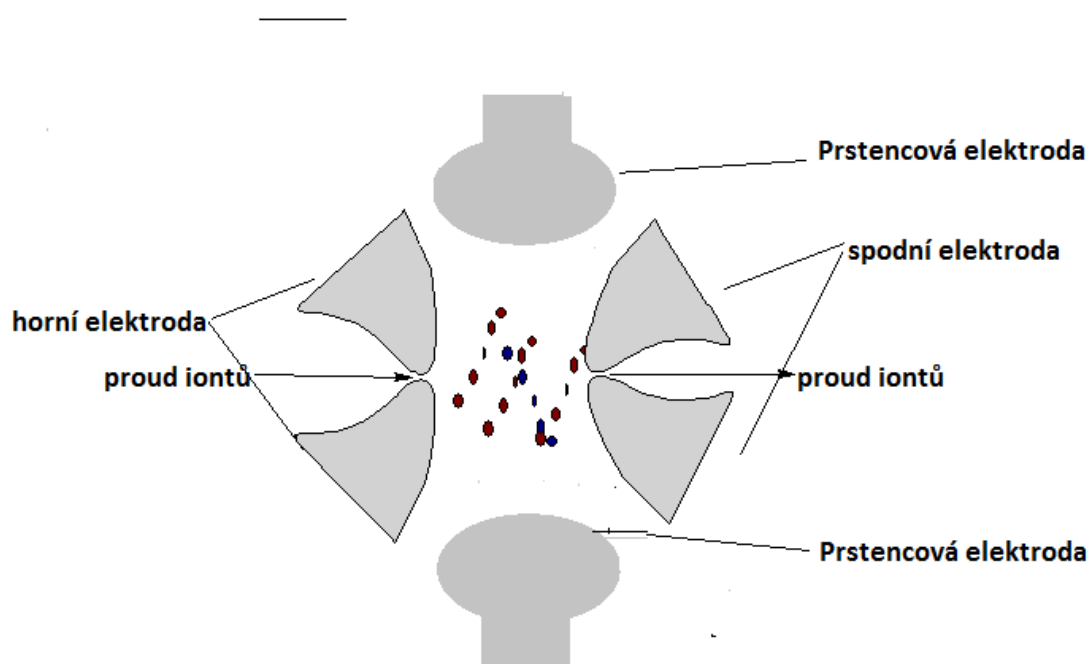
**Obrázek 10:** Schéma výběru iontového svazku při průletu kvadrupólovým analyzátozem

Kvadrupóly lze skládat paralelně a kombinovat s jinými analyzátory, kde provádějí předselekcí nebo fragmentaci iontů. Trojitý kvadrupól (QqQ) je široce používaný přístroj v tandemové spektrometrii, zejména v bioanalytických testech. QqQ v kombinaci s online separací LC se často používá v kvantitativní analýze molekul, které jsou níže zastoupeny v komplexních směsích (Hopfgartner 2003). V režimu monitorování vybraných reakcí (selected reaction monitoring - SRM) je první kvadrupól QqQ nastaven na výběr daného rozmezí m/z. Nicméně když je vzorek velmi složitý, například tělesné tekutiny jako je sérum nebo moč, rozlišení chromatografické separace často není dostatečně vysoké a kýžená sloučenina, se může společně eluovat s dalšími molekulami ve vybraném rozsahu m/z. Ve většině nástrojů QqQ je druhý kvadrupól ve skutečnosti oktapólem nebo hexapólem, ale z historických důvodů je označován jako kvadrupól. Zde dochází ke kolizi s plynem - fragmentaci.

Třetí kvadrupól je stejně jako první nastaven tak, aby jím procházely molekulové ionty o konkrétním m/z, určitý fragment sloučeniny, která je analyzována. Tento dvoufázový proces filtrování hmoty poskytuje vysokou specifickou i pro vysoce složitě vzorky a relativně rychlé chromatografické separace (Ekman 2009).

#### 1.7.4.2 Iontová past

Iontová past pracuje podobně jako kvadrupól. Navíc zahrnuje třetí rozměr, díky kruhové elektrodě s hyperboloidním průřezem a dvěma postranními elektrodami, ze kterých se skládá. Prostor, který společně vytváří je místem, kde ionty (nad určitou hodnotou m/z) oscilují a jsou zde zadrženy. Tento stav je zajištěn kombinací vloženého střídavého a radiofrekvenčního napětí. Společně s ionty se v pasti nachází i plyn (helium). Tento plyn plní funkci tzv. tlumícího plynu, používá se k tlumení oscilací iontů uvnitř pasti. Postupným zvyšováním amplitudy vysokofrekvenčního napětí dochází k vypuzování iontů z pasti na detektor.



**Obrázek 11:** Schéma iontové pasti

Jinou variantou je lineární iontová past LIT, která funguje celkem podobně jako cylindrická, má však důležité výhody. Během vstřiku může být amplituda hlavního vysokofrekvenčního napětí buď konstantní, nebo proměnlivá. S konstantní amplitudou napětí RF, kde ionty vstupují do aktivního pole zachycování, se iontová kinetická energie rozptýlí během kolizí s atomy tlumícího plynu. Zvýšení amplitudy je synchronizováno s iontovou injekcí. Tato metoda je zvláště vhodná pro vstřikování impulsních iontů, jako je například MALDI, kde je poměrně velké rozpětí počátečních rychlostí iontů (Doroshenko 1993, Eiden 1993).

Cylindrická past je kompaktní zařízení s průměrem a délkou kolem 5 cm a LIT má při podobném průměru délku zhruba 20 cm. LIT má větší objem než cylindrická a může uchovat více iontů. Mezi nevýhody těchto pastí spadá interval výběru hmoty, který často nemůže být nastaven dostatečně úzký pro výběr jednoho izotopu, zvláště ne v případě násobně nabitých iontů. Pro detekci fragmentů s malou hmotností má tento analyzátor limit, který se pohybuje kolem 25 % zachycených iontů (Ekman 2009)

#### 1.7.4.3 Hmotnostní analyzátor doby letu

Princip pulzně-průletového analyzátoru spočívá v měření doby letu iontů, kterou potřebují k průletu letovou trubicí na detektor. Ionty se stejnou kinetickou energií jsou

urychleny krátkým napěťovým pulsem do trubice, takže rychlost iontů s menším  $m/z$  je vyšší než u těch, které mají  $m/z$  vyšší, a proto se pohybují rychleji, tudíž se rychleji dostanou na detektor (Demartini 2013).

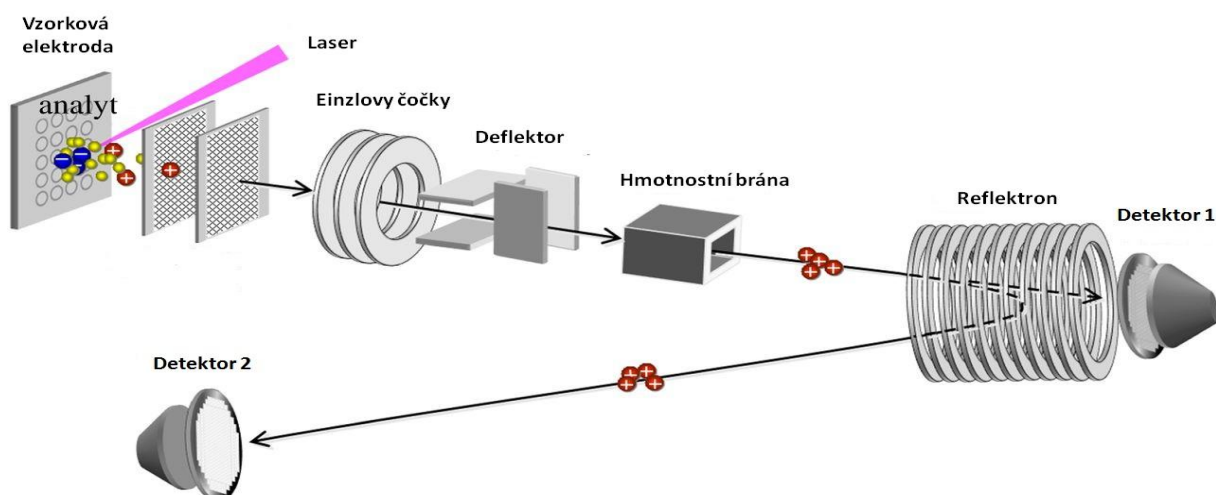
TOF má teoreticky neomezený hmotnostní rozsah (Cotter 1992). V praxi je však rozsah omezen ztrátou kontroly nad kinetickou energií a prostorovými rozloženími iontů s rostoucí hmotností, když jsou vstříkovány do zrychlovací oblasti hmotnostního spektrometru. V důsledku toho se hmotnostní přesnost a rozlišení zmenšují, jak se zvyšuje  $m/z$  (Lee 2011a, Lee 2011b).

Měření spekter je velice rychlé, takže záleží teoreticky pouze na době, po kterou jsou ionty analyzovány, aby stačily dopadnout na detektor. Na rozdíl od kvadrupólu, TOF neselektuje vybraný rozsah  $m/z$ , ale analyzuje celý rozsah (Olthoff 1988).

Samotný lineární TOF má prakticky rozlišení pouze cca 1000-3000 FWHM (Full width at half maximum, plná šíře v polovině maxima), což bylo zlepšeno pomocí dalších konstrukčních prvků jako je např. reflektoru a nebo také zpožděnou extrakcí iontů ze vzorku u MALDI.

Analyzátor TOF doplněný o reflektoru má vylepšené rozlišení až 15000-25000 (popř. 50000) FWHM. Tento typ tofu využívá tzv. iontového zrcadla neboli reflektoru, kdy ionty o stejném  $m/z$  a větší kinetické energii letí hlouběji do reflektoru, čímž urazí delší dráhu, což pak vede k lepší fokusaci iontů o stejném  $m/z$  na detektor. Při ionizaci totiž získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí. To snižuje možnost rozlišení a na záznamu pozorujeme rozšíření jejich píků. Existují i další modifikace, které zlepšují rozlišení TOF analyzátoru.

Mezi nevýhody zapojení reflektoru patří snížení citlivosti kvůli delší dráze a době letu, a ztráta iontů při „obrácení“ směru iontů v reflektoru. Použitelný limit MS analýzy v reflektoru je menší než 10000 – 15000. Analýza intaktních bílkovin a jejich profilování se provádí v lineárním módu. Ovšem, výsledky jsou výrazně přesnější v režimu reflexe než v lineárním režimu (Bonk 2001, Corxatto 2012, Wieser 2012).



**Obrázek 12:** Schéma TOF analyzátoru s Reflektronem  
Převzato a upraveno z: Wang 2016.

#### 1.7.4.4 Orbitrap – Elektrostatická orbitální past

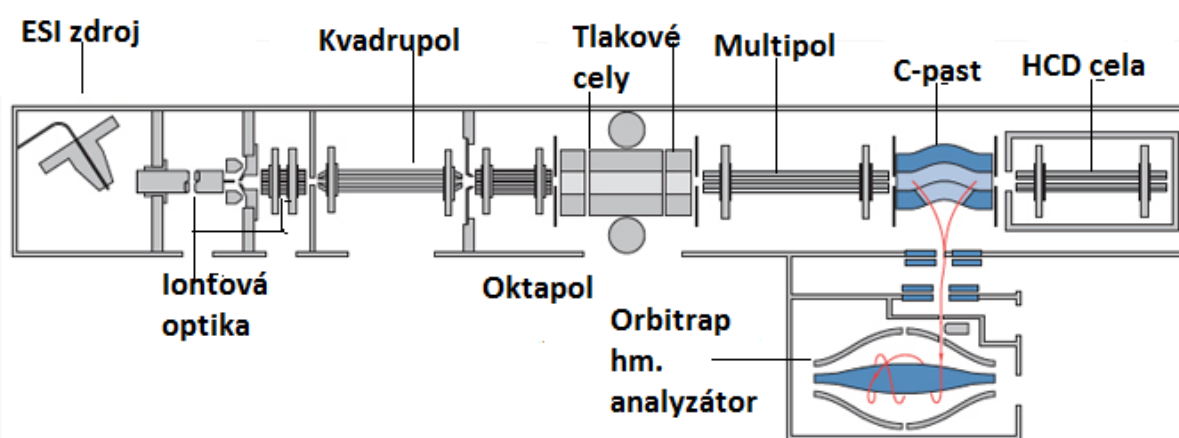
V analyzátoru typu Orbitrap jsou ionty charakterizovány na základě své úhlové rychlosti (frekvence průletu) kolem osy  $z$ . Orbitrap se skládá z vnější a středové vřetenové elektrody, na kterou je vloženo napětí. Ionty kruhovým pohybem rotují okolo a podél středové elektrody. Frekvence průletu v ose  $z$  je nepřímo úměrná odmocnině  $z$   $m/z$  (Hu 2005, Makarov 2000, Makarov 2010). Neexistuje zde magnetické nebo radiofrekvenční pole, takže iontová stabilita je dosažena výlučně ionty, které obíhají kolem axiální elektrody a také provádějí harmonické kmity podél elektrody (Hu 2005, Makarov 2000). To je dáno speciálně zakřivenými elektrodami, díky kterým na ionty nepůsobí vektor  $r$ , který je kolmý na osu  $z$  a přímý pohyb po této ose je čistě kvadratický. Takže pohyb iontů podél osy  $z$  je nezávislý a jeho funkce je nepřímo úměrná poměru  $m/z$  podle rovnice (Ekman 2009):

$$f(z) \propto \frac{1}{\sqrt{\frac{m}{z}}}$$

Samotná analýza probíhá tak, že předselektovaný (podle  $m/z$ ) úzký svazek iontů vstupuje do elektrického pole v cele orbitrapu. Zvýšením napětí, které stlačuje ionty, se uvádějí do pohybu. Následně se napětí stabilizuje, čímž se stabilizuje i pohyb iontů. Úhlové rozšíření, které vzniká po tom, co přestává působit radiofrekvenční napětí, vytvoří rotující prsteneček iontů kolem elektrody a detektor odečítá proud, který ionty indukují svým pohybem.

Pro přepis signálu z detektoru do dat hmotnostní spektra se používá Fourierova transformace (Hu 2005, Scigelova 2006).

Rozlišovací schopnost Orbitrapu, který byl používán při analýzách v této práci byla do 100000, nové Orbitrapy tuto hodnotu již přesahují. Se zvyšujícími se požadavky na přesnost roste i čas potřebný k analýze. Přesnost hmotnostního měření peptidových směsí, v závislosti na konkrétním, analyzátoru pohybuje kolem 2 ppm (Yates 2006). I když má orbitrap oproti FT-ICR nižší rozlišovací schopnost a správnost určení hmoty, ale výrazně nižší pořizovací náklady.



**Obrázek 13:** Orbitrap ve spojení s ESI ionizací  
Převzato a upraveno z: Makarov 2010,

#### 1.7.4.5 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Detekce je založena na měření proudu, který ionty indukují na detekčních deskách svým pohybem po orbitách v ICR cele. Fourierovou transformací se přepočtou frekvence orbitálního průletu do stupnice  $m/z$ , čímž získáme hmotnostní spektrum. Ionty v cele, se pohybují po cykloidální dráze s určitou frekvencí díky v silnému magnetickému poli (cca 7 Tesla), které působí na celu a ionty uvnitř. Poté jsou ionty excitovány širokopásmovým radiofrekvenčním polem (RF) na vyšší dráhy. Po ustání působení RF ionty pokračují na orbitách s větším poloměrem, ale se stejnými frekvencemi. Každá hodnota  $m/z$  má charakteristickou cyklotronovou frekvenci, která ji odpovídá. (Demartini 2013)

Mezi výhody tohoto analyzátoru patří větší rozlišení než, které nabízí Orbitrap a patří mezi nedestruktivní analyzátorů. Jeho velikou nevýhodou jsou pořizovací náklady a požadavky na nízké tlaky.

## 1.7.5 Vybrané detektory v hmotnostní spektrometrii

Úlohou detektoru je přeměnit energii příchozích částic na elektrický signál, který je registrován elektronickými zařízeními a přenesen do počítače systém získávání hmotnostního spektrometru. V principu jde o uvolnění energie při dopadu na detektor, což způsobí emise sekundárních částic, například elektrony nebo fotony. Přičemž počet sekundárních částic často závisí na energii a/nebo na rychlosti dopadajícího iontu. Z toho plyne nevýhoda pro stejně rychlé ionty o nízké hmotnosti, které mohou být v TOF analyzátorech. Mezi základní typy detektorů řadíme Faradayovu klec, elektronový násobič a detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem.

### 1.7.5.1 Faradayova klec

Faradayovu klec tvoří konverzní elektroda (dynoda) miskovitého tvaru, která má povrch z BeO nebo GaP. Dopad iontu způsobí vytržení elektronu z povrchu elektrody a ten dopadne na anodu. Vzniklý elektrický proud je zesílen zesilovačem. Tento typ detektoru má nízkou citlivost, kvůli šumu samotného zesilovače.

### 1.7.5.2 Elektronové násobiče

Elektronové násobiče obsahují více elektrod, které zesilují elektronový proud dopadajících iontů  $10^4$  až  $10^8$  krát. Principiálně se jedná o soustavu dynod, ze kterých dopad elektronu nebo iontu vyvolá vytržení dvojnásobku elektronů. Napětí, které je vloženo na tuto soustavu je obvykle mezi 1,5 až 3 kV. Signál se zesiluje v podstatě geometrickou řadou, což tento detektor činí citlivým.

### 1.7.5.3 Detektor pro Orbitrap a FT-ICR

Orbitrap a FT-ICR nepracují s elektronásobiči nebo fotonásobiči. Detekce oscilace iontů je založena na dvou elektrodách, na kterých je indukován proud právě průletem iontů. Detekce proudového obrazu je (v současnosti) jedinou metodou nedestruktivní v MS je detektor proudového obrazu.

Ve FT-ICR jsou ionty zachyceny v magnetickém poli a pohybují se kruhovým pohybem s frekvencí, která závisí na jejich  $m/z$ . Odpovídajícím způsobem jsou detekovány

ionty v orbitrapu a jejich pohyb v harmonických kmitočtech ve směru  $z$  s frekvencí, která je závislá na  $m/z$ , ale nezávislá na energii a prostorovém šíření iontů. Pro detekci musí ionty projít kolem dvojice detekčních desek. Pokaždé, když ion prochází, proudí deskou malý proud. Frekvence každého generovaného proudu odpovídají určité  $m/z$ . Důležitou výhodou nedestruktivní detekce je že umožňuje znovu naměřit již zjištěné ionty.

## 1.8 Fragmentace a tandemová hmotnostní spektrometrie

Spojením dvou a více analyzátorů za sebou se vytvoří tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie, která umožňuje fragmentaci iontu a následně analýzu produktů. Hmotnostní spektra, která vznikají, jsou označována jako MS/MS případně  $MS^2$ . Pokud budou dále fragmentovány fragmentované ionty, data takto získaná se označují jako tzv.  $MS^3$ .

K fragmentaci se obvykle využívá helium nebo dusík v kolizní cele, se kterým se sráží ionty analytu. Ze zdrojových iontů, jsou srážkami s plynem vytvořeny ideálně dva fragmenty o celkové hmotnosti, při jednotkovém náboji, která se rovná hmotnosti zdrojového iontu. Toho jevu lze využít, se znalostí jeho zákonitostí, například pro přibližné až úplné určení struktury organické molekuly nebo primární aminokyselinové struktury peptidu.

Analyzátoři se dnes běžně kombinují mezi sebou např. trojitý kvadrupól, kvadrupól s TOF analyzátořem, TOF/TOF, LIT a Orbitrap, Q a Orbitrap aj.

### 1.8.1 Iontové aktivační metody

Samotná aktivace iontu za účelem jeho fragmentace závisí na MS instrumentaci a analyzované sloučenině a strukturních informacích, které chceme získat.

#### **Rozpad ve zdroji**

Rozpad iontů na fragmenty nastává, když prekurzorové ionty získají dostatečnou vnitřní energii, ať už při vytváření nebo srážkami a rozpadají se dřív, než opustí zdroj. Pravděpodobnost rozpadu ve zdroji závisí silně na typu iontového zdroje a vybraných provozních parametrech. Nicméně, rozpad v zdroji neumožňuje oddělení prekurzorových iontů různými  $m/z$  před disociací a není tedy skutečně tandemovou metodou MS (Ekman 2009)



## **Rozpad za zdrojem**

Hlavním rozdílem v mezi rozpady je to, že vzniklé metastabilní ionty jsou dostatečně stabilní po čas, který stráví ve zdroji. Proto mohou být předrozděleny dle  $m/z$  a mohou být podrobeny tandemovému MS měření. Příkladem, kdy se používá metastabilní fragmentace, je MALDI- rozpad za zdrojem (MALDI-PSD) v kombinaci s analyzátozem TOF nebo TOF-TOF.

## **Kolizně indukovaná disociace**

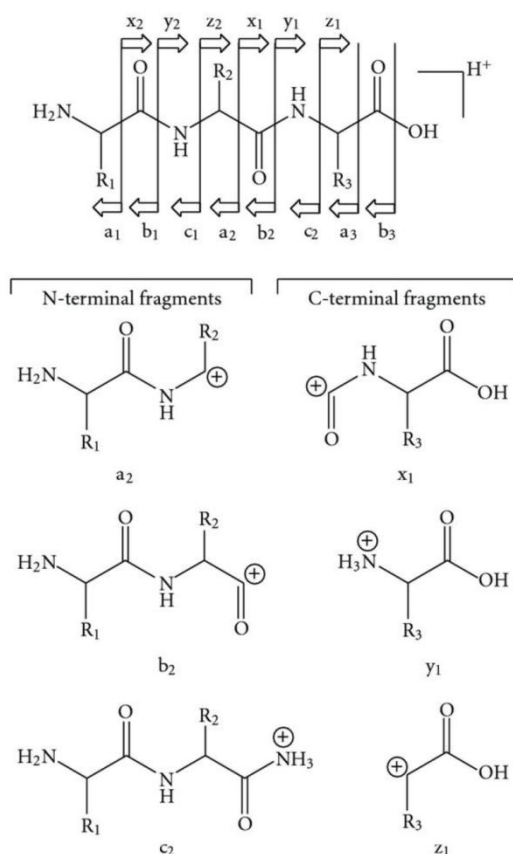
Při CID se prekurzorové ionty srazí s atomy nebo molekulami plynu, jako je dusík, argon nebo helium a fragment. Při srážce je část kinetické energie přeměněna na vibrační/rotační energii původního iontu. Pokud je získaná vnitřní energie dostatečně vysoká, prekurzorové ionty budou fragmentovány dostatečně rychle, aby fragmenty iontů byly pozorovány ve hmotnostním spektrometru. V závislosti na typu analyzátozu hmotnosti se provádí buď vysokoenergetická CID (kiloelektronvoltová kolizní energie) nebo nízkoenergetická CID (100 eV). Nízkoenergetická CID je obvyklá ve kvadrupólech a iontových pastech. CID s vysokou energií je typická pro nástroje sektoru a TOF.

CID s vysokou energií se provádí zrychlením prekurzorových iontů na kiloelektronové energie a následnou kolizí s atomy nebo molekulami plynu v kolizní buňce. Jedna srážka stačí k vyvolání elektronové excitace prekurzorového iontu a následně dochází prakticky ke všem strukturálně možným fragmentacím, které se pravděpodobně vyskytují. Například vysokoenergetické CID často štěpí postranní řetězce peptidů a umožňuje tak rozlišovat mezi aminokyselinami leucin a isoleucin, které mají stejné elementární složení. Při CID dochází ke štěpení nejslabších vazeb (zejména peptidových vazeb). Při CID fragmentaci peptidů vznikají zejména b a y ionty. Modifikující funkční skupiny (posttranslační modifikace) se většinou odštěpují a nelze je detekovat. Vysokoenergetická CID je považována za velmi reprodukovatelnou. To je způsobeno vysokou kinetickou energií akcelerovaného prekurzorového iontu (Eknam 2004).

## **Disociace záchytem elektronu**

Disociace záchytem elektronu (Electron capture dissociation, ECD) nastává, když prekurzorový iont zachycuje nízkoenergetický (1 eV) elektron, vytváří excitovaný radikálový

iont a poté se rychle disociuje. Disociace v ECD je rychlejší než proces redistribuce energie, čímž vzniká náhodnější fragmentace, než jaká byla pozorována při pomalých metodách ohřevu. Pro peptidy ECD často vytváří ionty fragmentů typu c a z štěpením vazby C- a -N. Pro studium PTM je zajímavé, že labilní modifikace, jako je O/N-glykosylace, fosforylace a jiné labilní posttranslační modifikace, jsou zachovány (Zubarev 2004).



**Obrázek 14:** Fragmenty peptidů vznikající při fragmentaci

## 1.9 Spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií

Spojení separační a analytické techniky umožňuje detailnější analýzu vzorků. V Kapitole 1.9.1 je popsána kapalinová chromatografie, díky které bylo možné zvýšit pokrytí analýzy peptidů ze směsi proteinů. Jednotlivé kapky gradientu ACN, který procházel přes kolonu s analytem, byly zachytávány na MALDI desku, a poté analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Tento postup se dá označit za off-line přístup.

Jako online instrumentační spojení je nejčastěji používáno již zmíněné spojení některé formy LC s ESI (NSI) ionizací a některým z analyzátorů. Přístup spočívá v přímém dávkování vzorku po separaci na LC do hmotnostního spektrometru. Toto umožňuje ionizace typu ESI, kde se přebytek mobilní fáze odpařuje. Kolony, jsou plněné vysoce čistým sorbentem. Běžné rozměry kolon jsou od 75  $\mu\text{m}$  do 4.6 mm ID a délky 20 – 250 mm, velikost částic se pohybuje v rozmezí 1.9  $\mu\text{m}$  – 12  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, obchodní brožura).

Pokrokem v této metodice je nano-LC, kde se snížil objem vzorku přiváděného na ESI. (Bylo prokázáno snížení rychlosti průtoku z  $\mu\text{L}/\text{min}$  do  $\text{nL}/\text{min}$  zvýší ionizační účinnost a přenos iontů z iontového zdroje na hmotnost spektrometr (Margeian2007). Při konstantním zpětném tlaku jsou nižší průtoky dosaženy menším průměrem kolony nebo jejím prodloužením. Shen 2013 ve své práci prokázal dramatický nárůst proteomového pokrytí při použití délky 87 cm kolony naplněné C18 s 3  $\mu\text{m}$  póry. Mezi výhody LC-MS spojení obecně patří vysoká míra separace komplexních vzorků, ovšem s tím je spojená časová náročnost analýzy a nemalá finanční náročnost.

Pro spojení LC a MS v proteomice existuje více přístupů, například SCX, SAX, RP-LC, ERLIC nebo HILIC s MS. Při chromatografii se silnou katechovou výměnou (SCX) peptidy jsou zadržovány na koloně na základě interakce mezi kladně nabitými peptidovými skupinami a negativně nabitou kolonovou náplní. Při kyselém pH ( $\text{pH} < 3$ ) dostávají peptidy kladný náboj na N-konci a postranních řetězcích argininu, lysinu a histidinu, zatímco karboxylové skupiny na C-konci se stávají neutrálně nabitými. Fosfátové skupiny zůstávají negativně nabitě při tomto nízkém pH, což vede k tomu, že peptidy obsahující fosfátové skupiny mají nižší afinitu k negativně nabitě náplni a proto, jsou fosfopeptidy eluovány v dříve (Grimsrud 2010).

Chromatografie s vysokou aniontovou výměnou (SAX) je metoda separace peptidů, která je založena na silnějším negativním náboji a tak mohou být zadržovány kyselější peptidy než u SCX. Použití SAX pro obohacení fosfopeptidů by nemělo být vést k vážné ztrátě fosfopeptidů. Další významnou výhodou použití SAX pro analýzu fosfoproteinů je to, že SAX má schopnost frakcionovat fosfopeptidy. V roce 2003 Nühse úspěšně použil SAX chromatografii s elucí solného gradientu jako předfrakční krok před IMAC pro identifikaci fosfoproteinů plazmatické membrány (Nühse 2003). SCX, SAX a RP-LC s gradientem pH

eluze byly kombinovány v Yin-yang multidimenzionální metodě kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MDLC-MS/MS) (Dai 2007).

Isoelektrické zaostřování (IEF) bylo také prezentováno jako metoda fosfopeptidového obohacování, které využívá rozdíl v pI hodnotách kyselějších fosfopeptidů a méně kyselých nefosforylovaných peptidů (Maccarrone 2007, Xu 2007). Nedávná studie zavedla novou metodiku, která zahrnuje separaci proteinů IEF, fosfopeptidové obohacení pomocí IMAC a analýza LC-MS/MS pro mapování fosfoproteomu v lidské buněčné linii prostaty LNCaP (Chen 2010).

HILIC byl častěji používán pro malé polární látky (například léčiva, aminoglykosidová antibiotika, glykany, kyselinu listovou a její metabolity, aj.) než pro frakcionaci peptidů, ale je zde využíván také retenční čas se zvyšuje s rostoucí polaritou peptidu (Alpert 1990), protože zadržování analytu je způsobeno rozdílnou afinitou k vrstvě, která je bohatá na vodu a hydratuje polární stacionární fázi a k poměrně hydrofobnímu elučnímu činidlu. Obvykle jde o 10 až 40% roztok vody v acetonitrilu. Mechanismus je podrobně popsán v Hemström 2006. Gilar 2005 ukázal, že HILIC má vyšší stupeň ortogonality k RP-LC než všechny běžně používané peptidové frakcionační techniky, což je dáno jejich různými principiálními mechanismy.

(Electrostatic Repulsion-hydrophilic Interaction Chromatography, ERLIC) je nový chromatografický přístup, který byl vyvinut zvláště pro obohacení a frakcionaci fosfopeptidů. Kombinuje elektrostatickou přitažlivost s hydrofilními interakcemi k selektivnímu zachycení fosfopeptidů. Při nízkém pH (pH=2) zůstávají fosfátové skupiny negativně nabitě, zatímco karboxylové skupiny se stávají neutrálně nabitě a bazické aminoskupiny kladně nabitě. Fosfátové skupiny jsou elektrostaticky vázány na kolonu; nicméně jejich afinita není dostatečná k překonání elektrostatického odpuzování z pozitivně nabitých aminoskupin. Proto je třeba zvýšit hydrofilní interakce fosfátové skupiny použitím vysokých koncentrací organického rozpouštědla např. 70% acetonitril (Alpert 2008).

Současná studie prováděná na buňkách HeLa ukazuje použití SCX, HILIC a ERLIC jako předseparační metodu pro fosfopeptidy, které byly následovány separací na reverzní fázi s MS/MS analýzou (RP-LC-MS/MS) (Zarei 2011).

### 1.9.1 Mikrogradientová kapalinová chromatografie

Jedním z možných uspořádání RP-LC je tzv. mikrogradientová separace. Tato jednoduchá metoda je vhodná především pro jednoduchou separaci peptidů před MALDI-MS analýzou, kdy poskytuje oproti přímému nanesení na MALDI destičku vyšší pokrytí peptidové sekvence při analýze jednoduchých peptidových směsí pomocí MS, což je v této práci experimentálně ověřeno, než při separaci mobilní fáze o jedné koncentraci. Její princip spočívá v průtoku mobilní fáze, kterou je např. zvyšující se gradient acetonitrilu přes stacionární fázi (silikagel C18). Krátké peptidy, a ty, které obsahují malé množství aminokyselin s hydrofobními postranými řetězci jsou eluovány při nízké koncentraci ACN. Postupně dochází k eluci dalších peptidů, u kterých se zvyšuje hydrofobicita zvyšováním podílu ACN. Obrovský přínos má tato metoda v dostupnosti, kdy není zapotřebí vysokých investic. (Moravcová 2009).

### 1.10 Identifikace peptidů z analyzovaných dat

Pro identifikaci a peptidů a proteinů existuje řada databází a programů pro vyhledávání dat o proteinech, predikci sekvence a porovnávání s naměřenými spektry. Data z tandemové hmotnostní spektrometrie vyhodnocujeme programy, mezi ně řadíme např. MASCOT, SEQUEST, ProteinLynx a další. Existuje také mnoho databází, které zahrnují celou škálu proteinů (UniProt, SwissProt atd.) nebo se přímo specializují na fosfoproteiny (Phosida, P3DB, Peptide Atlas, PhosphoPep a další). Dalším užitečným pomocníkem při analýzách proteinů je pracovní sada nástrojů ProteinProspector, která obsahuje nástroje pro vyhledávání v databázích a porovnává s nimi naměřená spektra, *in-silico* štěpení proteinů, porovnávání MS/MS spekter a další. Jedním z nástrojů je i MS-fit, který slouží k identifikaci peptidů technikou peptidového mapování, tzv. "peptide mass fingerprinting".

## 2 Experimentální část

---

### 2.1 Přístroje a pomůcky

- pH metr model BOECO BT-600 (BOECO, Hamburg, Německo)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, USA)
- stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů ChemiDoc XRS+ System s Image Lab softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- zařízení na výrobu ultračisté vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- mikrozkuhavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pipetovací špičky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pipetovací špičky GEloder tips (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- termoshaker TS-100 (Biosan, Riga, Litva)
- centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- vakuový koncentrátorPlus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- mikrostříkačka Hamilton (25  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- insulinová stříkačka bez jehly, objem 100  $\mu$ l, (BECTON DICKINSON (BD), New York, NJ, USA)
- kolona pro mikrogradientovou separaci směsi ACAS a BSA:
- teflonová hadička (Labicom, vnitřní průměr 0,25 mm a vnější 1/16''), skleněná kapilára (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA) o vnitřním průměru 0,05 mm s polyimidovou povrchovou úpravou, stacionární fáze C 18 (částice o velikosti 2,7 $\mu$ m)
- kolona pro mikrogradientovou separaci buněčného lyzátu:

- teflonová hadička (Labicom, vnitřní průměr 0,25 mm a vnější 1/16''), skleněný filtr 9.0 (Whatman, England), stacionární fáze Kinetex evo C18 2,6 μm, ODG-4725 (Phenomex, CA, USA)
- vzorková MALDI deska 384-wellplate, (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- hmotnostní sepektometr MALDI LTQ-Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- ultrazvuková lázeň Sonorex digitec (Bandelin, Berlín, Německo)

## 2.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza pro analýzu proteinů a peptidů

### Použité chemikálie

- Chymotrypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bovinní serový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- lidský imunoglobulin G (huIgG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-methylen-bis-akrylamid (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin (TEMED, C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- persíran amonný ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Standards – Unstained, 10 – 250kDa, (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- tris(hydroxymethyl) - aminomethan (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bromfenolová modř (C<sub>19</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>Br<sub>4</sub>S) (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- vzorkový pufr (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- glycin (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Barvicí roztok Coomaseie Blue(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

### 2.2.1 Roztoky

- roztok A: 30% směs akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu
- roztok B: 1,5M Tris-HCl pufr pH 8,8 (upraveno pH pomocí 6M HCl)
- roztok C: 1,0M Tris-HCl pufr pH 6,8 (upraveno pH pomocí 6M HCl)
- roztok D: 10% roztok SDS
- roztok E: 10% roztok persíranu amonného (byl připraven vždy čerstvý)
- elektrodový pufr pH 8,3 – 8,6: 0,025M Tris, 0,192 M glycin a 0,1 % SDS
- fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol, destilovaná voda
- 10% roztok glutaraldehydu: glutaraldehyda destilovaná voda
- roztok amoniakálního stříbra: 20% dusičnan stříbrný, destilovaná voda, 4,5% hydroxid amonný, 9M hydroxidu sodného (239  $\mu$ l/100 ml roztoku)
- vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citrónová, 0,04% formaldehyd, destilovaná voda
- ustalovací roztok: 5% kyselina octová, destilovaná voda

### 2.2.2 Vzorky:

- IgG
- BSA
- Chymotrypsin
- Směs výše uvedených vzorků

### 2.2.3 Postup

Byl připraven 12% dělicí gel o složení [ml]: *destilovaná voda* 1,68; *roztok A* 2,0; *roztok B* 1,25; *roztok D* 0,05; *roztok E* 0,05; *TEMED* 0,002.

Do zkumavky byla napipetována destilovaná voda, roztoky A, B, D a TEMED a směs byla důkladně promíchána. Poté byl přidán roztok E, směs byla promíchána, napipetována po rysku do prostoru mezi dvě skla a převrstvena destilovanou vodou. Během 20 - 30 minut gel zpolymeroval a mezi gelem a vrstvou vody se vytvořilo ostré rozhraní. Destilovaná voda byla odsáta proužkem filtračního papíru. Následovala příprava zaostřovacího gelu o složení [ml]: *destilovaná voda* 1,4; *roztok A* 0,33; *roztok C* 0,25; *roztok D* 0,02; *roztok E* 0,02.



Do zkumavky byla napipetována destilovaná voda, roztoky A, C, D a TEMED a směs byla důkladně promíchána. Poté byl přidán roztok E, směs byla promíchána a napipetována na zpolymerovaný dělicí gel. Nakonec byla mezi skla vložena šablona s deseti jamkami. Gel zpolymeroval během 15-ti minut. Po skončené polymeraci byla odstraněna šablona a vytvořené jamky pro vzorky byly propláchnuty elektrodovým pufrem, který byl ponechán v jamkách.

Vzorky byly připraveny smícháním vzorku s pufrem pro vzorky v poměru 1:1 (např. 15  $\mu$ l + 15  $\mu$ l). Směs byla promíchána a povařena po dobu 3 minut při 100°C. Molekulový marker byl použit bez povaření.

Skla s připravenými gely byla vložena do elektroforetické vany, byla vyjmuta šablona pro vytvoření jamek a jamky byly propláchnuty elektrodovým pufrem pro odstranění nezpolymerovaného gelu. Elektroforetická vana byla naplněna elektrodovým pufrem. Vzorky byly dávkovány pomocí Hamiltonovy stříkačky v objemu 15  $\mu$ l. Standard molekulových hmotností byl dávkován v objemu 7  $\mu$ l pro barvení pomocí Coomassie brilliant blue, resp. 3  $\mu$ l pro barvení roztokem amoniakálního stříbra. Elektroforetická separace probíhala za podínek: konstantní napětí 180 V a proud 30 mA na 1 gel. Dělení bylo ukončeno po doputování bromfenolové modři na úroveň dolního okraje skel (cca 60 minut). Následovalo barvení Coomassie Blue.

Coomassie Blue barvení:

Promytí gelu ultračistou vodou, pak 30 minut ponecháno ve fixačním roztoku (případně v lednici přes noc). Poté 30 minut podrobena rehydrataci v ultračisté vodě. Následuje barvení (30 - 60 minut). Nakonec je gel podroben odstranění nenavázaného barviva promýváním v ultračisté vodě.

Barvení stříbrem:

Po vlastním elektroforetickém dělení byl gel propláchnut vodou a fixován přes noc při 4°C ve fixačním roztoku. Rehydratace gelu v destilované vodě trvá 30 minut, následující inkubace 30 minut v 10% roztoku glutaraldehydu. Poté byl gel promyt destilovanou vodou - 6 x 10 minut. Dále byl inkubován 15 minut v roztoku amoniakálního stříbra. Následuje promytí v destilované vodě. Nakonec je gel ponořen do vyvolávacího roztoku a poté do ustalovacího.

## 2.3 Štěpení bovinního sérového albuminu solubilním trypsinem

### Použité materiály a chemikálie

- 1,1,1-trifluoroctová kyselina,  $C_2O_2HF_3$  (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bovinní serový albumin (BSA), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dithiotreitol,  $C_4H_{10}O_2S_2$  (DTT), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- iodoacetamid  $C_2H_4INO$  (IAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- trypsin (Sequencing Grade, Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- hydrogenuhličitan amonný,  $NH_4HCO_3$ , (ABC) (Lachema, Neratovice, Česká Republika)

### 2.3.1 Roztoky

- 0,4 M IAA
- 0,2 M DTT
- 0,05 M ABC
- roztok trypsinu rozpuštěný ve výrobcem dodaném roztoku
- 20% TFA

### 2.3.2 Postup

1 mg proteinu byl rozpuštěn v 240  $\mu$ l 50 mM ABC. Bylo přidáno 50  $\mu$ l 0,2 M DTT a 30 minut při teplotě 60°C byl roztok inkubován. Po chlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 50  $\mu$ l IAA a směs byla inkubována ve tmě 30 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno opět 50  $\mu$ l DTT a následovala inkubace při laboratorní teplotě 15 minut. Poté byl ke směsi přidán roztok trypsinu (E:S 1:50 m/m), který byl předtím 15 minut zahříván při 30°C. Celá směs byla inkubována 18 hodin při 37°C. Po inkubaci bylo přidáno 10  $\mu$ l 20% TFA k zastavení reakce. Vzorek byl odsolen, a připraven pro měření na MS, viz kapitola 2.6.

## 2.4 Štěpení alfa kaseinu solubilním trypsinem

### Použité materiály a chemikálie

- 1,1,1-trifluoroctová kyselina,  $C_2O_2HF_3$  (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- $\alpha$ -kasein (ACAS), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dithiotreitol,  $C_4H_{10}O_2S_2$  (DTT), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- iodoacetamid  $C_2H_4INO$  (IAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- trypsin (Sequencing Grade, Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- hydrogenuhličitan amonný,  $NH_4HCO_3$ , (ABC) (Lachema, Neratovice, Česká Republika)

### 2.4.1 Roztoky

- 0,4 M IAA
- 0,2 M DTT
- 0,05 M ABC
- Trypsin rozpuštěný ve spoludodaném skladovacím roztoku
- 20% TFA

### 2.4.2 Postup

0,5 mg proteinu bylo rozpuštěno v 120  $\mu$ l 0,05 M ABC. Bylo přidáno 25  $\mu$ l 0,2 M DTT a 30 minut při teplotě 60°C byl roztok inkubován. Po chlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 25  $\mu$ l IAA a směs byla inkubována ve tmě 30 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno opět 25  $\mu$ l DTT a následovala inkubace při laboratorní teplotě 15 minut. K roztoku byl přidán trypsin (E:S 1:50 w/w), který byl předtím 15 minut zahříván při 30°C. Celá směs byla inkubována 18 hodin při 37°C. Po inkubaci bylo přidáno 10  $\mu$ l 20% TFA k zastavení reakce. Vzorek byl odsolen viz kapitola 2.6.

## 2.5 Štěpení vzorku z polyakrylamidového gelu

### Použité materiály a chemikálie

- 1,1,1-trifluoroctová kyselina,  $C_2O_2HF_3$  (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- $\alpha$ -kasein (ACAS), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- acetonitril,  $C_2H_3N$  (ACN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bovinní serový albumin (BSA), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dithiotreitol,  $C_4H_{10}O_2S_2$  (DTT), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- iodoacetamid  $C_2H_4INO$  (IAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- IgG Human, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- trypsin (Sequencing Grade, Promega Corporation, Madison, USA)
- hydrogenuhličitan amonný,  $NH_4HCO_3$ , (ABC) (Lachema, Neratovice, Česká Republika)

### 2.5.1 Roztoky

- 0,55 M IAA
- 0,1 M DTT
- 0,05 M ABC
- trypsin rozpuštěný ve spoludodaném skladovacím roztoku
- 5% TFA
- 20% TFA
- 100% ACN
- odbarvovací roztok: 50% ACN/50 mM ABC
- extrakční roztok: 60% ACN/2% kys. mravenčí

### 2.5.2 Postup

Z gelu byl vyříznut kýžený proužek gelu s proteinem, který byl přenesen do mikrozkušavky a špičkou rozdrcen na malé kousky. K takto připravenému gelu bylo přidáno 100  $\mu$ l odbarvovacího roztoku směs byla inkubována 30 minut, dokud nedošlo k odbarvení

gelu, případně byl postup opakován do úplného odbarvení gelu. Poté bylo přidáno 400  $\mu$ l 100% ACN a následovala inkubace, dokud gel neměl bílou barvu. Poté byl zbylý roztok odtážen a ke vzorku bylo přidáno 30 - 50  $\mu$ l 10 mM DTT a následovala inkubace 30 min při 60 °C. Dále bylo přidáno 400  $\mu$ l 100% ACN a inkubováno opět do zblednutí gelu. Poté byl zbylý roztok odtážen. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 30 - 50  $\mu$ l 55mM IAA a inkubováno 30 minut v temnu při laboratorní teplotě. Poté přidáno 400  $\mu$ l 100% ACN a opět inkubováno do zblednutí gelu s následným odstraněním zbylého roztoku.

K připravenému gelu přidáno 20 - 50  $\mu$ l roztoku trypsinu (podle množství gelu). Gel byl inkubován při 4°C po dobu 30 minut, aby se trypsin nasál do gelu. V případě, že po této době není gel ponořený v roztoku, přidá se další roztok trypsinu a následuje inkubace po dobu 45 min při 4°C. Pokud je ponořený, pokračuje inkubace dalších 20 min a poté je přidáno 10  $\mu$ l 100 mM ABC a vzorek je inkubován přes noc při 37°C. Po naštěpení byl supernatant odebrán a okyselen 5% TFA a připraven k analýze pomocí MS, viz kapitola 2.6. Ke zbylému gelu bylo přidáno 30 - 60  $\mu$ l (podle množství gelu) extrakčního roztoku a následuje inkubace po dobu 15 min při 37°C. Takto extrahované peptidy z gelu jsou odeberány do nové zkumavky, vysušeny a jsou připraveny k MS analýze, jak je uvedeno v kapitole

## **2.6 Odsolování vzorku na reverzní fázi a příprava vzorku pro MS analýzu**

### Použité materiály a chemikálie

- POROS Oligo R3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- 1,1,1-trifluoroctová kyselina, C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>HF<sub>3</sub> (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2,5-dihydroxybenoová kyselina, C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (DHB) (LaserBio Labs SARL, Valbonne, Francie)
- $\alpha$ -kasein (ACAS), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- acetonitril, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N (ACN) (Fluka; Honeywell Internacional, Morrisontown, New Jersey)
- bovinní serový albumin (BSA), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- hydrogencitrát dvojamonný ( $C_6H_8O_7N_2$ , DAHC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyano-4-hydroxyokořicová kyselina,  $C_{10}H_7O_3N$  (CHCA) (LaserBio Labs SARL, Valbonne, Francie)
- kyselina ortofosforečná,  $H_3PO_4$  (Merck KGaA, Darmstadt, Německo))

### 2.6.1 Roztoky

- 0,1% TFA
- 80% ACN/0,1% TFA
- resuspendovaná reverzní fáze POROS Oligo R3 v 80% ACN/0,1% TFA
- DHB (10mg/ml DHB rozpuštěné v 50% ACN/0,1% TFA s přidavkem 1%  $H_3PO_4$ )
- CHCA (5mg/ml CHCA rozpuštěné v 60% ACN/0,1% TFA s přidavkem 2 mM DAHC)

### 2.6.2 Postup

Stacionární fáze POROS Oligo R3 byla nadávkována do GeLoader špičky, na které byla stlačena poslední cca 2-3 mm tak, aby nedocházelo k uvolňování fáze. Kolona měří kolem 1,5 cm. Jako zdroj tlaku byla použita insulinová stříkačka. Kolona byla promyta 10  $\mu$ l 80% ACN/0,1% TFA a 15  $\mu$ l 0,1% TFA tak, aby 5  $\mu$ l zůstalo nad fází. Vzorek byl nanášen po 20 - 30  $\mu$ l, přičemž není fáze vysušována vzduchem. Fáze s navázaným vzorkem byla promyta 1x – 2x 15  $\mu$ l 0,1 % TFA a vysušena vzduchem skrz fázi. Eluce byla provedena 4  $\mu$ l CHCA matrice pro vzorky neobsahující fosforylované peptidy nebo DHB matricí pro fosforylované peptidy. První kapka eluce byla nanášena přímo na MALDI desku na jeden terčík.

## 2.7 Mikrogradientová separace na reverzní fázi

### Použité materiály a chemikálie

- Ascentis Express Peptide ES-C18, vel. částic 2,7 $\mu$ m (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- 1,1,1-trifluoroctová kyselina,  $C_2O_2HF_3$  (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2,5-dihydroxybenoová kyselina,  $C_7H_6O_4$  (DHB) (LaserBioLab, San Francisco, CA, USA)
- $\alpha$ -kasein (ACAS), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- acetonitril,  $C_2H_3N$  (ACN) (Fluka; Honeywell Internacional, Morrisontown, New Jersey)
- bovinní serový albumin (BSA), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina ortofosforečná,  $H_3PO_4$  (Fluka; Honeywell Internacional, Morrisontown, New Jersey)

### 2.7.1 Roztoky

- 0,1% TFA
- 80% ACN/0,1% TFA
- gradientové roztoky: (2%, 8%, 16%, 24%, 30%, 40% ACN)/ 0,1 TFA
- DHB (10 mg/ml DHB rozpuštěné v 50% ACN/0,1% TFA s přidavkem 1%  $H_3PO_4$ )

### 2.7.2 Postup

Kolona 1 byla promyta 20  $\mu$ l čistého ACN, 20  $\mu$ l 80% ACN/0,1% TFA a 20  $\mu$ l 2% gradientového roztoku. Vzorek byl nasán do mikrostříkačky Hamilton (25  $\mu$ l) přičemž bylo nejříve nataženo 5  $\mu$ l 2% gradientového roztoku. Po nanesení vzorku na kolonu byla stříkačka promyta 80% ACN/0,1% TFA a poté 40% gradientovým roztokem. Gradient ACN byl natažen do stříkačky postupně v pořadí 40%, 30%, 24%, 16%, 9%, 2% vždy v objemu 4  $\mu$ l. První 4  $\mu$ l nebyly zachytávány a 20  $\mu$ l roztoků gradientu bylo nanášeno na 24 terčů MALDI desky po zhruba 0,7  $\mu$ l, za sledování zůstatku objemu gradientového roztoku v Hamiltonově mikrostříkačce. Každý terč byl překryt 0,5  $\mu$ l DHB matrice. Po použití byla kolona promyta 20  $\mu$ l 80% ACN/0,1% TFA a 20  $\mu$ l čistého ACN.

## 2.8 Obohacování modelové směsi peptidů (BSA a ACAS) afinitní chromatografií na TiO<sub>2</sub>

### Použité materiály a chemikálie

- nanočástice „core-shell“ (NPs), šarže Fe11, 100 nm; jádro Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a povrch TiO<sub>2</sub> (laboratorně připraveno na FCHT UPCE, Pardubice, Česká Republika)
- Titansphere (TiS), 10 μm, TiO<sub>2</sub>, (GLSciences, Japan)
- nanotrubičky TiO<sub>2</sub> (TNT), TiO<sub>2</sub> nanotrubičky pokryté Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> částicemi (8 nm); průměr 230 nm (laboratorně připraveno na FCHT UPCE, Pardubice, Česká Republika)
- resuspendovaná reverzní fáze POROS Oligo R3 v 80% ACN/0,1% TFA
- 1,1,1-trifluoroctová kyselina, C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>HF<sub>3</sub> (TFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- α-kasein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- acetonitril, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N (ACN) (Fluka; Honeywell Internacional, Morrisontown, New Jersey)
- dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (Penta, Praha, Czech Republic)
- hydroxid amonný, NH<sub>4</sub>OH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina ortofosforečná, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka; Honeywell Internacional, Morrisontown, New Jersey)
- kyselina mléčná, C<sub>3</sub>O<sub>3</sub>H<sub>6</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 2.8.1 Roztoky

- 20% TFA
- 80% ACN/0,1% TFA
- vazebný pufr (Loading buffer, LB): 80% ACN, 5% TFA, 1M kys. mléčná,
- promývací pufr 1 (Washing buffer 1, WB 1): 80% ACN/1% TFA,
- promývací pufr 2 (Washing buffer 2, WB 2): 20% ACN/0,5% TFA,
- eluční pufr 1 (Eluting buffer1, EB 1): 1% NH<sub>4</sub>OH,



- eluční pufr 2, (Eluting buffer 2, EB 2): 3% NH<sub>4</sub>OH, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 % ACN
- DHB (10mg/ml DHB rozpuštěné v 50% ACN/0,1% TFAs přidavkem 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

### 2.8.2 Vzorky

- Směs BSA a ACAS, které byly připraveny podle postupu, které je uveden v kapitole 0 resp. 2.4.

### 2.8.3 Postup

Veškeré třepání a inkubace v tomto postupu byly prováděny prováděno na Termoshaker TS-100 rychlostí 1100-1300 ot/min, tak aby byly částice udržovány ve vznosu.

Z důvodu odpadávání nečistot z nosiče, které by mohly rušit stanovení, případně zanášet kolonu se uvádí částice do cyklu:

1 mg NPs byl resuspendován ve 400 µl 80% ACN/0,1% TFA, následně 2 x promyt 400 µl 80% ACN/0,1% TFA a inkubován ve 400 µl vazebného pufru 15 min. při laboratorní teplotě. Poté byl nosič 2x promyt 400 µl 80% ACN/0,1% TFA, inkubován 15 min. ve 400 µl elučního pufru 1 a nakonec promyt 2 x 400 µl 80% ACN/0,1% TFA.

#### **Postup obohacení na nosičích (TNT, NP a TiS) a přípravy vzorku pro analýzu na MS:**

Vzorek směsi trypticky štěpeného BSA a ACAS ve zvoleném poměru a látkovém množství obou složek byl rozpuštěn ve vazebném pufru (200 µl na 1 mg nosiče). 1 mg nosič byl promyt v 500 µl 80% ACN/0,1% TFA, resuspendován a následně centrifugován (platí pro TiS, 60s, 3000g) a separován pomocí magnetického separátoru (platí pro TNT a NP). Následovalo promytí 1x 400 µl promývacím pufr 1 a 1x 400 µl vazebného pufru. Poté bylo přidáno 200 µl vzorku ke každému nosiči a následovala 30 min inkubace třepáním v temnu při laboratorní teplotě. Byla odstraněna kapalná fáze, nosič byl promyt 2x 400 µl LB, 2x 400 µl promývacího pufru 1 a 1x 400 µl promývacího pufru 2.

Po přidání 100 µl elučního pufru 1 následovala inkubace 15 min, byla odebrána kapalná fáze a přidáno 10 µl 20% TFA. Při snížení množství nosiče byl ekvivalentně zmenšen

i objem elučního pufru 1. Poté bylo přidáno 100  $\mu$ l elučního pufru 2, následovala inubace 15 min, odebrání kapalné fáze a okyselení 35  $\mu$ l 20% TFA (při snížení množství nosiče byl opět ekvivalentně zmenšen i objem elučního pufru 2).

Získané kapalné fáze byly zakoncentrovány ve vakuovém koncentrátoru. 2. eluce byla vysušena do sucha, a proto byla následně rozpuštěná v 20  $\mu$ l 0,1% TFA. Získané vzorky byly připraveny k analýze, jak je popsáno v Kapitole 2.6. Nakonec byly vzorky měřeny na MALDI LTQ-Obitrap XL v pozitivním módu.

## 2.9 Optimalizace složení elučního roztoku 2

### Použité materiály a chemikálie

- acetonitril,  $C_2H_3N$  (ACN) (Fluka; Honeywell Internacional, Morrisontown, New Jersey)
- dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného,  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$  (Penta, Praha, Czech Republic)
- hydroxid amonný,  $NH_4OH$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 2.9.1 Postup

Byly vytvořeny dvě řady roztoků o složení 3%  $NH_4OH$  a 40% ACN se stoupající koncentrací  $Na_2 HPO_4$  od 40 mM do 100 mM a druhá řada, která obsahovala 50 % ACN. Roztoky byly podrobeny rozpouštění třepáním v ruce a poté v ultrazvukové lázni a byla sledována rozpustnost  $Na_2HPO_4$ .

## 2.10 Změna složení elučního roztoku 2

### Použité materiály a chemikálie

- acetonitril,  $C_2H_3N$  (ACN) (Fluka; Honeywell Internacional, Morrisontown, New Jersey)
- dekahydrát hydrogenfosforečnanu amonného  $(NH_4)_2HPO_4 \cdot 10 H_2O$  (Penta, Praha, Czech Republic)
- hydroxid amonný,  $NH_4OH$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### **2.10.1 Postup**

Postup byl stejný jako v Kapitole 2.9.1

## **2.11 Analýza *in-vitro* fosforylovaného rekombinantního Tau proteinu**

### Použité materiály a chemikálie

- Totožné jako v Kapitolách 2.7 a 2.88.

### **2.11.1 Vzorky**

- Vzorek 1: rekombinantní Tau protein fosforylovaný kinázam: GSK3  $\beta$  a EKR 2
- Vzorek 2: rekombinantní Tau protein

### **2.11.2 Roztoky**

- Totožené jako v kapitolách 2.7 a 2.88.

### **2.11.3 Postup**

Postup byl totžný jako v Kapitole 2.88. Obohacování probíhalou pouze na Titansphere mikročasticích. Poté byly vzorky elucí podrobeny mikrogradientové separaci, podle Kapitoly 2.7.

## **2.12 Příprava buněčného lyzátu**

Tento postup nebyl prováděn v rámci této práce. Níže je pouze popsána příprava analyzovaného vzorku, tak jak byl připraven na Katedře molekulární patologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity Obrany v Hradci Králové.

Komplexní peptidová směs byla připravena následujícím způsobem. Jurkat buňky byly kultivovány v RPMI-1640 médiu s 10% (v/v) přidavkem fetálního bovinního séra (Sigma Aldrich) při 37°C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Buňky byly pasážovány každé 2 nebo 3 dny. Sklizené buňky byly nejdříve ošetřeny 1mM pervanátem po dobu 10 min při 37°C ( $3.5 \times 10^7$  buněk/ml), které byly resuspendovány v ledově studeném hypotonickém lyzačním pufru

(10 mM Tris at pH 7.5 and 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) a lyzovány pomocí homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema. Proteinový koncentrát v lyzátu byl měřen za použití Micro BCA kitu (Thermo Pierce). Proteiny byly redukovány přidavkem DTT (konečná koncentrace 10mM) po 1 hodinu při 37°C, kdy následovala alkylace IAA (konečná koncentrace 20mM) po třicet minut při laboratorní teplotě ve tmě. Neutralizace přebytečného IAA byla provedena přidáním DTT do konečné koncentrace 20 mM a reakční směs byla ponechána 15 minut při laboratorní teplotě. Proteiny byly štěpení solubilním trypsinem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v poměru 1:50 (m/m) při 37°C přes noc. Peptidy byly odsoleny na Discovery DSC-18 SPE kazetě (500 mg/3 ml, Sigma Aldrich), eluovány 80% ACN/0.1% TFA a usušeny ve vákuové odparce.

## **2.13 Obohacení a analýza fosfopeptidů z komplexního vzorku**

### Použité materiály a chemikálie

- Pro obohacení byly použity stejné chemikálie jako v Kapitole 2.8. Nebyly použity NPs. Při chromatografickém zpracování vzorků byla narozdíl od Kapitoly 2.7 použita náplň kolony: Kinetex EVO C18 2,6 μm, ODG-4725 (Phenomex, CA, USA)

### **2.13.1 Roztoky**

- Použity stejné roztoky jako v Kapitole 2.7 a 2.8.

### **2.13.2 Vzorky**

- 2 x 250 μg buněčného lyzátu, jejichž příprava je popsána v Kapitole 2.122.

### **2.13.3 Postup**

Z důvodů odstranění nečistot, které zanáší kapalinový chromatograf byl nosič TiS i TNT podroben zavedení do cyklu

Resuspendované nosiče v 80% ACN/0,1% TFA byly promyty 1 x 500 μl 80% ACN/0,1% TFA, 500 μl vyzebným pufrem a 500 μl 80% ACN/0,1% TFA. Dále byly 5 minut

inkubovány v elučním pufru 2 a v elučním pufru 1 byly inkubovány 2 minuty při laboratorní teplotě, poté 2x promyt 500  $\mu$ l 80% ACN/0,1% TFA.

500  $\mu$ g buněčného lyzátu bylo obohaceno na TiS (1 mg) a TNT (3 mg), způsobem popsáným v Kapitole 2.8. Rozdíl byl v použití 400  $\mu$ l, namísto 200  $\mu$ l vzorku, který obsahoval 250  $\mu$ g buněčného lyzátu na jeden nosič. Získané eluční frakce byly podrobeny odsolení na mikrokolonce s gradientovou elucí podobně jako bylo popsáno v Kapitole 2.7. Odchytky v postupu jsou: použití kolony pro separaci buněčného lyzátu namísto kolony pro separaci směsi BSA/ACAS a promytí kolony po nanesení vzorku 10  $\mu$ l 2% gradientovým roztokem. Další změnou je jímání 20  $\mu$ l vzorku do mikrozkušavek namísto rozdělení na 24 terčíků na MALDI desku. Jímání probíhalo tak, že první 4  $\mu$ l eluátu z kolony nebyly zachytávány a zbylých 20  $\mu$ l bylo zachyceno do připravené mikrozkušavky. Obsah zkumavek byl poté podroben odpaření ve vakuovém koncentrátoru do sucha a zamražen do analýzy na LC-MS.

### **Analýza vzorku lyzátu na LC-MS**

Peptidy z komplexní směsi byly separovány pomocí UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC system (Dionex), který obsahoval záchytnou kolonu (75  $\mu$ m  $\times$  20 mm) naplněnou částicemi 3  $\mu$ m Acclaim PepMap100 C18, a také separační kolonu (75  $\mu$ m  $\times$  150 mm) naplněnou 2  $\mu$ m Acclaim PepMap RSLC C18 částicemi. Vlastní separace probíhala s dvojitým lineárním gradientem acetonitrilu (3–44%) po dobu 89 min a takto separované analyty byly analyzovány pomocí Q Exactive hmotnostního spektrometru (Thermo Fisher Scientific) pracujícího v pozitivním módu s "full MS" skenem (350–1650 m/z) při rozlišení 70 000 FWHM. Fragmentováno bylo top 12 prekurzorů (MS/MS), které byly poté analyzovány s rozlišením 17 500 FWHM. Proteome Discoverer software (Thermo Scientific, v. 1.4) využívající Sequest HT jako vyhledávací nástroj byl použit pro vyhodnocení MS/MS spekter. Parametry nastavení pro Sequest HT databázový vyhledávací nástroj: proteinová databáze – UniProt, taxonomie Homo sapiens (2017/11/01), enzym – trypsin, vynechaných štěpení – 2, tolerance prekurzorového iontu – 10 ppm, tolerance fragmentového iontu – 20 mmu, statická modifikace – carbamidomethyl (C), dynamické modifikace – oxidace (M), fosforylace (STY), N-konec glutamát na pyro-glutámovou kyselinu.

## 3 Výsledky a diskuze

---

### 3.1 MS analýza peptidů bovinního sérového albuminu a $\alpha$ -kaseinu naštěpených solubilním trypsinem

Analýza vzorků byla provedena na hmotnostním spektrometru LTQ Orbitrap XL s MALDI ionizací. (Analýza vzorků uvedených v Kapitole 2.13.2 byla provedena také na LC-ESI-Orbitrap na pracovišti Ústavu molekulární patologie fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové). Měření probíhalo v pozitivním módu při rozlišení 60000 FWHM pro rozsah  $m/z$  700 - 4000. Získaná data byla následně exportována pomocí softwaru ThermoXcalibur (v2.1.0; ThermoFisherScientific Inc., Waltham, MA, USA) a píky extrahovány v softwaru mMass (v5.5.0, volně dostupný). Takto získána data porovnána metodou peptidového mapování (peptide mass fingerprinting, PMF) s využitím nástroje MS-Fit (dostupný na webu z: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>) proti databázi Swiss-Prot (2017/11/01) pro organismus *Bos Taurus*.

Takto získána data porovnána metodou peptidového mapování (peptide mass fingerprinting, PMF) s využitím nástroje MS-Fit (dostupný na webu z: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>) proti databázi Swiss-Prot (2017/11/01) pro organismus *Bos taurus*.

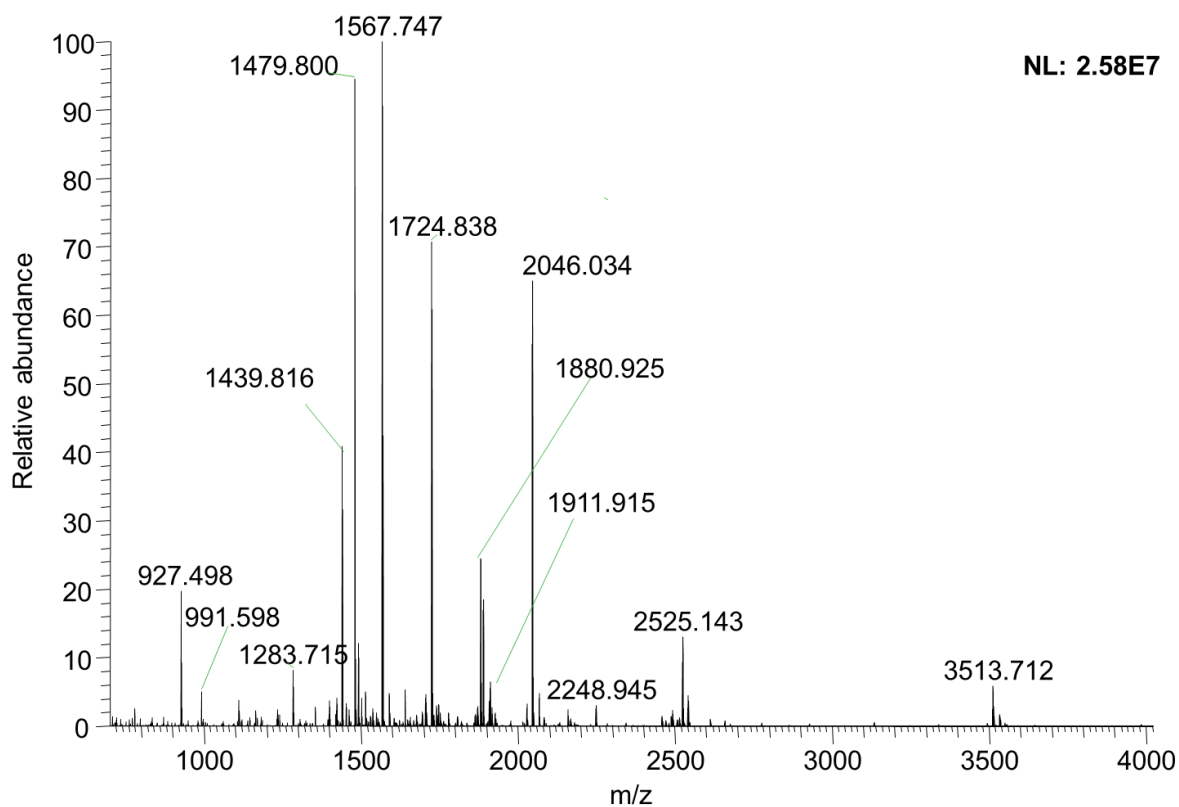
MS-Fit nabízí širokou škálu kritérií, podle nichž lze zúžit pole vyhledávání nebo se zaměřit na konkrétní soubor analytů. Mezi tato nastavení patří např. nastavení organismu produkujícího hledané proteiny, celou řadu zdrojových databází proteinů, lze využít i přímé vypsání kódů proteinu, se kterými jsou experimentální data porovnávána a celá řada variabilních a fixní modifikací včetně fosforylace.

Mezi zadaná kritéria patří použitím trypsinu jako proteolytického enzymu se dvěma možnými vynechaními štěpením, tolerance hmotnostní peptidu byla nastavena na  $\pm 10$  ppm. Jako povolená fixní modifikace byla nastavena karbamidomethylace cysteinu. Jako variabilní,

acetylace na N-konci proteinu, kyselina glutamová na pyro-glutamovou, oxidace methioninu a hlavně fosforylaci na aminokyselinách threonin, serin a tyrosin.

Pro potvrzení přítomnosti fosforylace na peptidu se dá postupovat mimo jiné tak, že v nástroji Xcalibur vyhledáváme ztráty 79,96 a 97,97, které značí odštěpení fosfátu z molekuly peptidu. Ztráta 80 se nazývá enzymatická ztráta, kdy je z analytu odštěpena kys. metafosforečná,  $\text{HPO}_3$  působením štěpícího enzymu. Další ztráta vzniká na podkladě dodané energie při ionizaci nebo fragmentaci. Na záznamu z MS analýzy ji můžeme obvykle vidět jako ztrátu o  $m/z$  97,97, která zachycuje odštěpení molekuly kyseliny ortofosforečné,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Takovéto ztráty ovšem můžeme logicky pozorovat pouze u jedenkrát nabitých molekulových iontů. U vícenásobně nabitých molekulových iontů lze logicky pozorovat ztráty zkrát menší (Larsen 2008).

## MS analýza BSA:

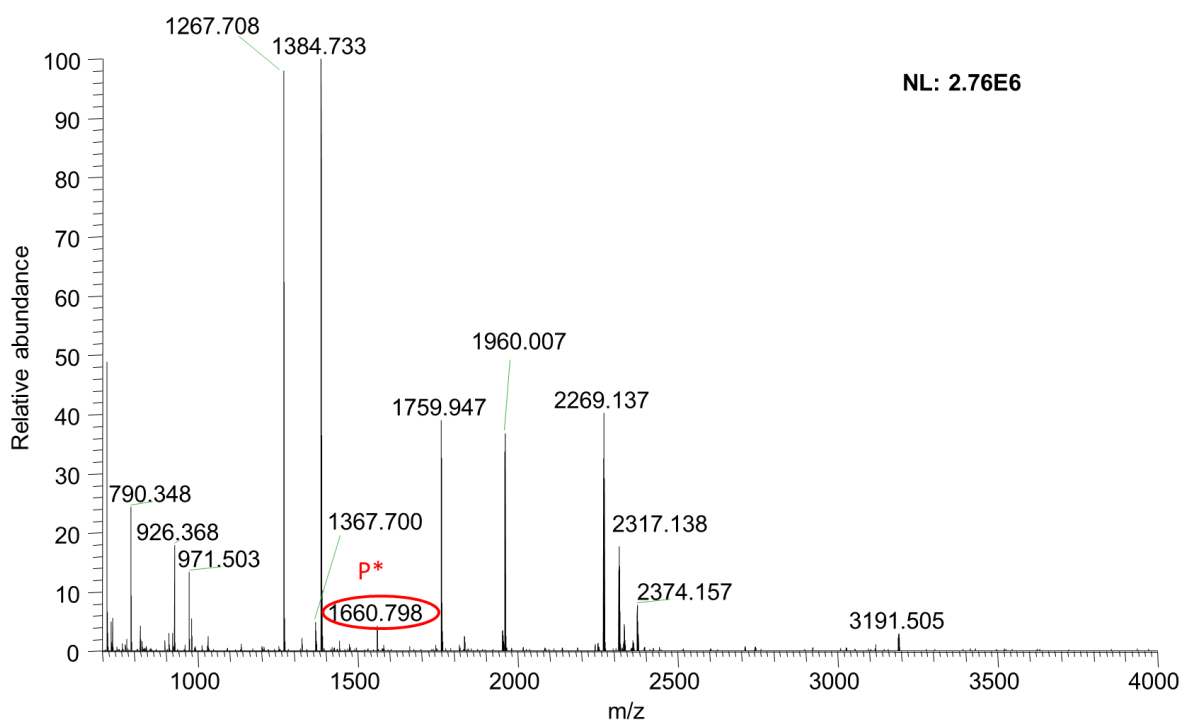


**Obrázek 15:** Spektrum trypticky naštěpeného BSA; 700-4000; matrice CHCA s DAHC

Tak jak bylo uvedeno na začátku této Kapitoly, tak i vzorky standardních proteinů byly takto vyhodnoceny. V této části bylo především důležité zjistit, zda standardy naštěpené trypsinem byly správně připraveny a zda je bude možné požívat v dalších analýzách. Pokrytí peptidové sekvence 51,6 % vztahující se k Obrázku 15 značí, že proteinový standard BSA byl připraven správně a bude možné jej využít v dalších experimentech.



## MS analýza ACAS:

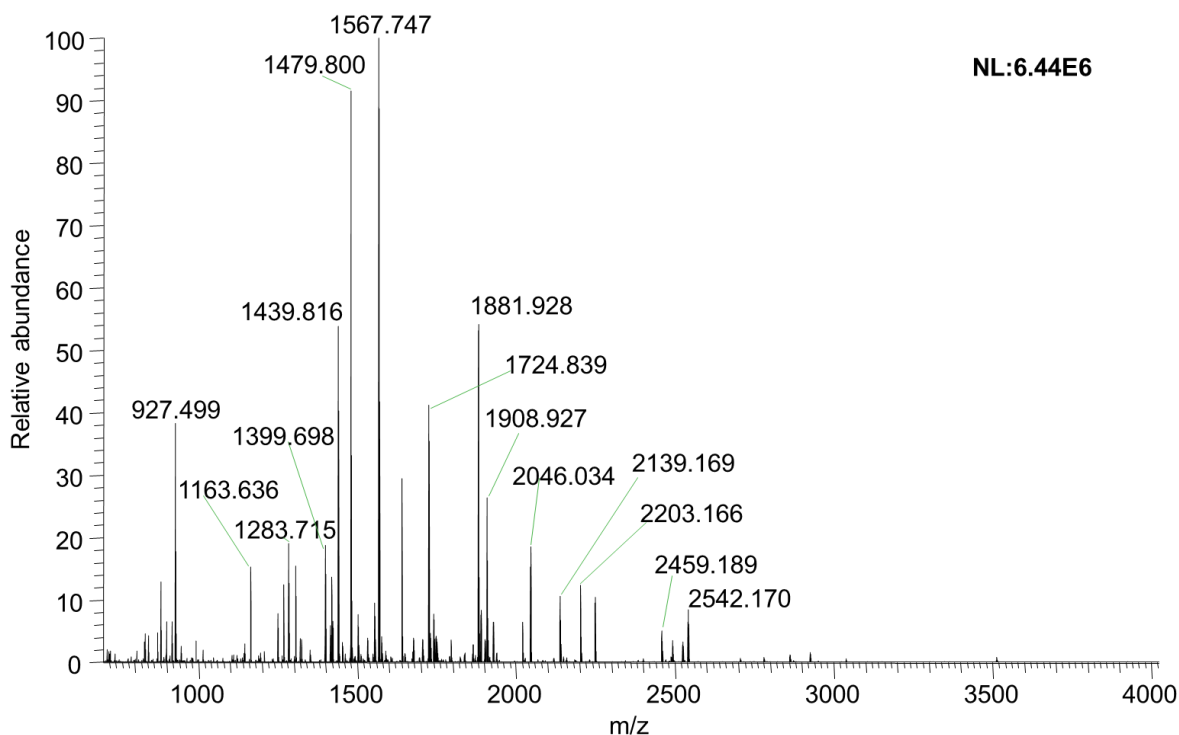


**Obrázek 16:** Spektrum trypsinem naštěpeného ACAS; 700-4000; matrice DHB s  $H_3PO_4$

Pokrytí peptidové sekvence podjednotek ACAS S1 38,8 %, ACAS S2 26,1 %. Uvedená data zachycuje Obrázek 16, a uvedená data značí, že proteinový standard ACAS byl připraven správně a bude možné jej využít v dalších experimentech.

### 3.1.1 Analýza vzorků rozdělených pomocí polyakrylamidové elektroforézy

V souvislosti se standardně prováděnými postupy v proteomice při analýze proteinů či fosfoproteinů bylo provedeno SDS-PAGE vzorových směsí proteinů. V této kapitole jsou uvedeny výsledky z analýz standardních proteinů rozdělených pomocí SDS-PAGE, které byly extrahovány z gelu a štěpeny. Jako vzorek bylo použito: IgG, BSA, chymotrypsin, ACAS a jejich směs. Takto rozdělené proteiny byly poté vizualizovány pomocí barviva Coomassie Blue nebo barveny stříbrem. Vybrané proužky byly jednotlivě vyříznuty z gelu, podrobeny štěpení solubilním trypsinem a nakonec analyzovány na MALDI-Orbitrap v pozitivním módu.



**Obrázek 17:** Spektrum trypticky naštěpeného BSA z polyakrylamidového gelu; 700-4000; matrice CHCA a DAHC

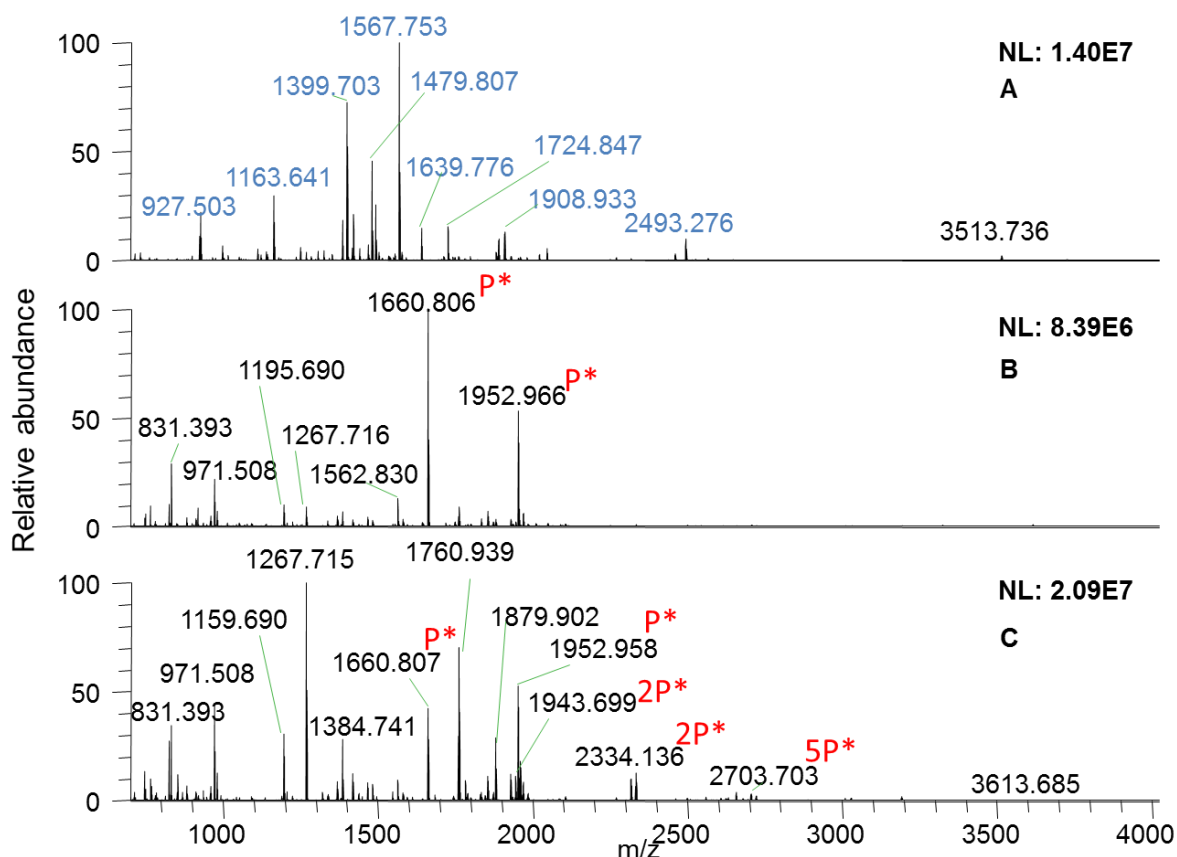
Jako vzorový byl vybrán proužek odpovídající BSA. Spektrum uvedené na Obrázku Obrázek 17 pochází ze separace standardních proteinů na gelu. Po vyhodnocení, které bylo popsáno v Kapitole 3.1 bylo zjištěno, že pokrytí peptidové sekvence BSA je 63,6 %, což značí, že protein byl úspěšně naštěpen v gelu a pracovní postup je správný.

### 3.2 Analýza fosfopeptidové obohacovací účinnosti nosiče Titansphere

Ve všech následujících kapitolách proběhla identifikace fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů dle popisu v kapitole 3.1. Takto identifikované fosfopeptidy byly porovnány s Tabulka 11: **Přehled prakticky identifikovaných fosfopeptidů z proteinů:  $\alpha$ -kasein S1,  $\alpha$ -kasein S2 a  $\beta$ -kasein**, která je uvedena v přílohách. Vyhodnocení dat bylo prováděno manuálně.

Při prostém porovnání s databází Swiss Prot se vyskytovalo mnoho falešně pozitivních výsledků, proto byly takto získané výsledky identifikace fosfopeptidů porovnávány s Tabulka 11. Tabulka shrnuje všechny vyskytující se možnosti PTM fosfopeptidů, které byly při vyhodnocení dat identifikovány a fosfopeptidy identifikované v práci Larsen 2005.

## Směsný vzorek o složení 300 pmol BSA a 30 pmol ACAS:

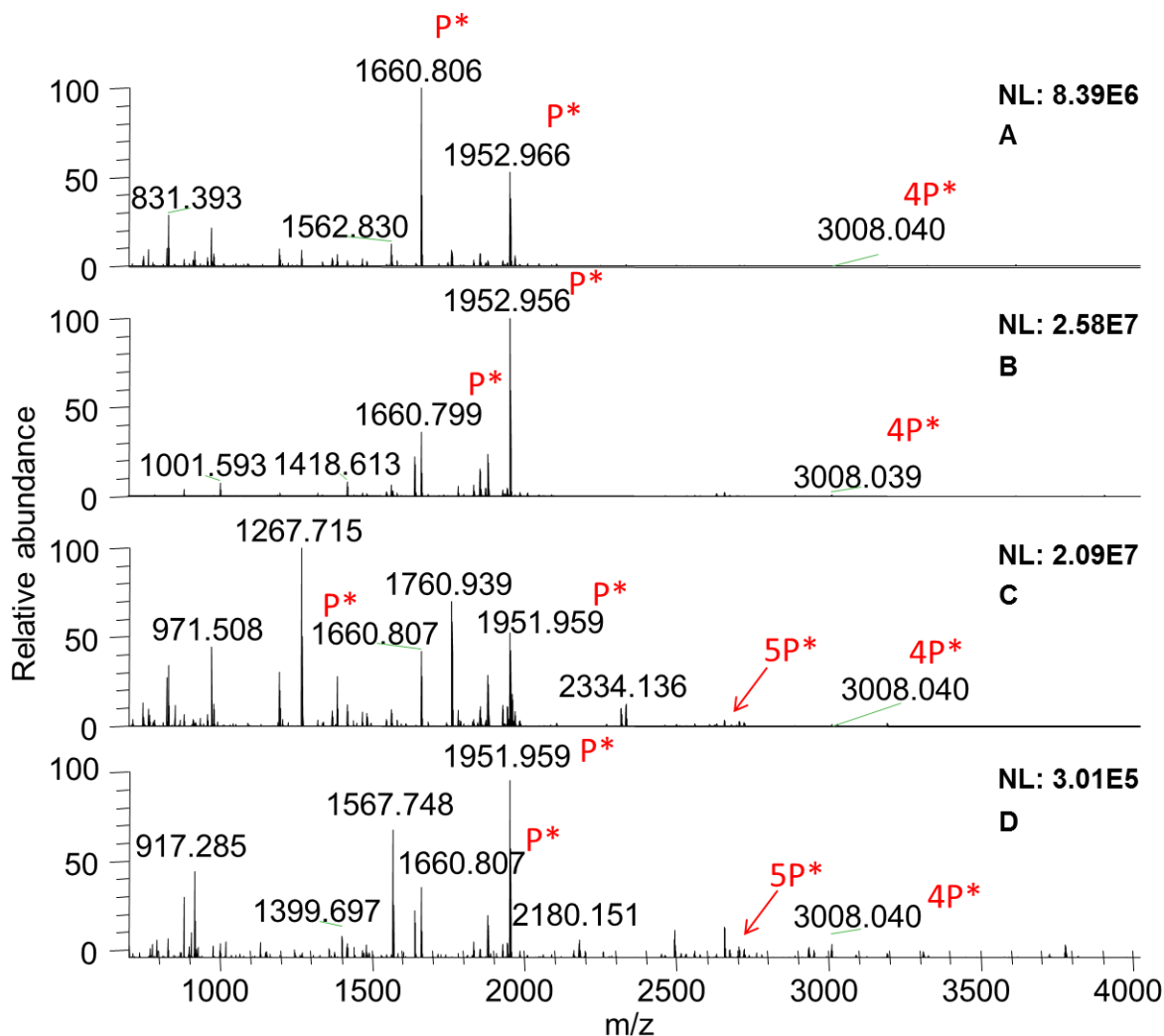


**Obrázek 18:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:30 pmol po obohacení na nosiči TiS; 700-4000; matrice DHB s  $H_3PO_4$ , A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2

Jak je vidět na Obrázku 18, v eluci 1 bylo nalezeno celkově 69 peptidů, z toho bylo 14 peptidů fosforylovaných. V těchto 14 fosfopeptidech bylo nalezeno 5 peptidů multifosforylovaných. V eluci 2 bylo nalezeno celkově 43 peptidů, z toho bylo 8 monofosforylovaných a 6 multifosforylovaných. Nosič Titansphere je vhodný pro techniku MOAC a pracovní protokol je možné dále používat.

### 3.2.1 Optimalizace metodiky

Byla testována změna počtu promývacího kroku pro zvýšení selektivity nosiče. Běžné provedení popsané v Kapitole 2.8 bylo modifikováno na tři promytí promývacím roztokem 1 a byl sledován vliv na relativní intenzitu píků v hmotnostním spektru a změnu počtu identifikovaných peptidů, především fosforylovaných.



**Obrázek 19:** Spektra srovnání směsi BSA:ACAS 300:30 pmol po obohacení na nosiči TiS, při použití rozdílných přístupů; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO. A: eluce 1; B: eluce 1 optimalizovaná; C: eluce 2; D: eluce 2 optimalizovaná.

Z Obrázku 19 je vidět, že změna počtu promytí nepřinesla žádné zlepšení v porovnání se standardním protokolem, protože nedošlo ke zvýšení počtu identifikovaných fosfopeptidů ani intenzit fosfopeptidů a tudíž bylo nadále využíváno standardního postupu.

### 3.2.2 Využití mikrogradientové kapalinové chromatografie při zvyšování pokrytí peptidové sekvence

Separace kapalinovou chromatografií s gradientem mobilní fáze by měla umožnit lepší rozdělení komplexního vzorku a poskytnout méně bohatá spektra, kde se snižuje vliv potlačování fosfopeptidů nefosfopeptidy.

Použití mikrogradientové separace (kapitola 2.7) sice prodlužuje dobu analýzy vzorku, na rozdíl od prostého odsolení podle Kapitoly 2.6, ale přispívá k lepší identifikaci peptidů/fosfopeptidů v obohacovaném vzorku. Toto tvrzení dokazuje fakt, že provedení mikrogradientové separace umožnilo 46,6 % pokrytí peptidové sekvence ACAS podjednotky S1. Při prostém odsolení vzorku ACAS, který byl také naštěpen solubilním trypsinem bylo dosaženo pokrytí ACAS S1 podjednotky 38,8 %, což znamená zvýšení o více než 8%.

### 3.3 Optimalizace složení elučního roztoku 2

Další částí práce byla optimalizace složení elučního roztoku 2, který díky obsahu hydrogenfosforečnanu sodného a vyššího obsahu hydroxidu amonného, než v elučním roztoku 1, má vyšší eluční sílu při eluci monofosforylovaných peptidů, které nebyly z nosiče eluovány elučním roztokem 1. Tento silnější eluční roztok je schopen snáz eluovat také víckrát fosforylované peptidy, které jsou k nosiči vázány silněji. Optimalizací jeho složení jsme se snažili dosáhnout vyšší specifity, kterou by mohla přinést změna rozpustnosti jednotlivých složek, která by zajistila vyšší vzájemný podíl těchto složek.

#### Optimalizace kvantitativního složení elučního roztoku 2:

Bylo provedeno testování šesti variant elučního roztoku 2, tyto varianty se lišily v obsahu ACN a látkovém množství  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

**Tabulka 1:** Složení testovaných elučních roztoků 2

3% vodný roztok amoniaku	
ACN 50%	ACN 40%
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [mM]	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [mM]
50	50
40	40
35	35

V původním protokolu bylo uvedeno složení elučního roztoku 2 (50% ACN, 3%  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). V tomto roztoku nedocházelo k úplnému rozpuštění  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Byl hledán roztok s nejvyšší koncentrací  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , který by byl zcela rozpustný při laboratorní teplotě - optimální roztok Jako optimální byl shledán roztok o složení 40%

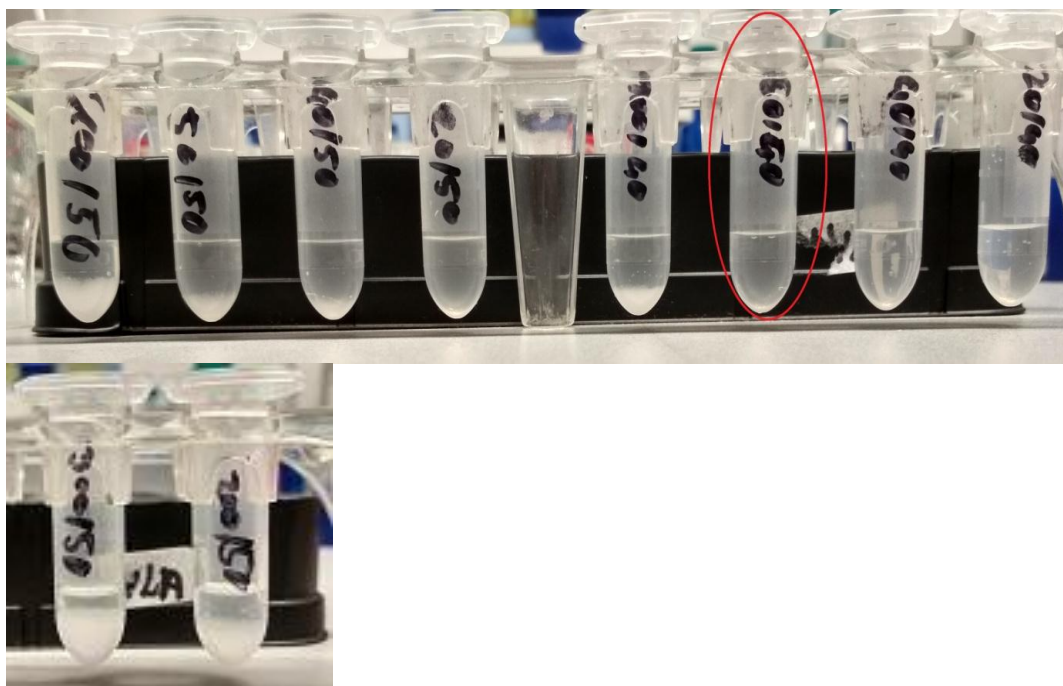
ACN, 3% NH<sub>4</sub>OH a 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Po ochlazení na teplotu 6°C, při které se uchovává v lednici, byl vykrystalizovaný Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> opětovně bezzbytku rozpuštěn v ultrazvukové lázni, na rozdíl od roztoků s vyšší koncentrací ACN.

### **Optimalizace kvalitativního složení elučního roztoku 2:**

Nahrazením hydrogenfosforečnanu sodného hydrogenfosforečnanem amonným jsme testovali, jestli změna kationtu za takový, který je obsažen v přítomném hydroxidu, zvýší rozpustnost hydrogenfosforečnanu a zvýší tak eluční sílu roztoku. Bylo připraveno několik variant roztoku.

**Tabulka 2:** Složení testovaných elučních roztoků 2

3% vodný roztok amoniaku	
ACN 50%	ACN 40%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [mM]	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [mM]
300	100
200	50
100	40
50	20



**Obrázek 20:** Ukázka testovaných roztoků po rozpouštění v ultrazvukové lázni, optimální roztok je označen červeně

Kvantitativní složení optimální roztoku nebylo změněno oproti roztoku s obsahem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Záměna sodného kationtu za amonný nepřinesla žádné zlepšení z hlediska intenzity nebo počtu identifikovaných fosfopeptidů. Jako nejlepší byl vyhodnocen roztok obsahující 40% ACN, 3%  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Po ochlazení na teplotu  $6^\circ\text{C}$ , stejnou jako je v lednici, byl vykrystalizovaný  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  opětovně bezzbytku rozpuštěn v ultrazvukové lázni, na rozdíl od roztoků s vyšší koncentrací ACN resp.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Při použití standardního elučního roztoku dvě jsme dosáhli vyššího počtu fosfopeptidů. Spektrum je součástí příloh - Obrázek24.

### 3.4 Analýza fosfopeptidů v reálném vzorku Tau-proteinu na nosiči Titansphere

Optimalizovaná metodika obohacení směsí peptidů a fosfopeptidů a mikrogradientové separace byly použity k analýze reálného vzorku, rekombinantního Tau-proteinu, který byl fosforylován kinázami (poskytnuto Eliškou Šťovičkovou, v rámci přípravy laboratorně připraveného fosforylovaného Tau proteinu). Jako kontrola byl zvolen rekombinantní Tau-protein bez *in-vitro* fosforylace kinázami.

**Tabulka 3:** Fosforylované peptidy nalezené na fosforylovaném rekombinantním Tau-proteinu, po obohacení fosfopeptidů na nosič tis.

m/z (teoretická)	Modifikace	Sekvence start	Sekvence konec	Vynechané štěpení
1500.7458	1Fosfo	212	224	1
1658.7898	1Fosfo	354	369	0
1743.8789	1Fosfo	210	224	2
1786.8847	1Fosfo	354	370	1
1823.8453	2Fosfo	210	224	2
2060.0576	1Fosfo	299	317	0

Z

**Tabulka 3: Fosforylované peptidy nalezené na fosforylovaném rekombinantním Tau-proteinu, po obohacení fosfopeptidů na nosič tis.**

je patrné, že byly nalezeny fosfopeptidy na *in-vitro* fosforylovaném Tau-proteinu. Což potvrzuje, že Tau protein byl úspěšně nafosforylovaný a zároveň potvrzuje, že metody uvedené v kapitolách 2.7 – 2.8 jsou vhodné pro izolace fosfopeptidů z reálných vzorků. Na druhou stranu, v druhé eluci nebyly nalezeny žádné fosforylované peptidy, což naznačuje, že se všechny vyvázaly z nosiče již při první eluci. Eluční roztok 2 o své eluční síle je především určen pro extrakci silněji navázaných peptidů na nosiči a to především multifosforylovaných. Tento efekt je důležitý pro komplexní vzorky, kde se může nacházet větší množství vícenásobně fosforylovaných peptidů, které se na nosič váží mnohem větší silou.

Podle očekávání nebyly na kontrolním vzorku nalezeny žádné fosforylace. Použitý postup práce a materiál tedy neposkytují falešně pozitivní výsledky. Titansphere byl otestován několika způsoby a je možné ho užít jako referenční materiál pro testování magnetických nosičů.

### **3.5 Srovnání sorbčních vlastností nosičů Titansphere, magnetických nanočásticích a TiO<sub>2</sub> nanotrubic s Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetickými nanočásticemi**

Magnetické nosiče poskytují výhodu při provádění přípravy vzorku k analýze. Vzorky není zapotřebí centrifugovat, ale postačí magnetický separátor. Nemagnetický Titansphere a magnetické nosiče „core-shell“ nanočástice a nanotrubic z TiO<sub>2</sub>s magnetickými



nanočásticemi byly srovnány z hlediska počtu fosforylovaných peptidů v poměru k nefosforylovaným, z hlediska absolutního počtu fosforylovaných peptidů (nalezené podle postupu uvedeného v Kapitole 3.1) a intenzit píků, které zobrazují fosfopeptidy v hmotnostním spektru.

### 3.5.1 Mapování vlastností nosičů na různých poměrech látkových množství ve směsi

V této části byla srovnávána stejná množství nosičů, 1 mg na různých poměrových zastoupení naštěpených proteinů ve směsi. Toto množství nosiče k množství peptidů je pokládáno za vhodné pro testované rozmezí podle Li, 2009.

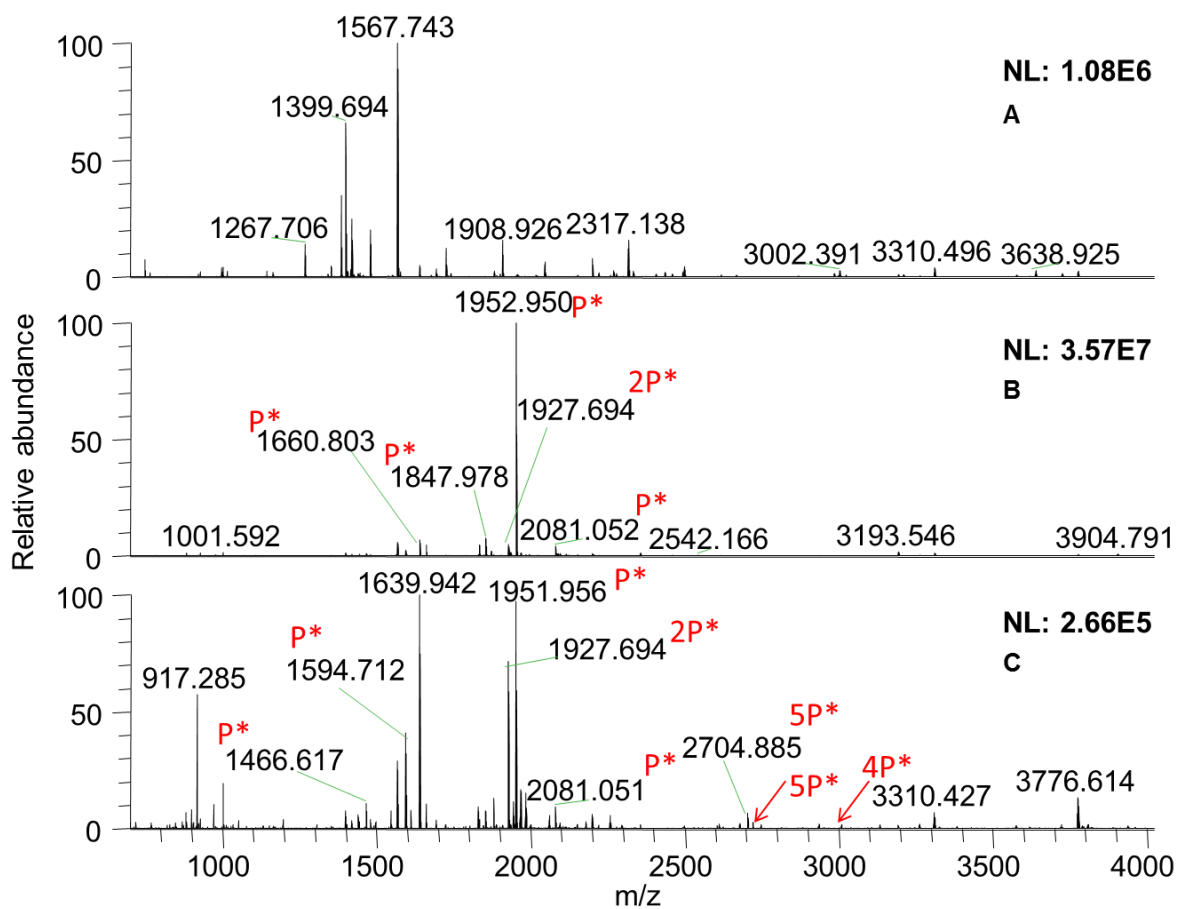
#### Analýza směsi BSA:ACAS 300:150 pmol (*n:n*)

**Tabulka 4:** Analýza směsi BSA:ACAS  $n=300:150$  pmol po obohacení fosfopeptidů na nosičích TiS, NP a TNT

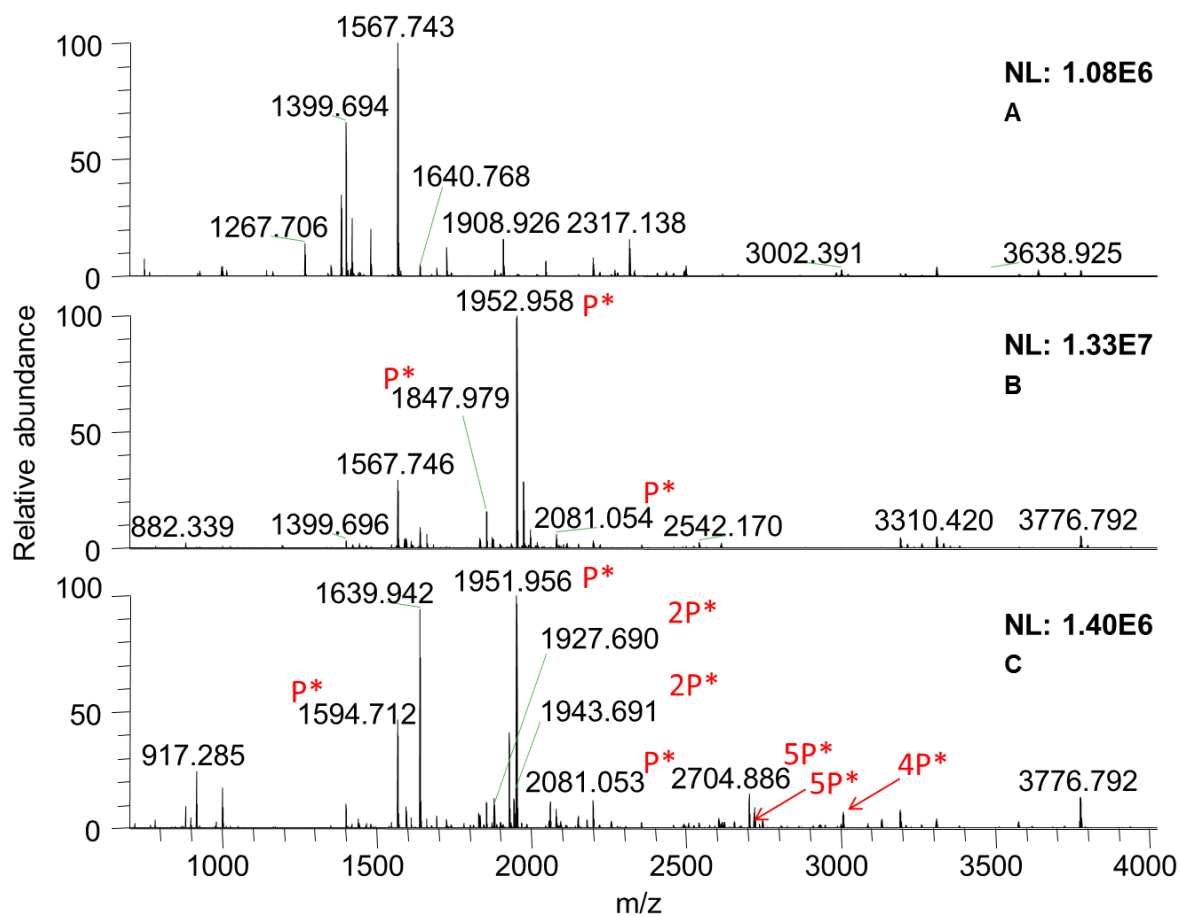
Materiál	Eluce	nefosforylované peptidy	fosforylované peptidy	celkem peptidů	zastoupení fosforylovaných peptidů [%]
TiS	1	2	9	11	81.8%
	2	1	14	15	93.3%
TNT	1	2	17	19	89.5%
	2	2	17	19	89.5%
NP	1	0	9	9	100.0%
	2	7	12	19	63.2%

Při takto vysokém látkovém množství ACAS, jako je v této analýze je patrný minimální vliv nefosforylovaných peptidů, které by se mohly vázat na nosiče a poté se eluovat. Tento poměr nefosfopeptidů k fosfopeptidům se v reálných vzorcích z pravidla nevyskytuje. Proto byly testovány další směsi s vyšším poměrem. Pro simulaci různých podmínek byla testována různá množství, tak abychom pokryli větší množství možných variant. Spektra této analýzy jsou uvedena v přílohách pod označením Obrázek 32, 33 a 34

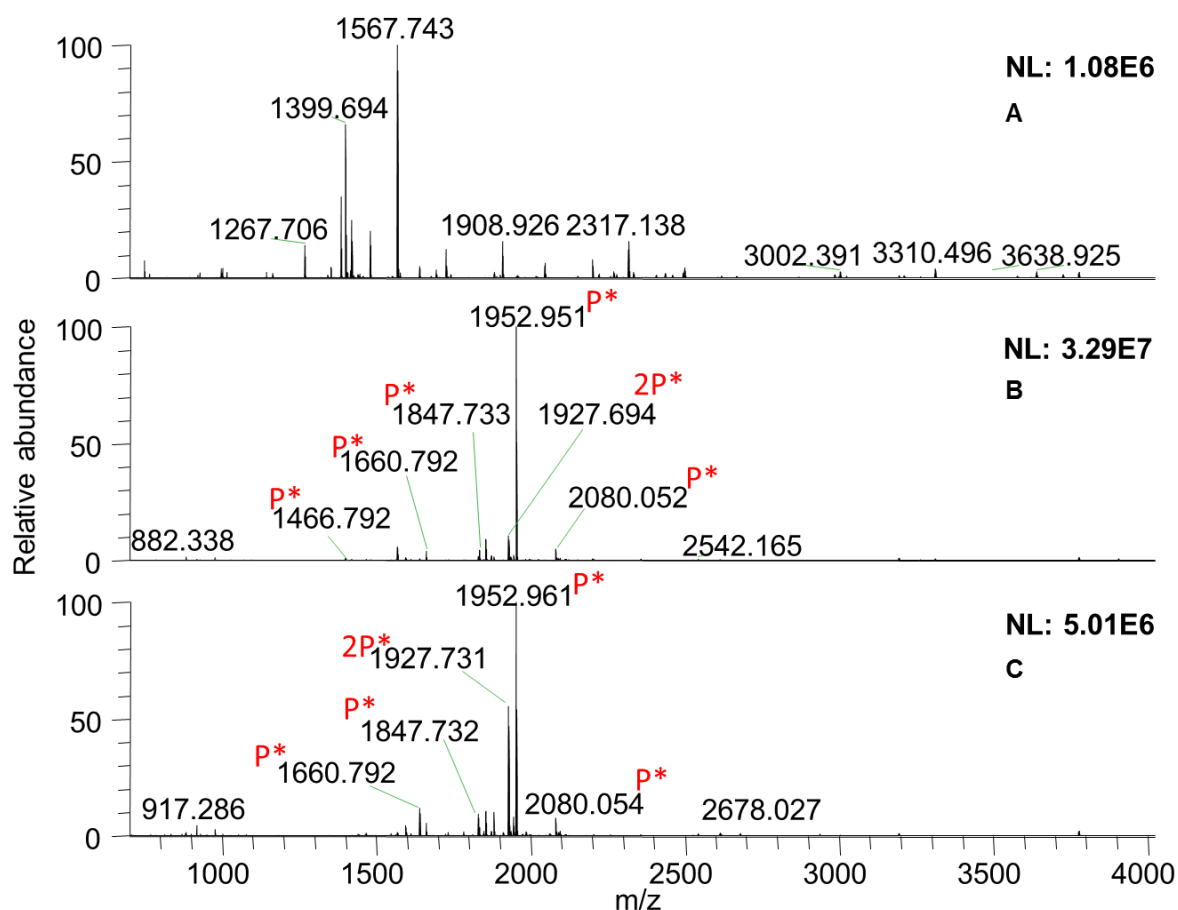
**Analýza směsi BSA:ACAS n=300:30 mol:**



**Obrázek 21:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:30 pmol po obohacení na nosiči TiS; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2



**Obrázek 22:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:30 pmol po obohacení na nosiči NP; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2



**Obrázek 23:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:30 pmol po obohacení na nosiči TNT; 700-4000; matrice DHB s  $H_3PO_4$ , A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2

**Tabulka 5:** Analýza směsi BSA:ACAS v poměru 300:30 pmol po obohacení fosfopeptidů na nosičích TiS, NP a TNT

Materiál	Eluce	nefosforylované peptidy	fosforylované peptidy	celkem peptidů	zastoupení fosforylovaných peptidů [%]
TiS	1	2	9	11	81.8%
	2	2	17	19	89.5%
TNT	1	1	14	15	93.3%
	2	2	17	19	89.5%
NP	1	0	9	9	100.0%
	2	7	12	19	63.2%

Z Tabulky 5 je vidět, že v eluci 2 nosiče NP je sice stejný absolutní počet identifikovaných peptidů (fosfo + nefosfo), ale procentuální zastoupení identifikovaných forem fosfopeptidů byl nejnižší a s celkovými 7 nefosforylovanými peptidy se jedná o nevyšší

nespecifickou sorpci i přesto že v eluční frakci 1 nebyly nefosforylované peptidy identifikovány vůbec. Titanové nanotrubičky vykazují v první eluci podobné množství nespecificky sorbovaných peptidů jako u TiS, ale procentuální zastoupení identifikovaných forem fosfopeptidů je o 10% vyšší což způsobil vyšší počet identifikovaných fosfopeptidů, což je výhodné. Druhé eluce poskytly stejné výsledky. Z hlediska intenzit jednotlivých píků, které náleží fosfopeptidům na Obrázcích 21, 22 a 23 je například patrné, že na nosiči NP je dobře viditelný 5 krát fosforylovaný peptid o m/z přibližně 2704. Tento není vůbec patrný na obrázku 23, což značí, že při tomto poměrném zastoupení fosfopeptidů je NP vhodnějším nosičem.

### **Analýza směsi BSA:ACAS 3000:30 pmol (n:n):**

**Tabulka 6:** Analýza 1 a 2; analýza směsi BSA:ACAS v poměru 3000:30 pmol po obohacení fosfopeptidů na nosičích TiS, NP a TNT

Analýza 1					
Materiál	Eluce	nefosforylované peptidy	fosforylované peptidy	celkem peptidů	zastoupení fosforylovaných peptidů [%]
TiS	1	63	19	82	23.17%
	2	65	13	78	16.67%
TNT	1	63	19	82	23.17%
	2	38	13	51	25.49%
NP	1	43	11	54	20.37%
	2	62	16	78	20.51%
Analýza 2					
Materiál	Eluce	nefosforylované peptidy	fosforylované peptidy	celkem peptidů	zastoupení fosforylovaných peptidů [%]
TiS	1	61	11	72	15.3%
	2	39	13	52	25.0%
TNT	1	43	17	60	28.3%
	2	14	13	27	48.1%
NP	1	80	6	86	7.0%
	2	46	14	60	23.3%

Prostředí, kde je desetinásobně vyšší vstupní množství peptidů z BSA, než u pokusu v **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, jednoznačně zvyšuje míru nespecifické sorpce na všech nosičích. Navzdory tomu si nosiče uchovávají absolutní počty identifikovaných fosfopeptidů a většinou se jejich počty zvyšují. NP vykazují nejvyšší počet nefosforylovaných peptidů, a proto byly z dalších experimentů vyřazeny. Vybraná spektra této analýzy jsou uvedena v přílohách pod označením Obrázek 25, 26 a 27.

### 3.6 Mapování rozsahu obohacovací účinnosti titanových nanotrubic ve srovnání s nosičem Titansphere

Na základě výsledků míry nespecifické sorpce, která byla vyšší než u ostatních dvou nosičů popsaných v předchozích kapitolách, a tedy nižšího procentuálního zastoupení fosfopeptidů, bylo rozhodnuto o vyřazení „core-shell“ nanočástic z dalších experimentů. Pro další experimenty byly použity pouze Titansphere a titanové nanotrubice. V této části byly ověřovány sorbční vlastnosti nosičů při nízkém zastoupení ACAS ve směsi.

#### Analýza směsi BSA:ACAS 300:5 pmol (n:n):

Bylo sníženo množství ACAS ve směsi na 5 pmol a tím testována schopnost nosičů extrahovat ze směsi fosfoproteinů za přítomnosti velkého poměrového množství nefosfoproteinů. Oproti předchozím experimentům nebylo navyšováno množství peptidů z BSA, ale naopak sníženo množství peptidů/fosfopeptidů z ACAS.

**Tabulka 7:** Analýza směsi BSA:ACAS n=300:5 pmol po obohacení fosfopeptidů na nosičích TiS a TNT

Materiál	Eluce	nefosforylované peptidy	fosforylované peptidy	celkem peptidů	zastoupení fosforylovaných peptidů [%]
TiS	1	45	6	51	11.8%
	2	51	10	61	16.4%
TNT	1	33	4	37	10.8%
	2	29	7	36	19.4%

Procentuální zastoupení fosforylovaných peptidů, extrahovaných ze směsi se mírně liší mezi nosiči. Zde vykazují titanové nanotrubice nižší absolutní počet identifikovaných fosfopeptidů oproti Titansphere, ale také významně nižší nespecifickou sorpci.

### **Analýza směsi BSA:ACAS 300:1 pmol (n:n):**

Dále jsme pokračovali ještě dalším snížením množství peptidů z ACAS ve směsi na 1 pmol a tím testována schopnost nosičů extrahovat ze směsi fosfoproteiny za přítomnosti velkého poměrového nadbytku nefosforylovaných proteinů. Zároveň bylo sníženo množství nosiče na 0,25 mg, kvůli již zmíněným závěrům práce Li, 2009. Množství nosiče oproti předchozím pokusům bylo sníženo společně se značně klesajícím množstvím ACAS. Spektra této analýzy jsou uvedena v přílohách pod označením Obrázek 28 a 29.

**Tabulka 8:** Analýza směsi BSA:ACAS n=300:1pmol po obohacení fosfopeptidů na nosičích TiS a TNT

Materiál	Eluce	nefosforylované peptidy	fosforylované peptidy	celkem peptidů	zastoupení fosforylovaných peptidů [%]
TiS	1	48	7	55	12.7%
	2	56	9	65	13.8%
TNT	1	6	0	6	0.0%
	2	10	1	11	9.1%

Při takto vysokém podílu nefosforylovaných peptidů je patrná velká nespecifická sorpce. Nízký absolutní počet identifikovaných fosforylovaných peptidů. Je zřejmé, že většina fosforylovaných peptidů se z nosiče eluluje již v první eluci.

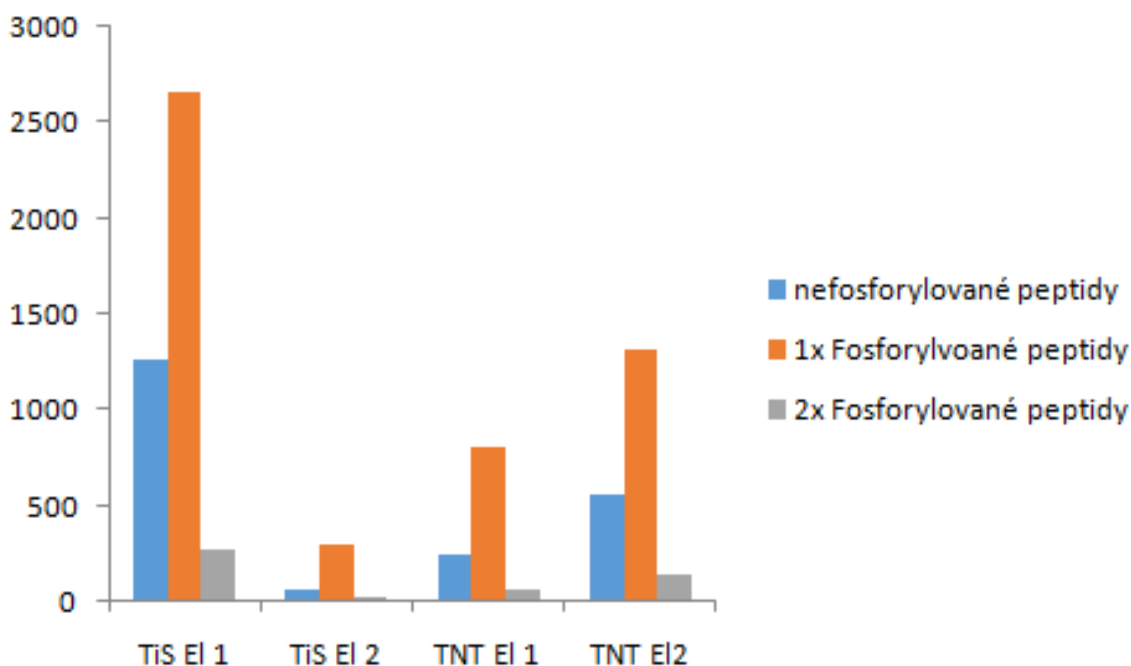
Z dílčích výsledků je patrné, že při vysokém zastoupení fosfoproteinu ve vzorku všechny nosiče vykazují nízkou nespecifickou sorpci, která se zvyšuje s vzrůstajícím poměrovým zastoupením nefosforylovaných peptidů ve vzorku před obohacením. Ze srovnání výsledků při nízkém zastoupení fosfopeptidů ve vstupním vzorku je patrná nižší afinita titanových nanotrubic k nefosforylovaným proteinům, která by mohla být dána nižší kapacitou nosiče, což je patrné při srovnání Tabulky 7 a 8, kdy kleslo množství nosiče na 25 % a počet identifikovaných nefosfopeptidů klesl o zhruba dvě třetiny. Zároveň je zajímavé, že až při snížení látkového množství ACAS ve směsi pod 30 pmol významně klesl počet identifikovaných fosfopeptidů. Vybraná spektra této analýzy jsou uvedena v přílohách pod označením Obrázek 31 a 30.

### 3.7 Analýza komplexní peptidové směsi

Tato analýza probíhala na 1 mg nosiče TiS a 3 mg nosiče TNT, kvůli vykompenzování možné nižší kapacity nosiče, která byla zjištěna spolupracujícím pracovištěm (Katedra molekulární patologie, FVZ, Univerzita Obrany) při dřívějších analýzách (dosud nepublikováno). Cílem bylo rovněž analyzovat míru nesespecifické sorpce při takovémto zvýšení množství nosiče. Pro velkou komplexitu vzorku byla analýza prováděna na nano-LC-MS/MS a vyhodnocení bylo provedeno pomocí Proteome discoverer 1.4.

**Tabulka 9:** Analýza lyzátu po obohacení na TiS a TNT, vyjádřeny počty identifikací (fosfo)peptidů v závislosti na míře jejich fosforylace

Materiál	Eluce	Nefosforylované	1x Fosfo	2x Fosfo	3x Fosfo	4x Fosfo	5x Fosfo
TiS	El 1	1267	2662	270	11	1	0
	El 2	70	299	22	1	0	0
TNT	El 1	242	804	60	1	0	0
	El2	559	1323	137	5	1	0

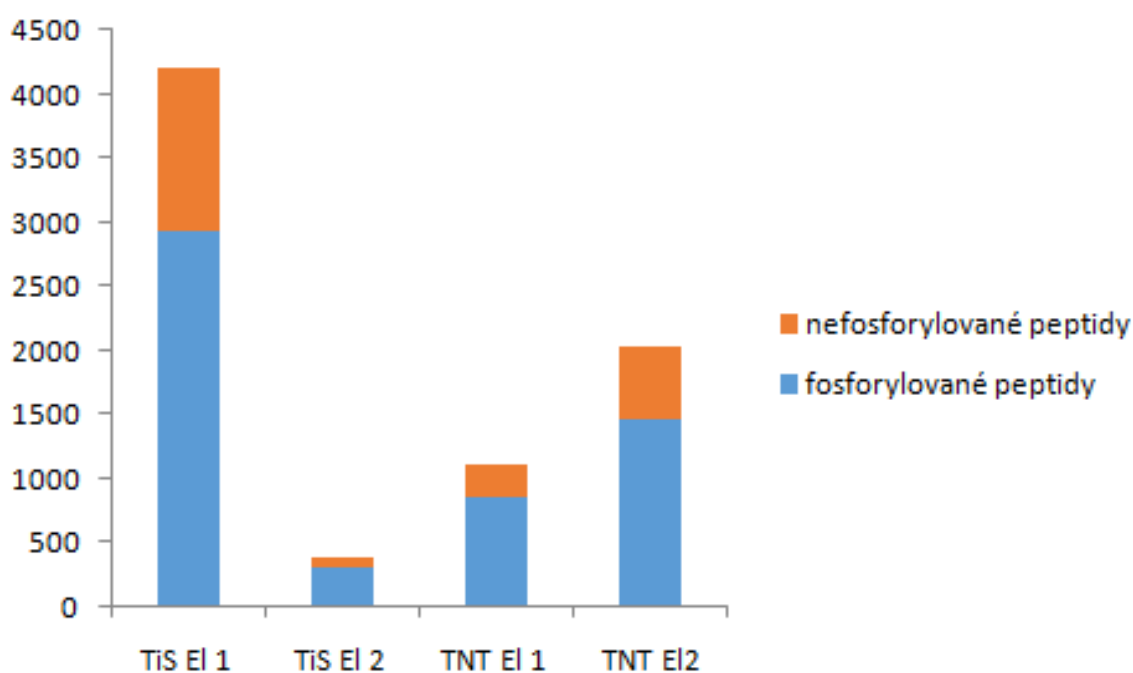


**Graf 1:** Zobrazení absolutního zastoupení frakcí v jednotlivých elucích analýzy lyzátu po obohacení na TiS a TNT, vyjádřeny počty identifikací (fosfo)peptidů v závislosti na míře jejich fosforylace



**Tabulka 10:** Procentuální srovnání zastoupení fosfo a nefosfopeptidů analýzy lyzátu po obohacení na TiS a TNT, vyjádřeny počty identifikací (fosfo)peptidů

Materiál	Eluce	Nefosforylované peptidy	Suma fosforylovaných peptidů	Fosfo/nefosforylované peptidy
TiS	El 1	1267	2944	43.0 %
	El 2	70	322	21.7 %
TNT	El 1	242	865	28.0 %
	El2	559	1466	38.1 %



**Graf 2:** Absolutní zastoupení fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů ve vzorku lyzátu po obohacení na nosičích TiS a TNT.

Z Tabulky 9, 10 a Grafu 1 je patrné, že nejvyšší počet fosfopeptidů byl nalezen v eluci 1 na nosiči TiS, ale zároveň má tato frakce nejvyšší zastoupení nefosfopeptidů. Eluce 2 nosiče TiS je velmi specifická podle poměru nefosforylovaných:fosforylovaných peptidů 70:322, ale z toho bylo pouze 23 multifosforylovaných. Z výsledku je dále patrné, že z TiS jsou fosfopeptidy mnohem ochotněji eluovány a většina se jich nachází v první eluční frakci, na rozdíl od TNT. Pro TNT platí, s výjimkou poměru 300:1pmol, že poskytuje vyšší nebo srovnatelnou procentuální míru obsahu fosfopeptidů ve frakcích, jako TiS, a eluce 2 má vyšší počet multifosforylovaných peptidů. Tento materiál nemá tak vysoký počet izolovaných fosfoproteinů, ale je obecně specifičtější, tzn., má nižší nescifickou sorpci. Jeho problémem

je kapacita a nepomohlo ani zvýšení poměru nosiče na 3:1 (TNT:TiS), jeho hlavní výhodou tedy zůstává vyšší specifická izolace fosfopeptidů.

V navazující práci by měly být provedeny další analýzy optimalizující poměr těchto nosičů. Nicméně nosič TNT je i nadále vyvíjen Centrem materiálů a nanotechnologií a v budoucnu budou testovány jeho nové varianty, které by měly přinést zvýšení kapacity tohoto nosiče.

## 4 Závěr

---

Ve své práci jsem se věnoval několika přístupům, které mohou sloužit k úspěšné MS analýze proteinů a jejich fosforylace. Mezi tyto přístupy patřily jednak metody vlastní analýzy, jako jsou např. elektroforetické metody pro analýzu proteinů a fosfoproteinů nebo MS analýza fosfopeptidů po izolaci z jednoduchých, tak i z komplexních proteinových směsí. Významná část této diplomové práce je věnována obohacování fosfopeptidů, kdy byly testovány jak standardní metody pro izolaci fosfopeptidů na nemagnetických nosičích, tak i práce s magneticky aktivními nanomateriály a separační techniky využívající TiO<sub>2</sub> nanotrubic. Tyto materiály byly mezi sebou porovnávány.

Mezi dílčí úkoly v této práci patřila i optimalizace pracovního protokolu, podle kterého bylo provedeno obohacení vzorků na nosičích. Tato optimalizace ovšem nebyla přínosná pro zvýšení počtu identifikovaných fosforylovaných peptidů ani jejich intenzity ve spektrech. Pouze mikrogradientová LC zvýšila pokrytí peptidové sekvence, což bylo přínosné pro separaci fosfopeptidů v komplexních vzorcích.

Dále bylo cílem práce srovnat vlastnosti nosičů Titansphere, "core-shell" nanočástic a nanotrubic z TiO<sub>2</sub>, pomocí testování na připravených vzorcích směsi BSA a ACAS. V každém experimentu byl získán pozitivní výsledek ve smyslu identifikovaných fosforylovaných peptidů. Jejich výskyt ve vzorcích s nízkým zastoupením ACAS na vstupu byla nižší než u směsí s obsahem 30 pmol, z čehož vyplývá, že obohacovací účinnost nosičů Titansphere a nanotrubic z TiO<sub>2</sub> klesá s množstvím fosforylovaných proteinů ve vzorku. Při poměru 3000:30 pmol (BSA:ACAS) bylo pozorováno, že se množství identifikovaných fosforylovaných peptidů nesnížilo, ale byl viditelný nárůst nespecifické sorpce na nosičích, které odpovídá vysokému tomuto poměru. Podobný výsledek poskytují i již zmíněné poměry 300:5 a 300:1.

Nosič magnetické "core-shell" nanočástice má obecně vyšší nespecifickou sorpci než ostatní dva materiály. Nanotrubic z TiO<sub>2</sub> mají při nízkém zastoupení fosforylovaných peptidů nižší nespecifickou sorpci než nosič Titansphere. Ze spekter pokusů 300:5 a 300:1, tedy při nízkém zastoupení fosfopeptidů na vstupu, je patrné, že TNT v druhé eluční frakci poskytují některé multifosforylované peptidy, což je patrné z jejich intenzit, které nejsou pouhým okem vidět u spekter nosiče TiS. Při analýze lyzátu bylo zjištěno, že i přes

trojnásobné navýšení množství TNT oproti Titansphere je vyšší počet peptidů sorbovaný právě na Titansphere, což by mohlo ukazovat na nižší vazebnou kapacitu TNT, ale snadněji se z Titansphere uvolňují multifosforylované peptidy a to již v první eluci.

Nanotrubice z  $\text{TiO}_2$  silněji zadržují multifosforylované peptidy, ve srovnání s Titansphere, a tyto jsou uvolněny až v eluci 2. Absolutní počet fosforylovaných peptidů, jak mono tak multifosforylovaných je u Titansphere vyšší, ale to je doprovázeno vyšší nespecifickou sorpcí. TNT se tedy ukázal, jako nejspecifičtější nosič mezi srovnávanými pro použití v reálných vzorcích, které mají nízké zastoupení fosforylovaných peptidů. Tento materiál považuji za slibný pro další vývoj a možné použití v klinických aplikacích. Tato práce byla součástí již probíhajících experimentů na pracovišti a výsledky prezentované v této práci, by mohly pomoci při další charakterizaci a využití nosičů a to především pokud se jedná o volbu vhodného nosiče pro různé aplikace a to včetně analýzy klinických a výzkumných vzorků.

## 5 Seznam použité literatury

---

ALEKSANDROV, M. L. GALL, L. N. KRASNOV, V.N. NIKOLAEV, V.I. 1984. Ion Extraction from Solutions at Atmospheric Pressures: A Mass Spectrometric Method of Analysis of Bioorganic Compounds. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 277(1984): 379–383.

ALEPERT, A. J. 1990. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* 19 , 177 – 196.

AALPERT, A. J. 2008. Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides. *Anal. Chem.* 80 , 62 – 76.

ALESSI, D. R., GOMEZ, N. MOORHEAD, G. COHEN, P. 1995. Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Current Biology* [online]. 5 (3) 283–295. ISSN 0960-9822. Dostupné z: [doi:10.1016/S0960-9822\(95\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00059-5)

ALLEN, B. INGRAM, E. TAKAO, M. GOEDERT, M. 2002. Abundant Tau Filaments and Nonapoptotic Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Human P301S Tau Protein. *Journal of Neuroscience*. 22 (21), 9340–9351. ISSN 0270-6474, 1529-2401.

ALONSO, A. D. ZAIDI, T. NOVAK, M. BARRA, H. S. GRUNDKE-IQBAL S. IQBAL, K. 2001. Tau isoforms: Interaction with Alzheimer disease abnormally hyperphosphorylated Tau and in vitro phosphorylation into the disease-like protein. *Journal of Biological Chemistry* [online]. [vid. 2018-01-09]. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: [doi:10.1074/jbc.M105365200](https://doi.org/10.1074/jbc.M105365200)

ALONSO, A. del C. MEDERLYOVA, A. NOVAK, M. GRUNDKE-IQBAL, I. IQBAL, K. 2004. Promotion of Hyperphosphorylation by Frontotemporal Dementia Tau

Mutations. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279** (33), 34873–34881. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:[10.1074/jbc.M405131200](https://doi.org/10.1074/jbc.M405131200)

ÁLVAREZ, P. M. JARAMILLO, J. LÓPEZ-PIÑERO, F. PLUCINSKI, P. K. 2010. Preparation and characterization of magnetic TiO<sub>2</sub> nanoparticles and their utilization for the degradation of emerging pollutants in water. *Applied Catalysis B: Environmental* [online]. **100** (1–2), 338–345. ISSN 09263373. Dostupné z: doi:[10.1016/j.apcatb.2010.08.010](https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.08.010)

BALAZY, M. 2004. Eicosanomics: targeted lipidomics of eicosanoids in biological systems. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* [online]. **73** (3–4), 173–180. ISSN 10988823. Dostupné z: doi:[10.1016/j.prostaglandins.2004.03.003](https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.03.003)

BANERJEE, S. MAZUMDAR, S. 2012. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. **2012**, 1–40. ISSN 1687-8760, 1687-8779. Dostupné z: doi:[10.1155/2012/282574](https://doi.org/10.1155/2012/282574)

BELTRAN, L. CUTILLAS, P. R. 2012. Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids* [online]. **43** (3), 1009–1024. ISSN 0939-4451, 1438-2199. Dostupné z: doi:[10.1007/s00726-012-1288-9](https://doi.org/10.1007/s00726-012-1288-9)

BONK, T. HUMENY, T. 2001. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. *The Neuroscientist* [online]. **7** (1), 6–12. ISSN 1073-8584, 1089-4098. Dostupné z: doi:[10.1177/107385840100700104](https://doi.org/10.1177/107385840100700104)

BREITKOPF, S. BASARA, J. M. 2012. Determining In Vivo Phosphorylation Sites Using Mass Spectrometry. In: AUSUBEL, F. M. BRENT, R. STRUHL, K. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. [vid. 2018-02-28]. ISBN 978-0-471-14272-0. Dostupné z: doi:[10.1002/0471142727.mb1819s98](https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1819s98)

CARGNELLO, M. ROUX, P. P. 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. **75** (1), 50–83. ISSN 1092-2172, 1098-5557. Dostupné z: doi:[10.1128/MMBR.00031-10](https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10)

CAVALLINI, A, BREWERTON, S. BELL, A. SARGENT, S. GLOVER, S. BOSE, S. 2013. An Unbiased Approach to Identifying Tau Kinases That Phosphorylate Tau at Sites Associated with Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **288** (32) 23331–23347. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:[10.1074/jbc.M113.463984](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.463984)

COLE, R., B. 2012. Electrospray and MALDI Mass Spectrometry. *John Wiley & Sons, Inc.* ISBN:9780471741077. Online ISBN:9780470588901. DOI:10.1002/9780470588901

CORBIN, J. D. P. H. SUGDEN, L. WEST, D. A. FLOCKHART, T. M. LINCOLN a D. MCCARTHY, 1978. Studies on the properties and mode of action of the purified regulatory subunit of bovine heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. **253** (11), 3997–4003. ISSN 0021-9258, 1083-351X.

COTTER, R. J., 1992. Time-of-Flight Mass Spectrometry. *American Chemical Society*. Washington, DC. Dostupné z DOI: [10.1021/ac00045a002](https://doi.org/10.1021/ac00045a002)

DAI, J. JIN, W. H. SHENG, Q. H. SHIEH, C. H. WU, J. R. ZENG, R. 2007. Protein phosphorylation and expression profiling by Yin-yang multidimensional liquid chromatography (Yin-yang MDLC) mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **6**, 250 – 262.

DAJANI, R. E. FRASER, S. M. ROE, N. YOUNG, V. GOOD, T. C. DALE, H. PEARL, H. J. 2001. Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ : Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. *Cell* [online]. **105** (6), 721–732. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:[10.1016/S0092-8674\(01\)00374-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00374-9)

DAVIS, R. J., 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*. **268** (20), 14553–14556. ISSN 0021-9258, 1083-351X.

DAS, S. SOPHA, S. KRBAL, M. ZAZPE, R. PODZEMNA, V. PRIKRYL, J. MACAK, J. M. 2017. Electrochemical Infilling of CuInSe<sub>2</sub> within TiO<sub>2</sub> Nanotube Layers and Subsequent Photoelectrochemical Studies. *ChemElectroChem* [online]. **4** (3), 495–499. ISSN 21960216. Dostupné z: doi:[10.1002/celec.201600763](https://doi.org/10.1002/celec.201600763)

DELOBEL, P. FLAMENT, S. HAMDANE, M. MAILLIOT, C. SAMBO, A. V. BÉGARD, S. SERGEANT, N. BUÉE, L. 2002. Abnormal Tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis. *Journal of Neurochemistry*. **83** (2), 412–420. ISSN 0022-3042.

DELOBEL, P. LAVENIR, I. FRASER, G. INGRAM, E. HOLZER, M. GHETTI, B. Maria Grazia SPILLANTINI, R. CROWTHER, A. GOEDERT, M. 2008. Analysis of Tau Phosphorylation and Truncation in a Mouse Model of Human Tauopathy. *The American Journal of Pathology* [online]. **172** (1), 123–131. ISSN 0002-9440. Dostupné z: doi:[10.2353/ajpath.2008.070627](https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070627)

DEMURO, A. SMITH, M. PARKER, I. 2011. Single-channel Ca<sup>2+</sup> imaging implicates A $\beta$ 1–42 amyloid pores in Alzheimer's disease pathology. *The Journal of Cell Biology* [online]. **195** (3), 515–524. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:[10.1083/jcb.201104133](https://doi.org/10.1083/jcb.201104133)

DENG, J. LAZAR, I. M. 2016. Proteolytic Digestion and TiO<sub>2</sub> Phosphopeptide Enrichment Microreactor for Fast MS Identification of Proteins. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* [online]. **27**(4), 686–698. ISSN 1044-0305, 1879-1123. Dostupné z: doi:[10.1007/s13361-015-1332-6](https://doi.org/10.1007/s13361-015-1332-6)

DOBSON, K. D. MCQUILLAN, A. J. 2000. In situ infrared spectroscopic analysis of the adsorption of aromatic carboxylic acids to TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> from aqueous



solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **56** (3), 557–565.

DOMON, B. 2006. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* [online]. **312** (5771) 212–217. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:[10.1126/science.1124619](https://doi.org/10.1126/science.1124619)

DOROSHENKO, V. M. COTTER, R. J. 1993. A New Method of Trapping Ions Produced by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization in a Quadrupole Ion Trap. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7** 822–827.

DU, J., N. WEI, H. XU, Y. GE, J. VASQUEZ-VIVAR, T. GUAN, K. T. OLDHAM, K. A. PRITCHARD a Y. SHI 2009. Identification and Functional Characterization of Phosphorylation Sites on GTP Cyclohydrolase I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. **29** (12) 2161–2168. ISSN 1079-5642, 1524-4636. Dostupné z: doi:[10.1161/ATVBAHA.109.194464](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.194464)

EIDEN, G. C. CISPEN, M. E. ALEXANDER, M. L. NOGAR, N. S. 1993. A Method of Increasing the Sensitivity for Laser Desorption in an Ion Trap Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**. 706–709.

EKMAN, R. 2009. Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications. Hoboken, N.J: *John Wiley & Sons. Wiley-Interscience series on mass spectrometry*. ISBN 978-0-471-71395-1.

EL-ANEED, A. COHEN, A. BANOUB, J. 2009. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. **44** (3) 210–230. ISSN 0570-4928, 1520-569X. Dostupné z: doi:[10.1080/05704920902717872](https://doi.org/10.1080/05704920902717872)

FAROOQ, A. ZHOU, M. M. 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular Signalling* [online]. **16** (7), 769–779. ISSN 0898-6568. Dostupné z: doi:[10.1016/j.cellsig.2003.12.008](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.12.008)

FENN, J.B. MANN, M. MENG, C. K. WONG, S. F. WHITHOUS. C. M. 1989. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, 246(1989): 64–71.

FERRER, I., R. BLANCO, M. CARMONA, R. RIBERA, E. GOUTAN, B. PUIG, M. J. REY, A. CARDOZO, F. VIÑALS a T. RIBALTA 2001. Phosphorylated map kinase(ERK1, ERK2) expression is associated with early Tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain Pathology(Zurich, Switzerland)*. **11** (2), 144–158. ISSN 1015-6305.

FUCHS, B. SCHILLER, J. SÜß, R. NIMPTSCH, A. SCHÜRENBERG, M. SUCKAU, D. 2009. Capabilities and disadvantages of combined matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC): Analysis of egg yolk lipids. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* [online]. **22**(1), 35–42. ISSN 0933-4173, 1789-0993. Dostupné z: doi:[10.1556/JPC.22.2009.1.7](https://doi.org/10.1556/JPC.22.2009.1.7)

FUKUYAMA, Y. 2011. Liquid Matrices in MALDI-MS, Applications of Ionic Liquids in Science and Technology, Prof. Scott Handy (Ed.), ISBN: 978-953-307-605-8, InTech, dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/applications-of-ionic-liquids-in-science-and-technology/liquid-matrices-inmaldi-ms>

GAMBLIN, T. C. CHEN, F. ZAMBRANO, A. ABRAHA, A. LAGALWAR, S. GUILLOZET, A. L. LU, M. FU, Y. CRYNS, V. L. 2003. Caspase cleavage of Tau: Linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of*

*Sciences* [online]. **100** (17), 10032–10037. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: [doi:10.1073/pnas.1630428100](https://doi.org/10.1073/pnas.1630428100)

GILAR, M. O. P. DALY, A. E. GEBLER, J. C. 2005. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Anal. Chem.* **77**, 6426 – 6434.

GOBOM, J. NORDHOFF, E. MIRGORODSKAYA, E. EKMAN, R. ROEPSTORFF, P. 1999. Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. **34** (2), 105–116. ISSN 1076-5174, 1096-9888. Dostupné z: [doi:10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199902\)34:2<105::AID-JMS768>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199902)34:2<105::AID-JMS768>3.0.CO;2-4)

GOEDERT, M. SPILLANTINI, M. G. 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science* (New York, N.Y.) [online]. **314** (5800), 777–781. ISSN 1095-9203. Dostupné z: [doi:10.1126/science.1132814](https://doi.org/10.1126/science.1132814)

GOLPICH, M. AMINI, E. HEMMATI, F. AHMADIANI, A. 2015. Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ ) signaling: Implications for Parkinson's disease. *Pharmacological Research* [online]. **97** (Supplement C), 16–26. ISSN 1043-6618. Dostupné z: [doi:10.1016/j.phrs.2015.03.010](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.03.010)

GONG, C.-X. K. IQBAL 2008. Hyperphosphorylation of Microtubule-Associated Protein Tau: A Promising Therapeutic Target for Alzheimer Disease. *Current medicinal chemistry*. **15** (23) 2321–2328. ISSN 0929-8673.

GONG, C.-X., F. LIU, I. GRUNDKE-IQBAL a K. IQBAL 2005. Post-translational modifications of Tau protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* (Vienna, Austria: 1996) [online]. **112** (6), 813–838. ISSN 0300-9564. Dostupné z: [doi:10.1007/s00702-004-0221-0](https://doi.org/10.1007/s00702-004-0221-0)

G. HOPFGARTNER, G. BOURGOGNE, E. 2003. Quantitative High-Throughput Analysis of Drugs in Biological Matrices by Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 22 195–214.

GRIMSRUD P. A., SWANEY D. L., WENGER C. D., BEAUCHENE N. A. 2010. Phosphoproteomics for the masses. *ACS Chemical Biology*, vol. 5, s. 105 – 119.

GUT, I. G. 2004. DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Human Mutation* [online]. **23** (5), 437–441. ISSN 1059-7794, 1098-1004. Dostupné z: [doi:10.1002/humu.20023](https://doi.org/10.1002/humu.20023)

HALADA, P. Metodické přístupy současné fosfoproteomové analýzy. *Chemické listy*. 2005, **99**, 922-929. ISSN 0009-2770.

HEMSTRÖM, P. IRGUM, K. 2006. Hydrophilic interaction chromatography. *J.Sep. Sci.* 29 , 1784 – 1821.

HANGER, D. P. BYERS, H. L. WRAY, S. LEUNG, K. Y. SAXTON, M. J. WARD, M. A. ANDERTON B. H. 2007. Novel Phosphorylation Sites in Tau from Alzheimer Brain Support a Role for Casein Kinase 1 in Disease Pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **282** (32) 23645–23654. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: [doi:10.1074/jbc.M703269200](https://doi.org/10.1074/jbc.M703269200)

HASEGAWA, M., R. JAKES, R. A. CROWTHER, V. M. LEE, Y. IHARA a M. GOEDERT, 1996. Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against Tau protein. *FEBS letters*. **384** (1) 25–30. ISSN 0014-5793.

HONG, S.K. WU, P. K. KARKHANIS, M. PARK, J. I. 2015. ERK1/2 can feedback-regulate cellular MEK1/2 levels. *Cellular signalling* [online]. **27** (10), 1939–1948. ISSN 0898-6568. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cellsig.2015.07.003](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.07.003)

HU, Q. NOLL, R. J. LI, H. MAKAROV, A. HARDMAN, M. GRAHAM COOKS, R. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. **40** (4), 430–443. ISSN 1076-5174, 1096-9888. Dostupné z: doi:[10.1002/jms.856](https://doi.org/10.1002/jms.856)

HUTTON, M., C. L. LENDON, P. RIZZU, M. BAKER, S. FROELICH, H. HOULDEN, S. PICKERING-BROWN, S. CHAKRAVERTY, A. ISAACS, A. GROVER, J. HACKETT, J. ADAMSON, S. LINCOLN, D. DICKSON, 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in Tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* [online]. **393** (6686), 702–705. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:[10.1038/31508](https://doi.org/10.1038/31508)

CHEN, L. GIORGIANNI, F. BERANOVA-GIORGIANNI, S. 2010 Characterization of the phosphoproteome in LNCaP prostate cancer cells by in-gel isoelectric focusing and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **9**, 174 – 178.

CHEN, R. D.CHENG, X. H. MITCHELL, D. H. HOFSTADLER, S. A. WU, Q. Y. ROSCKWOOD, L. A. 1995. Trapping, Detection, and Mass Determination of Coliphage T4 DNA Ions of 10<sup>8</sup> Da by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance *Mass Spectrometry. Anal. Chem.*, **67**: 1159–1163.

IVANOV, A., R. LAZAREV, A., V. Sample preparation in biological mass spectrometry. 2011. *Springer Science+Business Media*. Dostupné z DOI: [10.1007/94-007-0828-0\\_1](https://doi.org/10.1007/94-007-0828-0_1).

IQBAL, K. LIU, F. GONG, C. X. GRUNDKE-IQBAL, I. 2010. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer research.* **7** (8), 656–664. ISSN 1567-2050.

JENKINS, N. a CURLING. E. M, 1994. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**:354–64. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90149-X)

KIRSCHNER, L. S. YIN, Z. JONES, G.N.MAHONEYE. 2009. Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocrine-Related Cancer* [online]. **16** (3), 773–793. ISSN 1351-0088, 1479-6821. Dostupné z: doi:[10.1677/ERC-09-0068](https://doi.org/10.1677/ERC-09-0068)

KLEMM, C. OTTO, S. WOLF, C. HASELOFF, R. F. BEYERMANN M. KRAUSE, E. 2006. Evaluation of the titanium dioxide approach for MS analysis of phosphopeptides. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. **41** (12), 1623–1632. ISSN 10765174, 10969888. Dostupné z: doi:[10.1002/jms.1129](https://doi.org/10.1002/jms.1129)

KONDOH, K.NISHIDA, E. 2007. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1773** (8), Mitogen-Activated Protein Kinases: New Insights on Regulation, Function and Role in Human Disease, 1227–1237. ISSN 0167-4889. Dostupné z: doi:[10.1016/j.bbamcr.2006.12.002](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.12.002)

KUHLA, B. HAASE, C. FLACH, K. LÜTH, H. J. ARENDT, J. MÜNCHG. 2007. Effect of Pseudophosphorylation and Cross-linking by Lipid Peroxidation and Advanced Glycation End Product Precursors on Tau Aggregation and Filament Formation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **282** (10), 6984–6991. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:[10.1074/jbc.M609521200](https://doi.org/10.1074/jbc.M609521200)

KULKARNI, M. MAZARE, A.PARK, J. GONGADZE, E. KILLIAN, M. S. KRALJ,S. VON DER MARK, K. IGLIČ, A. SCHMUKI, P. 2016. Protein interactions with layers of TiO<sub>2</sub> nanotube and nanopore arrays: Morphology and surface charge influence. *Acta Biomaterialia* [online]. **45**, 357–366. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:[10.1016/j.actbio.2016.08.050](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.050)

KUPCIK, R,REHULKA, P. BILKOVA, Z. SOPHA H. MACAK, J. M. 2017. New Interface for Purification of Proteins: One-Dimensional TiO<sub>2</sub>Nanotubes Decorated by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. **9** (34) 28233–28242. ISSN 1944-8244, 1944-8252. Dostupné z: doi:[10.1021/acsami.7b08445](https://doi.org/10.1021/acsami.7b08445)

KWEON, H. K. HÅKANSSON, K. 2006. Selective Zirconium Dioxide-Based Enrichment of Phosphorylated Peptides for Mass Spectrometric Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. **78**(6), 1743–1749. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:[10.1021/ac0522355](https://doi.org/10.1021/ac0522355)

KYRIAKIS, J. M. 2014. In the Beginning, There Was Protein Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **289**(14), 9460–9462. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:[10.1074/jbc.R114.557926](https://doi.org/10.1074/jbc.R114.557926)

LARSEN, M. R. THINGHOLM, E. M. JENSEN, O. N. ROEPSTORFF, P. JØRGENSEN, T. J. D. 2005. Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. **4**(7), 873–886. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Dostupné z: doi:[10.1074/mcp.T500007-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.T500007-MCP200)

LEE, J. CHEN, H. LIU, T. BERKMAN C. E. REILLY, P. T. A. 2011. High Resolution Time-of-Flight Mass Analysis of the Entire Range of Intact Singly-Charged Proteins. *Analytical Chemistry* [online]. **83** (24), 9406–9412. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:[10.1021/ac202001z](https://doi.org/10.1021/ac202001z)

LEE, J. REILLY, P. T. A. 2011. Limitation of Time-of-Flight Resolution in the Ultra High Mass Range. *Analytical Chemistry* [online]. **83** (15), 5831–5833. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:[10.1021/ac201537b](https://doi.org/10.1021/ac201537b)

LI, Ming, Kequan GUO a Susumu IKEHARA 2014. Stem Cell Treatment for Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **15** (10), 19226–19238. Dostupné z: doi:[10.3390/ijms151019226](https://doi.org/10.3390/ijms151019226)

LI, Q. R. NING, Z. B. TANG, J. S. NIE, S. ZENG, R. 2009. Effect of Peptide-to-TiO<sub>2</sub> Beads Ratio on Phosphopeptide Enrichment Selectivity. *Journal of Proteome Research* [online]. **8** (11), 5375–5381. ISSN 1535-3893, 1535-3907. Dostupné z: doi:[10.1021/pr900659n](https://doi.org/10.1021/pr900659n)

LINDWALL, G. R. D. COLE, 1984. Phosphorylation affects the ability of Tau protein to promote microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry*. **259** (8), 5301–5305. ISSN 0021-9258, 1083-351X.

MACCARRONE, G. K. TEPLYTSKA, L. BIRG, I. ZOLLINGER, R. HOLSOBER. F. TURCK, C. W. 2006. Phospho-peptide enrichment by IEF. *Electrophoresis*. **27** , 4585 – 4595

MANNING, G., D. B. WHYTE, R. MARTINEZ, T. HUNTER a S. SUDARSANAM 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science(New York, N.Y.)* [online]. **298** (5600), 1912–1934. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:[10.1126/science.1075762](https://doi.org/10.1126/science.1075762)

MACAK, J. M. KHOUTEK, T. WANG, L. BERANEK, R. 2013. Fast and robust infiltration of functional material inside titania nanotube layers: case study of a chalcogenide glass sensitizer. *Nanoscale* [online]. **5** (20), 9541. ISSN 2040-3364 2040-3372. Dostupné z: doi:[10.1039/c3nr03014h](https://doi.org/10.1039/c3nr03014h)

MAKAROV, A. 2000. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. **72** (6), 1156–1162. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:[10.1021/ac991131p](https://doi.org/10.1021/ac991131p)

MAKAROV, A. SCIGELOVA, M. 2010. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **1217** (25), 3938–3945. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:[10.1016/j.chroma.2010.02.022](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.022)



- MATHIEU, M. E. 1868. Me'moire sur le mouvement vibratoire d'une membrane de forme elliptique. *J. Math. Pur. Appl.* 13: 137–203.
- MCLAFFERTY, F. W., VALASKOVIC, G. A., KELLEHER, N. L. 1996. Attomole Protein Characterization by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry. *Science, New Series*. **273**(5279), 1199–1202.
- MCLACHLAN, D. W. 1947. Theory and Applications of Mathieu Functions. *Clarendon Press, Oxford*.
- MORAVCOVÁ, D. KAHLE, V. ŘEHULKOVA, H., CHMELÍK, J. ŘEHULKA, P. 2009. Short monolithic columns for purification and fractionation of peptide samples for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry analysis in proteomics. *J. Chromatogr. A* 1216, 3629–3636.
- NÜHSE, T. S. STENSBALLE, A. JENSEN, O. N. PECK, S. C. 2003. Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*. 2 , 1234 – 1243.
- OWENS, D. M. a S. M. KEYSE 2007. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* [online]. **26** (22), 3203–3213. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:[10.1038/sj.onc.1210412](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210412)
- PEARSON, G, ROBINSON, F. BEERS GIBSON, T. XU, B. COBB, M. H. 2001. Mitogen-Activated Protein(MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* [online]. **22** (2), 153–183. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:[10.1210/edrv.22.2.0428](https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428)
- POORKAJ, P., T. D. BIRD, E. WIJSMAN, E. NEMENS, R. M. GARRUTO, L. ANDERSON, A. ANDREADIS, W. C. WIEDERHOLT, M. RASKIND a G. D. SCHELLENBERG, 1998. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of*

*Neurology* [online]. **43** (6), 815–825. ISSN 0364-5134. Dostupné z: [doi:10.1002/ana.410430617](https://doi.org/10.1002/ana.410430617)

PINKSE, M. W. H., UITTO, P. M. HILHORST, M. J. OOMS, B. HECK, A. J. R. 2004. Selective Isolation at the Femtomole Level of Phosphopeptides from Proteolytic Digests Using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and Titanium Oxide Precolumns. *Analytical Chemistry* [online]. **76**(14), 3935–3943. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: [doi:10.1021/ac0498617](https://doi.org/10.1021/ac0498617)

PRAMANIK, B., N. GANGULY, A., K. GROSS, M., L. 2002. Applied Electrospray Mass Spectrometry: Practical Spectroscopy Series Volume 32. *Marcel Dekker New York*. ISBN 9780824706180

QI, H, PRABAKARAN, S. CANTRELLE, F. X. CHAMBRAUD, B. GUNAWARDENA, J. IPPENS, G. LANDRIEU, I. 2016. Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **291** (14), 7742–7753. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: [doi:10.1074/jbc.M115.700914](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700914)

DEMARTINI, R. D. 2003. A Short Overview of the Components in Mass Spectrometry Instrumentation for Proteomics Analyses. In: Ana Varela COELHO, ed. *Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization* [online]. B.m.: InTech [vid. 2018-03-12]. ISBN 978-953-51-1136-8. Dostupné z: [doi:10.5772/54484](https://doi.org/10.5772/54484)

ROBERSON, E., D. SCEARCE-LEVIE, K. PALOP, J., J. YAN, F. CHENG, I., H. WU, T. GERSTEIN, H. YU, G., Q. MUCKE, L. Reducing endogenous Tau ameliorates amyloid  $\beta$ -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **2007**, 316, 750–754.

ROBINSON, M. J. COBB, M. H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. **9** (2), 180–186. ISSN 0955-0674. Dostupné z: [doi:10.1016/S0955-0674\(97\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80061-0)

ROSKOSKI, R. 2015. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research* [online]. **100**, 1–23. ISSN 1096-1186. Dostupné z: doi:[10.1016/j.phrs.2015.07.010](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.010)

ROUX, P. P. BLENIS, J. 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*[online]. **68** (2), 320–344. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:[10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004](https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004)

SARASWATI, A. P. HUSSAINI, A.S. M. KRISHNA, N. H. BABU, B. N. KAMAL, A. nedatováno. Glycogen synthase kinase-3 and its inhibitors: Potential target for various therapeutic conditions. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. [vid. 2018-01-04]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:[10.1016/j.ejmech.2017.11.103](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.103)

SARASWATI, SYED, A. M. A. HARI KRISHNA, H. BATHINI, N. B. KAMAL, A. 2017. Glycogen synthase kinase-3 and its inhibitors: Potential target for various therapeutic conditions. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **144**. Dostupné z: doi:[10.1016/j.ejmech.2017.11.103](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.103)

SCHNEIDER, A., J. BIERNAT, M. VON BERGEN, E. MANDELKOW a E.-M. MANDELKOW, 1999a. Phosphorylation that Detaches Tau Protein from Microtubules(Ser262, Ser214) Also Protects It against Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments. *Biochemistry* [online]. **38** (12), 3549–3558. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:[10.1021/bi981874p](https://doi.org/10.1021/bi981874p)

SCHNEIDER, A., J. BIERNAT, M. VON BERGEN, E. MANDELKOW a E.-M. MANDELKOW, 1999b. Phosphorylation that Detaches Tau Protein from Microtubules(Ser262, Ser214) Also Protects It against Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments. *Biochemistry* [online]. **38** (12), 3549–3558. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:[10.1021/bi981874p](https://doi.org/10.1021/bi981874p)

SHANE, M. W., E. T. FEDOSEJEVS a W. C. PLAXTON, 2013. Reciprocal Control of Anaplerotic Phosphoenolpyruvate Carboxylase by in Vivo Monoubiquitination and Phosphorylation in Developing Proteoid Roots of Phosphate-Deficient Harsh Hakea. *PLANT PHYSIOLOGY* [online]. **161**(4), 1634–1644. ISSN 0032-0889, 1532-2548. Dostupné z: doi:[10.1104/pp.112.213496](https://doi.org/10.1104/pp.112.213496)

SPILLANTINI, M. G., J. R. MURRELL, M. GOEDERT, M. R. FARLOW, A. KLUG a B. GHETTI, 1998. Mutation in the Tau gene in familial multiple system Tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95** (13), 7737–7741. ISSN 0027-8424.

SUGIYAMA, N. MASUDA, T. SHINODA, K. NAKAMURA, A. TOMITA, M. ISHIHAMA, Y. 2007. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Molecular & cellular proteomics*. **6** (6), 1103–1109.

SALOVSKA, B. TICHY, A. REZACOVA, M. VAVROVA, J. NOVOTNA, E. 2012. Enrichment strategies for phosphoproteomics: state-of-the-art. *Reviews in Analytical Chemistry* [online]. **31** (1) [vid. 2018-03-14]. ISSN 2191-0189, 0793-0135. Dostupné z: doi:[10.1515/revac-2011-0025](https://doi.org/10.1515/revac-2011-0025)

TANG, P. ZHOU, M. K. S. LI, C. J. LIAO, J. XIAO, J. WANG, Q. J. LIAN, G. Y. LAN, H. Y. 2018. The proto-oncogene tyrosine protein kinase Src is essential for macrophage-myofibroblast transition during renal scarring. *Kidney International* [online]. **93** (1), 173–187. ISSN 0085-2538. Dostupné z: doi:[10.1016/j.kint.2017.07.026](https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.07.026)

TAN, Y. J. SUI, D. WANG, W. H. KUO, M. H. REID, G. E. BRUENING, M. L. 2013. Phosphopeptide Enrichment with TiO<sub>2</sub>-Modified Membranes and Investigation of Tau Protein Phosphorylation. *Analytical Chemistry* [online]. **85**(12), 5699–5706. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:[10.1021/ac400198n](https://doi.org/10.1021/ac400198n)

TANL, K., T. SUMIZAWA, M. WATANABE, M. TACHIBANA, H. KOIZUMI a T. KIBA 2002. Evaluation of titania as an ion-exchanger and as a ligand-exchanger in HPLC. *Chromatographia*. **55** (1–2), 33–37.

TAYLOR, S. S. ILOUZ, R. ZHANG P. KORNEV, A. P. 2012 a. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature reviews. Molecular cell biology* [online]. **13** (10), 646–658. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:[10.1038/nrm3432](https://doi.org/10.1038/nrm3432)

TAYLOR, S. S. KESHWANI, M. M. STEICHEN, J. M. KORNEV, A. P. 2012b. Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **367** (1602) 2517–2528. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:[10.1098/rstb.2012.0054](https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0054)

TITO, M. A. TARS, K. VALEGARD, K. HAJDU, J. ROBINSOON, C. V. 2000. Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry of the Intact MS2 Virus Capsid. *J. Am. Chem. Soc.* **122**(2000): 3550–3551.

VISCONTI, P. E., G. D. MOORE, J. L. BAILEY, P. LECLERC, S. A. CONNORS, D. PAN, P. OLDS-CLARKE a G. S. KOPF, 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. **121** (4), 1139–1150. ISSN 0950-1991, 1477-9129.

WIESER, A. SCHNEIDER, L. JUNG, J. SCHUBERT, S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **93** (3), 965–974. ISSN 0175-7598, 1432-0614. Dostupné z: doi:[10.1007/s00253-011-3783-4](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4)

WANG, C. C. LAI, Y. H. OU, Y. M. CHANG H. T. WANG, Y. S. 2016. Critical factors determining the quantification capability of matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Phil. Trans. R. Soc. A* [online]. **374** (2079) 20150371. ISSN 1364-503X, 1471-2962. Dostupné z: doi:[10.1098/rsta.2015.0371](https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0371)

WIJERATNE, A. B. WIJESUNDERA, D. N. PAULOSE, M. AHIABU, I. B. CHU, W.K. VARGHESE, O. K. GREIS, K. D. 2015. Phosphopeptide Separation Using Radially Aligned Titania Nanotubes on Titanium Wire. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. **7**(21), 11155–11164. ISSN 1944-8244, 1944-8252. Dostupné z: doi:[10.1021/acsami.5b00799](https://doi.org/10.1021/acsami.5b00799)

XU Y. SPRUNG, R. KWON, S. W. KIM, S. C. ZHAO, Y. 2007. Isolation of phosphopeptides by pI-difference-based electrophoresis. *J. Proteome Res.* **6**, 1153 – 1157.

YAMASHITA, M. FENN, J.B. 1984. Electrospray Ion Source: Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* **88**: 4451–4459.

YANG, X. GABUZDA, D. 1999. Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity by the ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *Journal of Virology*. **73** (4), 3460–3466. ISSN 0022-538X, 1098-5514.

YATES, J. R. COCIORVA, D. ZABROUSKOV, V. 2006. Performance of a Linear Ion Trap-Orbitrap Hybrid for Peptide Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. **78** (2), 493–500. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:[10.1021/ac0514624](https://doi.org/10.1021/ac0514624)

YOSHIDA, H. GOEDERT, M. 2006. Sequential phosphorylation of Tau protein by cAMP-dependent protein kinase and SAPK4/p38 $\delta$  or JNK2 in the presence of heparin generates the AT100 epitope. *Journal of Neurochemistry* [online]. **99** (1), 154–164. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:[10.1111/j.1471-4159.2006.04052.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04052.x)

ZAREI, M. SPRENGER, A. METZGER, F. GRETZMEIER, C. DENGJEL, J. 2011. Comparison of ERLIC–TiO<sub>2</sub>, HILIC–TiO<sub>2</sub>, and SCX–TiO<sub>2</sub> for Global Phosphoproteomics Approaches. *Journal of Proteome Research* [online]. **10**(8), 3474–3483. ISSN 1535-3893, 1535-3907. Dostupné z: doi:[10.1021/pr200092z](https://doi.org/10.1021/pr200092z)

ZHANG, F. STRAND, A. ROBBINS, D. COBB, M. H. GOLDSMITH, E. J. 1994. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* [online]. **367** (6465), 704–711. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:[10.1038/367704a0](https://doi.org/10.1038/367704a0)

ZHANG, J., F. ZHANG, D. EBERT, M. H. COBB a E. J. GOLDSMITH,. Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure(London, England: 1993)*. **3** (3) 299–307. ISSN 0969-2126.

ZHENG, J., D. R. KNIGHTON, N. H. XUONG, S. S. TAYLOR, J. M. SOWADSKI a L. F. TEN EYCK, 1993. Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. **2** (10), 1559–1573. ISSN 0961-8368.

ZHOU, J. ADAMS, J. A. 1997. Participation of ADP Dissociation in the Rate-Determining Step in cAMP-Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* [online]. **36** (50), 15733–15738. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:[10.1021/bi971438n](https://doi.org/10.1021/bi971438n)

ZUBAREV, R. A. 2004. Electron-Capture Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Curr. Op. Biotechnol.* **15**: 12–16.

Webové zdroje:

1: Enrichment method for Posttranslational modification (Phosphorylation). Izumi Kishiyama, GLSciences. [cit. 10.4.2018]. Dostupné z <http://www.glsciencesinc.com/ProductInfo/Proteomics/Documents/Phos-TiO/GL%20TiO%20Structure%20and%20Benefits.pdf>



## 6 Přílohy

**Tabulka 11:** Přehled prakticky identifikovaných fosfopeptidů z proteinů:  $\alpha$ -kasein S1,  $\alpha$ -kasein S2 a  $\beta$ -kasein

protein	m/z	Larsen 2005	Modifikace	vynechaná štěpná místa	začátek	konec
$\alpha$ S2 kasein	1331.536	1331.530	1P	0	141	151
$\alpha$ S2 kasein	1411.503	1411.500	2P	0	141	151
$\alpha$ S2 kasein	1459.631		1P	1	141	151
$\alpha$ S2 kasein	1466.612	1466.610	1P	0	152	164
$\alpha$ S2 kasein	1482.610		1O 1P	1	152	164
$\alpha$ S2 kasein	1539.598		2P	1	141	152
$\alpha$ S2 kasein	1594.707	1594.700	1P	1	152	164
$\alpha$ S1 kasein	1660.794	1660.790	1P	0	121	134
$\alpha$ S2 kasein	1610.706		1O 1P	1	152	164
$\alpha$ S2 kasein	1722.802		1P	2	152	165
$\alpha$ S2 kasein	1823.850		1P	2	152	165
$\alpha$ S1 kasein		1832.830	1P	-	-	-
$\alpha$ S1 kasein	1847.725	1847.690	1P	0	58	73
$\alpha$ S1 kasein	1927.692	1927.690	2P	0	58	73
$\alpha$ S1 kasein	1943.695		1O 2P	0	58	73
$\alpha$ S1 kasein	1951.945		1P	3	119	134
$\alpha$ S1 kasein	1951.953	1951.950	1P	1	119	134
$\alpha$ S1 kasein	2007.668		3P		58	73
$\beta$ kasein	2061.829	2061.830	1P	0	48	63
$\alpha$ S1 kasein	2080.047		1P	2	118	134
$\alpha$ S1 kasein	2257.105		1P	1	121	139
$\beta$ kasein		2352.850	4P	-	-	-
$\beta$ kasein	2432.050		1P	1	45	63
$\alpha$ S1 kasein	2518.090		1P	1	52	73
$\alpha$ S1 kasein	2598.057		2P	1	52	73
$\alpha$ S2 kasein	2618.905	2619.040	4P	0	17	36
$\alpha$ S1 kasein	2623.920		1Q->p-E 4P	0	74	94
$\alpha$ S1 kasein	2678.023	2678.010	3P	1	52	73
$\alpha$ S1 kasein	2703.886		1Q->p-E 5P		74	94
$\alpha$ S2 kasein	2716.259		2P	2	130	152
$\alpha$ S1 kasein	2719.881		1Q->p-E 1O 5P	0	74	94
$\alpha$ S1 kasein	2720.973	2720.910	5P	0	74	94
$\alpha$ S1 kasein	2736.908		1O 5P		74	94
$\alpha$ S2 kasein		2747.100	4P	-	-	-
$\alpha$ S1 kasein	2935.161	2935.160	3P	2	50	73
$\beta$ kasein	2966.165	2966.160	4P	0	17	40

$\alpha$ S2 kasein	2987.192		3P	2	141	164
$\alpha$ S2 kasein	3008.030	3008.010	4P	0	61	85
$\alpha$ S2 kasein	3087.996	3087.990	5P	0	61	85
$\beta$ kasein	3122.266	3122.270	4P	1	-	-
$\alpha$ S2 kasein		3132.20	4P	-	-	-

Tabulka 11 byla vytvořena na základě prakticky identifikovaných fosfopeptidů v průběhu experimentální činnosti při této práci, v porovnání s databází Swiss Prot 17.11.01 a výsledků z LC-MS v práci Larsen, 2005.

**Tabulka 12:** ACAS S1 teoretické varianty fosfopeptidů po naštěpení trypsinem

m/z	Modifikace	Vynechaná štěpná místa	Začátek	Konec
828.34	1P	0	209	214
844.33	1O 1P	0	209	214
908.30	2P	0	209	214
911.35	1P	0	99	105
924.30	1O 2P	0	209	214
1026.49	1P	1	50	57
1347.67	1P	0	106	115
1417.65	1P	1	95	105
1427.64	2P	0	106	115
1586.75	1P	1	135	147
1588.85	1P	1	106	117
1602.75	1O 1P	1	135	147
1660.79	1P	0	121	134
1668.82	2P	1	106	117
1716.94	1P	2	106	118
1774.04	1P	0	3	18
1796.91	2P	2	106	118
1847.73	1P	0	58	73
1863.72	1O 1P	0	58	73
1927.69	2P	0	58	73
1943.69	1O 2P	0	58	73
1951.95	1P	1	119	134
2007.66	3P	0	58	73
2023.65	1O 3P	0	58	73
2031.92	2P	1	119	134
2033.18	1P	1	1	18

2049.17	1O 1P	1	1	18
2080.05	1P	2	118	134
2160.01	2P	2	118	134
2160.04	1P	1	99	115
2240.00	2P	1	99	115
2249.33	1P	1	3	22
2257.10	1P	1	121	139
2273.10	1O 1P	1	121	139
2319.97	3P	1	99	115
2337.07	2P	1	121	139
2353.07	1O 2P	1	121	139
2392.20	1P	2	38	57
2396.10	1P	0	148	166
2400.02	1Q->p-E 1O 1P	0	74	94
2401.05	1P	0	74	94
2401.22	1P	2	99	117
2412.10	1O 1P	0	148	166
2417.04	1O 1P	0	74	94
2476.07	2P	0	148	166
2479.98	1Q->p-E 1O 2P	0	74	94
2481.01	2P	0	74	94
2481.18	2P	2	99	117
2492.06	1O 2P	0	148	166
2497.01	1O 2P	0	74	94
2508.47	1P	2	1	22
2518.09	1P	1	52	73
2524.46	1O 1P	2	1	22
2534.09	1O 1P	1	52	73
2548.26	1P	2	119	139
2559.95	1Q->p-E 1O 3P	0	74	94
2560.98	3P	0	74	94
2561.15	3P	2	99	117
2564.26	1O 1P	2	119	139
2576.98	1O 3P	0	74	94
2598.06	2P	1	52	73
2614.05	1O 2P	1	52	73
2628.23	2P	2	119	139
2639.92	1Q->p-E 1O 4P	0	74	94
2640.95	4P	0	74	94

2644.22	1O 2P	2	119	139
2656.94	1O 4P	0	74	94
2666.33	1P	2	95	115
2678.02	3P	1	52	73
2694.02	1O 3P	1	52	73
2708.20	3P	2	119	139
2719.88	1Q->p-E 1O 5P	0	74	94
2720.91	5P	0	74	94
2724.19	1O 3P	2	119	139
2736.91	1O 5P	0	74	94
2746.30	2P	2	95	115
2757.99	4P	1	52	73
2773.98	1O 4P	1	52	73
2775.23	1P	2	50	73
2791.22	1O 1P	2	50	73
2826.27	3P	2	95	115
2855.19	2P	2	50	73
2871.19	1O 2P	2	50	73
2906.31	1Q->p-E 1O 1P	1	74	98
2907.34	1P	1	74	98
2923.34	1O 1P	1	74	98
2935.16	3P	2	50	73
2951.16	1O 3P	2	50	73
2986.28	1Q->p-E 1O 2P	1	74	98
2987.31	2P	1	74	98
3003.31	1O 2P	1	74	98
3015.13	4P	2	50	73
3031.12	1O 4P	2	50	73
3066.25	1Q->p-E 1O 3P	1	74	98
3067.28	3P	1	74	98
3083.27	1O 3P	1	74	98
3146.21	1Q->p-E 1O 4P	1	74	98
3147.24	4P	1	74	98
3148.56	1P	2	121	147
3163.24	1O 4P	1	74	98
3164.56	1O 1P	2	121	147
3226.18	1Q->p-E 1O 5P	1	74	98
3227.21	5P	1	74	98
3228.53	2P	2	121	147

3243.20	1O 5P	1	74	98
3244.52	1O 2P	2	121	147
3287.56	1P	1	140	166
3323.5402	1P	2	85	111
3339.5351	1O 1P	2	85	111
3370.3759	4P	2	36	63
3375.547	1P	2	20	46
3403.5066	2P	2	85	111
3419.5015	1O 2P	2	85	111
3450.3422	5P	2	36	63
3455.5134	2P	2	20	46
3483.4729	3P	2	85	111
3495.9438	1P	2	229	260
3499.4678	1O 3P	2	85	111
3535.4797	3P	2	20	46
3575.9101	2P	2	229	260
3615.446	4P	2	20	46
3632.8248	1P	2	51	82
3651.7744	1P	1	3	33
3655.8764	3P	2	229	260
3712.7911	2P	2	51	82
3731.7407	2P	1	3	33
3792.7574	3P	2	51	82
3811.7071	3P	1	3	33
3825.8735	1P	2	69	100
3872.7238	4P	2	51	82
3878.9378	1P	2	3	35
3891.6734	4P	1	3	33
3905.8398	2P	2	69	100
3910.9099	1P	2	1	33
3926.9048	1O 1P	2	1	33
3952.6901	5P	2	51	82
3958.9041	2P	2	3	35
3971.6397	5P	1	3	33
3985.8062	3P	2	69	100
3990.8762	2P	2	1	33

Tabulka byla vytvořena na základě porovnání s databází Swiss Prot 17.11.01.

**Tabulka 13:** ACAS S2 teoretické varianty fosfopeptidů po naštěpení trypsinem

m/z	Modifikace	Vynechaná štěpná místa	Začátek	Konec
826.913	1P	0	215	220
828.793	1P	0	168	173
955.02	1P	0	40	47
971.02	1O 1P	0	40	47
983.999	1P	0	197	203
1003.05	1P	1	182	188
1056.19	1P	1	213	220
1058.07	1P	1	166	173
1060.18	1P	0	189	196
1063.98	2P	0	197	203
1083.03	2P	1	182	188
1099.09	1P	1	168	175
1103.25	1P	1	215	222
1125.21	1P	0	48	56
1131.22	1P	2	181	188
1136.17	2P	1	213	220
1138.05	2P	1	166	173
1183.23	2P	1	215	222
1186.25	1P	2	165	173
1205.19	2P	0	48	56
1211.2	2P	2	181	188
1259.43	1Q->pE 1O	1	37	47
1266.23	2P	2	165	173
1276.38	1P	0	130	140
1327.38	1P	1	86	95
1327.52	1P	2	176	185
1328.37	1P	2	166	175
1332.26	1P	0	141	151
1339.41	1Q->pE 1O 1P	1	37	47
1340.44	1P	1	37	47
1356.44	1O 1P	1	37	47
1356.36	2P	0	130	140
1407.36	2P	1	86	95
1408.35	2P	2	166	175
1408.65	1P	1	204	214
1412.24	2P	0	141	151
1424.65	1O 1P	1	204	214
1432.57	1P	1	129	140
1448.52	1P	0	96	106
1460.44	1P	1	141	152

1467.54	1P	0	153	164
1479.67	1P	1	186	196
1483.54	1O 1P	0	153	164
1492.22	3P	0	141	151
1492.49	3P	2	213	222
1512.55	2P	1	129	140
1540.42	2P	1	141	152
1547.52	2P	0	153	164
1559.65	2P	1	186	196
1563.52	1O 2P	0	153	164
1572.2	4P	0	141	151
1595.71	1P	1	152	164
1595.71	1P	1	153	165
1608.78	1P	1	48	60
1611.71	1O 1P	1	152	164
1611.71	1O 1P	1	153	165
1620.4	3P	1	141	152
1627.5	3P	0	153	164
1637.97	1P	0	3	16
1643.5	1O 3P	0	153	164
1675.69	2P	1	152	164
1675.69	2P	1	153	165
1688.76	2P	1	48	60
1691.69	1O 2P	1	152	164
1691.69	1O 2P	1	153	165
1700.38	4P	1	141	152
1714.86	1P	2	168	180
1723.48	1O 4P	0	153	164
1723.89	1P	2	152	165
1739.89	1O 1P	2	152	165
1755.67	3P	1	152	164
1755.67	3P	1	153	165
1771.67	1O 3P	1	152	164
1771.67	1O 3P	1	153	165
1803.87	2P	2	152	165
1819.87	1O 2P	2	152	165
1824.99	1P	2	153	167
1840.99	1O 1P	2	153	167
1851.65	1O 4P	1	152	164
1851.65	1O 4P	1	153	165
1883.85	3P	2	152	165
1897.35	1P	1	1	16
1899.85	1O 3P	2	152	165

1904.97	2P	2	153	167
1913.35	1O 1P	1	1	16
1920.97	1O 2P	2	153	167
1945.18	1P	1	189	203
1964.23	1P	2	182	196
1979.83	1O 4P	2	152	165
1981.23	1P	1	40	56
1984.95	3P	2	153	167
1997.23	1O 1P	1	40	56
2000.95	1O 3P	2	153	167
2005.15	1P	1	92	106
2025.16	2P	1	189	203
2044.21	2P	2	182	196
2061.21	2P	1	40	56
2064.37	1P	1	197	212
2064.93	4P	2	153	167
2077.21	1O 2P	1	40	56
2080.37	1O 1P	1	197	212
2080.93	1O 4P	2	153	167
2085.13	2P	1	92	106
2105.14	3P	1	189	203
2124.19	3P	2	182	196
2136.56	1P	2	204	220
2141.19	3P	1	40	56
2144.35	2P	1	197	212
2152.56	1O 1P	2	204	220
2157.19	1O 3P	1	40	56
2160.35	1O 2P	1	197	212
2160.91	1O 5P	2	153	167
2216.54	2P	2	204	220
2232.54	1O 2P	2	204	220
2285.64	1Q->pE 1O	2	37	56
2293.65	1P	2	197	214
2309.65	1O 1P	2	197	214
2364.66	1P	2	186	203
2365.62	1Q->pE 1O 1P	2	37	56
2366.65	1P	2	37	56
2373.63	2P	2	197	214
2380.45	1P	0	17	36
2382.65	1O 1P	2	37	56
2389.63	1O 2P	2	197	214
2396.45	1O 1P	0	17	36
2444.64	2P	2	186	203



2445.6	1Q->pE 1O 2P	2	37	56
2446.63	2P	2	37	56
2460.43	2P	0	17	36
2462.63	1O 2P	2	37	56
2464.8	1P	2	40	60
2469.61	1O 3P	2	197	214
2476.43	1O 2P	0	17	36
2480.8	1O 1P	2	40	60
2509.64	1P	1	130	151
2524.62	3P	2	186	203
2525.58	1Q->pE 1O 3P	2	37	56
2526.61	3P	2	37	56
2540.41	3P	0	17	36
2542.61	1O 3P	2	37	56
2544.78	2P	2	40	60
2556.41	1O 3P	0	17	36
2560.78	1O 2P	2	40	60
2589.62	2P	1	130	151
2604.6	4P	2	186	203
2620.39	4P	0	17	36
2624.76	3P	2	40	60
2636.39	1O 4P	0	17	36
2637.82	1P	2	130	152
2640.76	1O 3P	2	40	60
2665.83	1P	2	129	151
2669.6	3P	1	130	151
2676.9	1P	2	86	106
2700.37	5P	0	17	36
2716.37	1O 5P	0	17	36
2717.8	2P	2	130	152
2745.81	2P	2	129	151
2749.58	4P	1	130	151
2756.88	2P	2	86	106
2765.88	1P	1	17	39
2769.71	1P	0	61	85
2780.35	6P	0	17	36
2781.88	1O 1P	1	17	39
2791.14	1P	0	107	128
2796.35	1O 6P	0	17	36
2797.78	3P	2	130	152
2825.79	3P	2	129	151
2828.97	1P	2	141	164
2829.56	5P	1	130	151

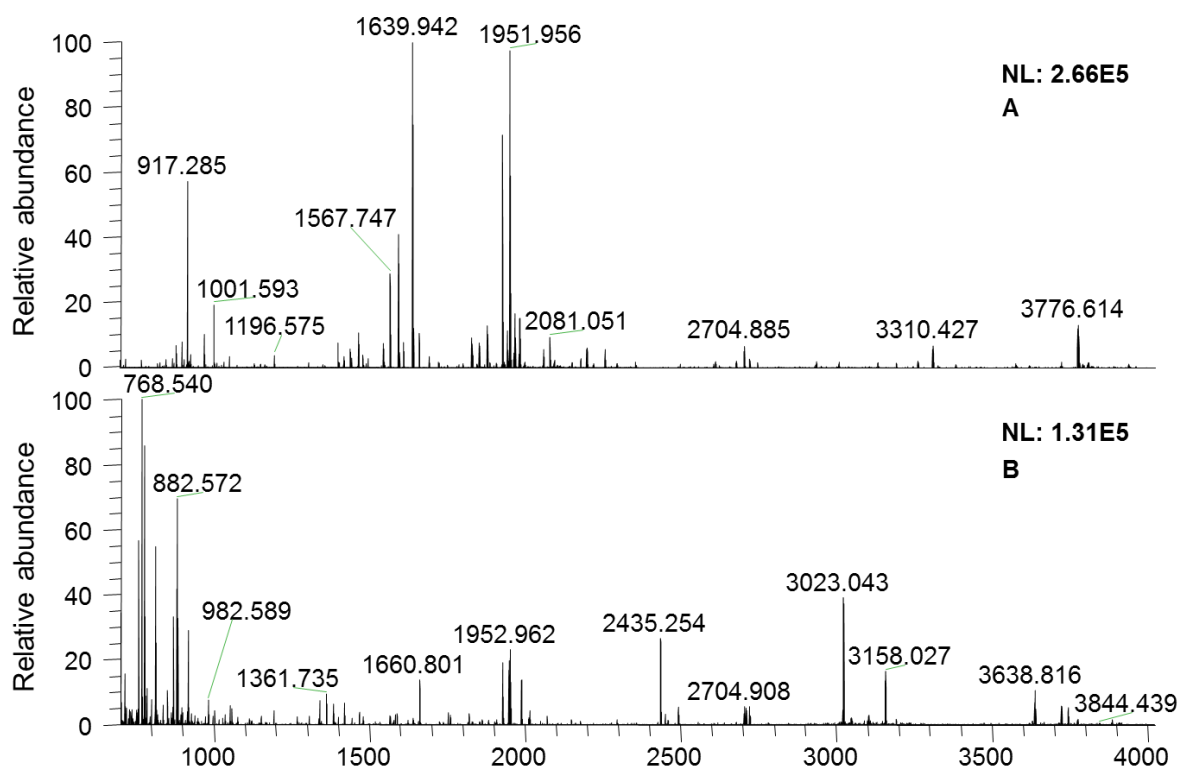
2836.86	3P	2	86	106
2844.97	1O 1P	2	141	164
2845.86	2P	1	17	39
2849.69	2P	0	61	85
2860.33	7P	0	17	36
2861.86	1O 2P	1	17	39
2871.12	2P	0	107	128
2876.33	1O 7P	0	17	36
2877.76	4P	2	130	152
2905.77	4P	2	129	151
2908.95	2P	2	141	164
2909.54	6P	1	130	151
2924.95	1O 2P	2	141	164
2925.84	3P	1	17	39
2929.67	3P	0	61	85
2941.84	1O 3P	1	17	39
2947.32	1P	1	107	129
2951.09	3P	0	107	128
2956.31	1O 8P	0	17	36
2957.74	5P	2	130	152
2985.75	5P	2	129	151
2988.93	3P	2	141	164
3004.93	1O 3P	2	141	164
3005.82	4P	1	17	39
3009.65	4P	0	61	85
3021.82	1O 4P	1	17	39
3025.55	1P	2	189	212
3027.3	2P	1	107	129
3037.72	6P	2	130	152
3041.55	1O 1P	2	189	212
3065.73	6P	2	129	151
3068.91	4P	2	141	164
3084.91	1O 4P	2	141	164
3085.8	5P	1	17	39
3089.63	5P	0	61	85
3101.8	1O 5P	1	17	39
3105.53	2P	2	189	212
3107.28	3P	1	107	129
3121.53	1O 2P	2	189	212
3148.89	5P	2	141	164
3164.89	1O 5P	2	141	164
3165.78	6P	1	17	39
3169.61	6P	0	61	85

3181.78	1O 6P	1	17	39
3185.51	3P	2	189	212
3201.51	1O 3P	2	189	212
3244.87	1O 6P	2	141	164
3245.76	7P	1	17	39
3249.59	7P	0	61	85
3253.28	1P	1	57	85
3261.76	1O 7P	1	17	39
3325.6	1P	2	85	111
3341.6	1O 1P	2	85	111
3372.31	4P	2	36	63
3377.61	1P	2	20	46
3405.58	2P	2	85	111
3421.58	1O 2P	2	85	111
3452.29	5P	2	36	63
3457.59	2P	2	20	46
3485.56	3P	2	85	111
3498.06	1P	2	229	260
3501.56	1O 3P	2	85	111
3537.57	3P	2	20	46
3578.04	2P	2	229	260
3617.55	4P	2	20	46
3635.03	1P	2	51	82
3654.02	1P	1	3	33
3658.02	3P	2	229	260
3715.01	2P	2	51	82
3733.98	2P	1	3	33
3794.99	3P	2	51	82
3813.96	3P	1	3	33
3828.19	1P	2	69	100
3874.97	4P	2	51	82
3881.31	1P	2	3	35
3893.94	4P	1	3	33
3908.17	2P	2	69	100
3913.37	1P	2	1	33
3929.37	1O 1P	2	1	33
3954.95	5P	2	51	82
3961.29	2P	2	3	35
3973.92	5P	1	3	33
3988.15	3P	2	69	100
3993.35	2P	2	1	33

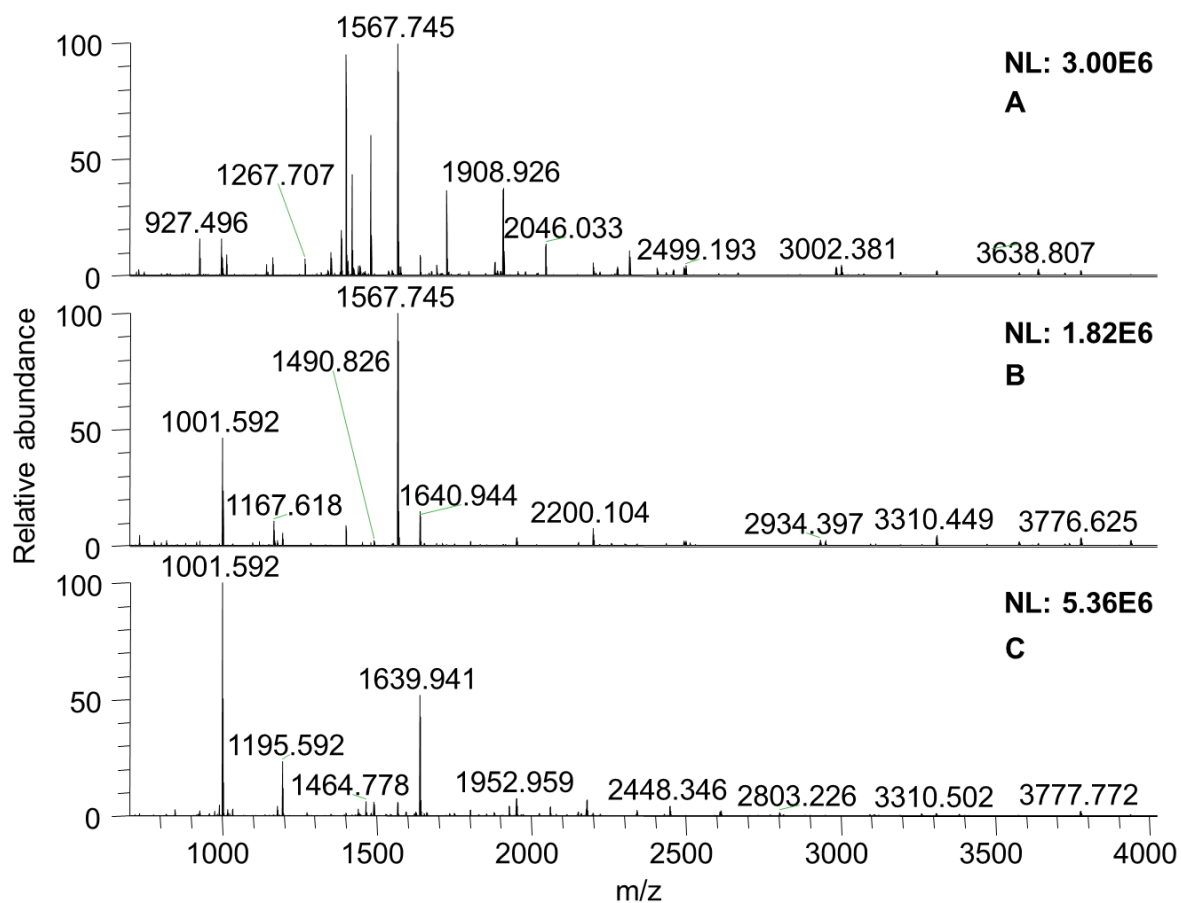
**Tabulka 14:** Beta kasein teoretické varianty fosfopeptidů po naštěpení trypsinem

m/z	Modifikace	Vynechaná štěpná místa	Začátek	Konec
830.452		0	192	198
910.418	1P	0	192	198
1671.9	1P	1	185	198
2061.83	1P	0	48	63
2141.79	2P	0	48	63
2266.13	1P	0	199	217
2282.13	1O 1P	0	199	217
2432.05	1P	1	45	63
2512.02	2P	1	45	63
2560.15	1P	2	44	63
2640.11	2P	2	44	63
2726.27	1P	0	17	40
2806.23	2P	0	17	40
2886.2	3P	0	17	40
2966.16	4P	0	17	40
2989.57	1P	1	199	224
3005.56	1O 1P	1	199	224
3046.13	5P	0	17	40
3077.57	1P	1	192	217
3081.49	1P	1	17	43
3093.56	1O 1P	1	192	217
3126.1	6P	0	17	40
3161.45	2P	1	17	43
3173.53	1O 2P	1	192	217
3209.58	1P	2	17	44
3241.42	3P	1	17	43
3289.55	2P	2	17	44
3323.54	1P	2	85	111
3339.54	1O 1P	2	85	111
3370.38	4P	2	36	63
3375.55	1P	2	20	46
3403.51	2P	2	85	111
3419.5	1O 2P	2	85	111
3450.34	5P	2	36	63
3455.51	2P	2	20	46
3483.47	3P	2	85	111
3495.94	1P	2	229	260
3499.47	1O 3P	2	85	111
3535.48	3P	2	20	46

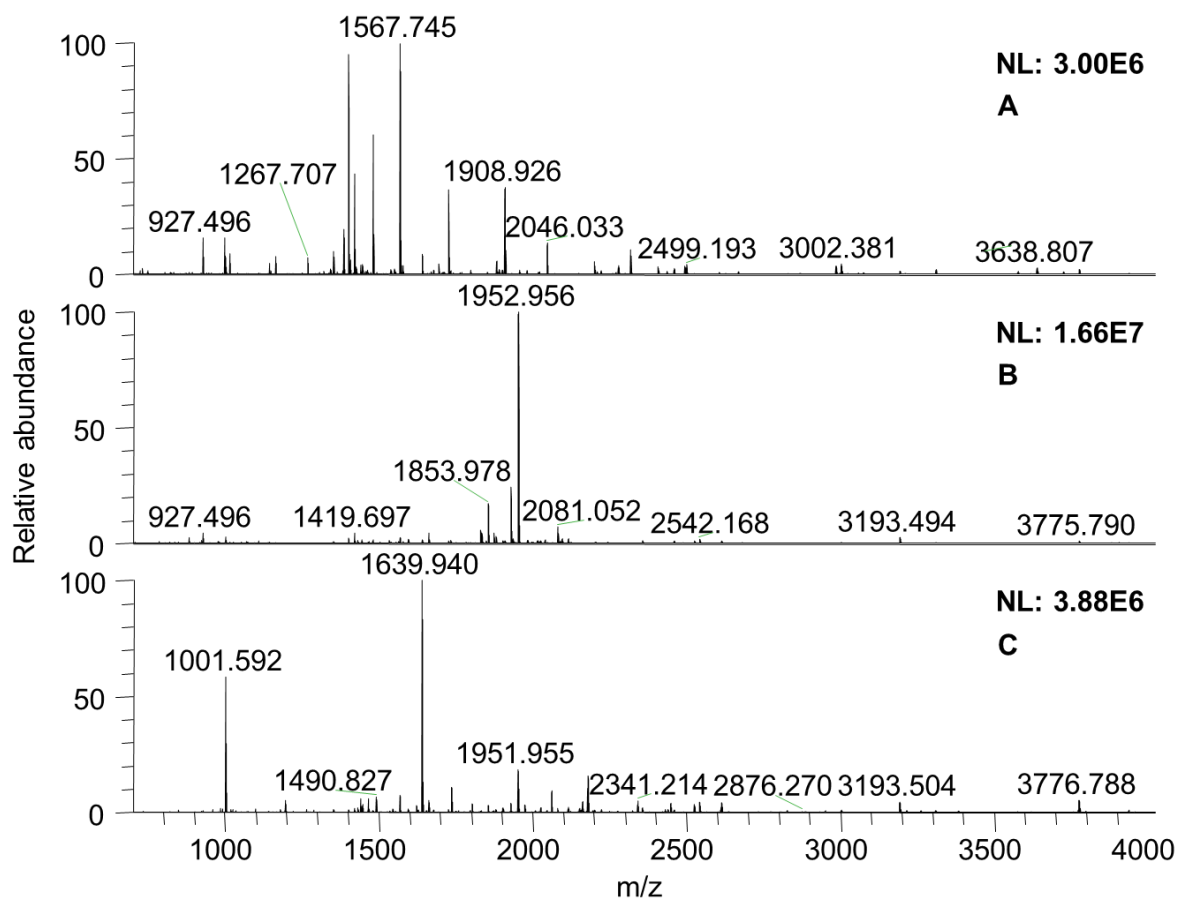
3575.91	2P	2	229	260
3615.45	4P	2	20	46
3632.82	1P	2	51	82
3651.77	1P	1	3	33
3655.88	3P	2	229	260
3712.79	2P	2	51	82
3731.74	2P	1	3	33
3792.76	3P	2	51	82
3811.71	3P	1	3	33
3825.87	1P	2	69	100
3872.72	4P	2	51	82
3878.94	1P	2	3	35
3891.67	4P	1	3	33
3905.84	2P	2	69	100
3910.91	1P	2	1	33
3926.9	1O 1P	2	1	33
3952.69	5P	2	51	82
3958.9	2P	2	3	35
3971.64	5P	1	3	33
3985.81	3P	2	69	100
3990.88	2P	2	1	33



**Obrázek 24:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:30 $\mu$ mol po obohacení na nosiči TiS; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: eluce 2; B eluce 2 s použitím (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

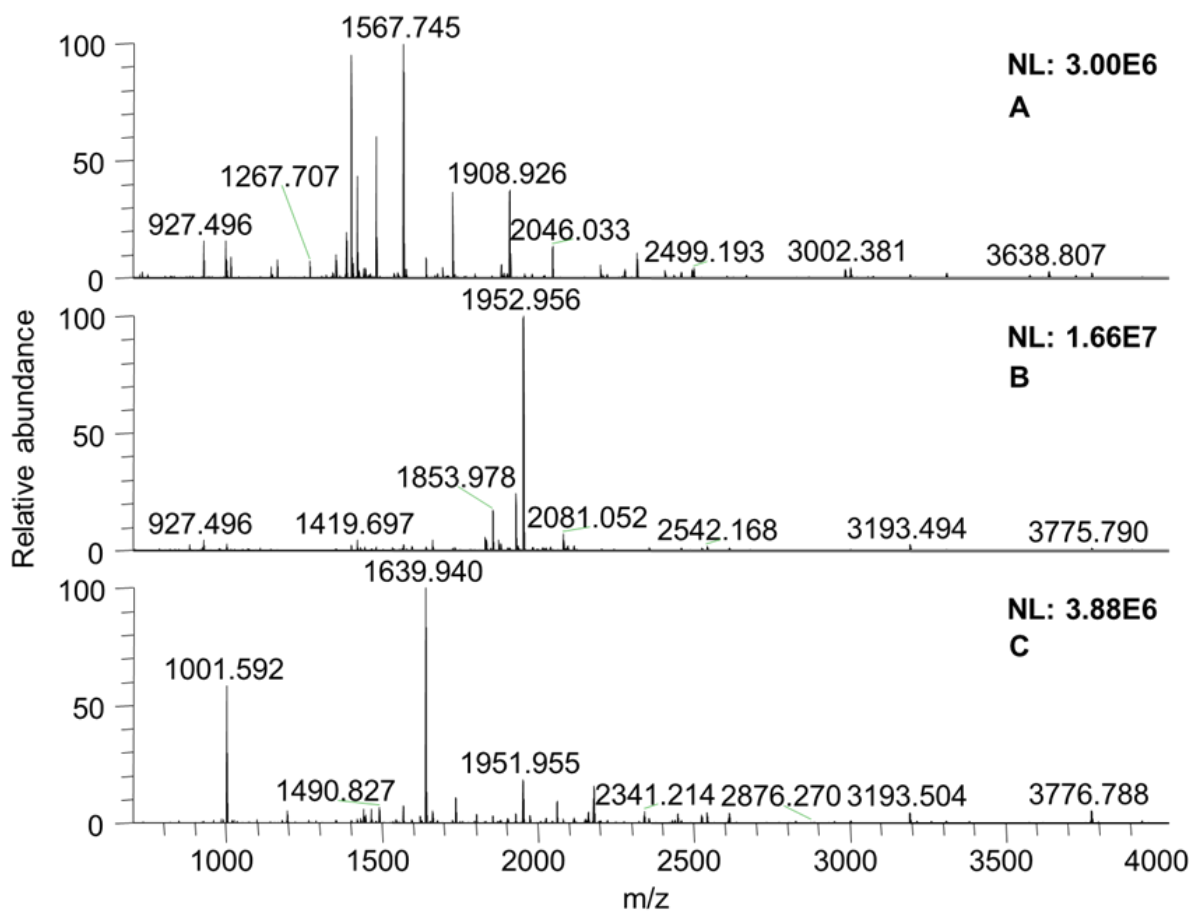


**Obrázek 25:** Spektrum směsi BSA:ACAS 3000:30 pmol po obohacení na nosiči TiS; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2

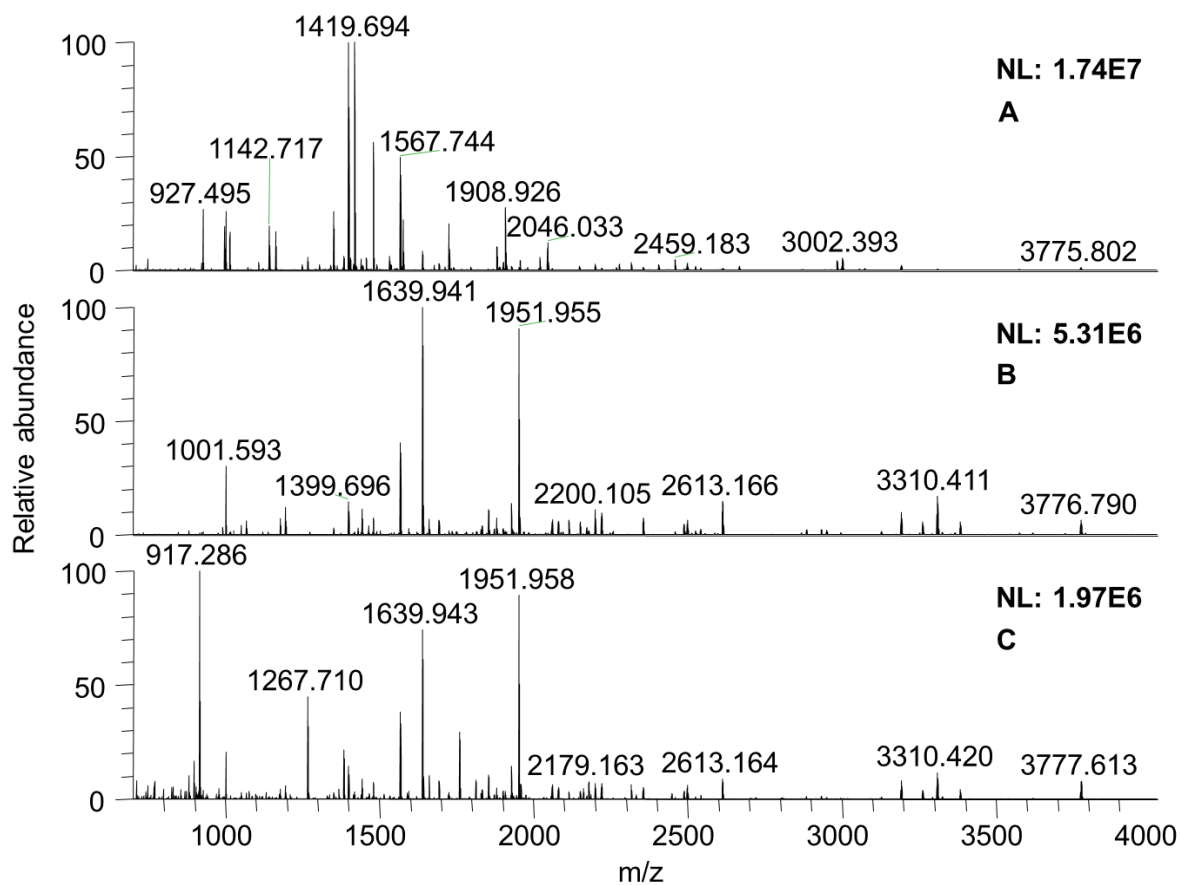


**Obrázek 26:** Spektrum směsi BSA:ACAS 3000:30 pmol po obohacení na nosiči TNT; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2

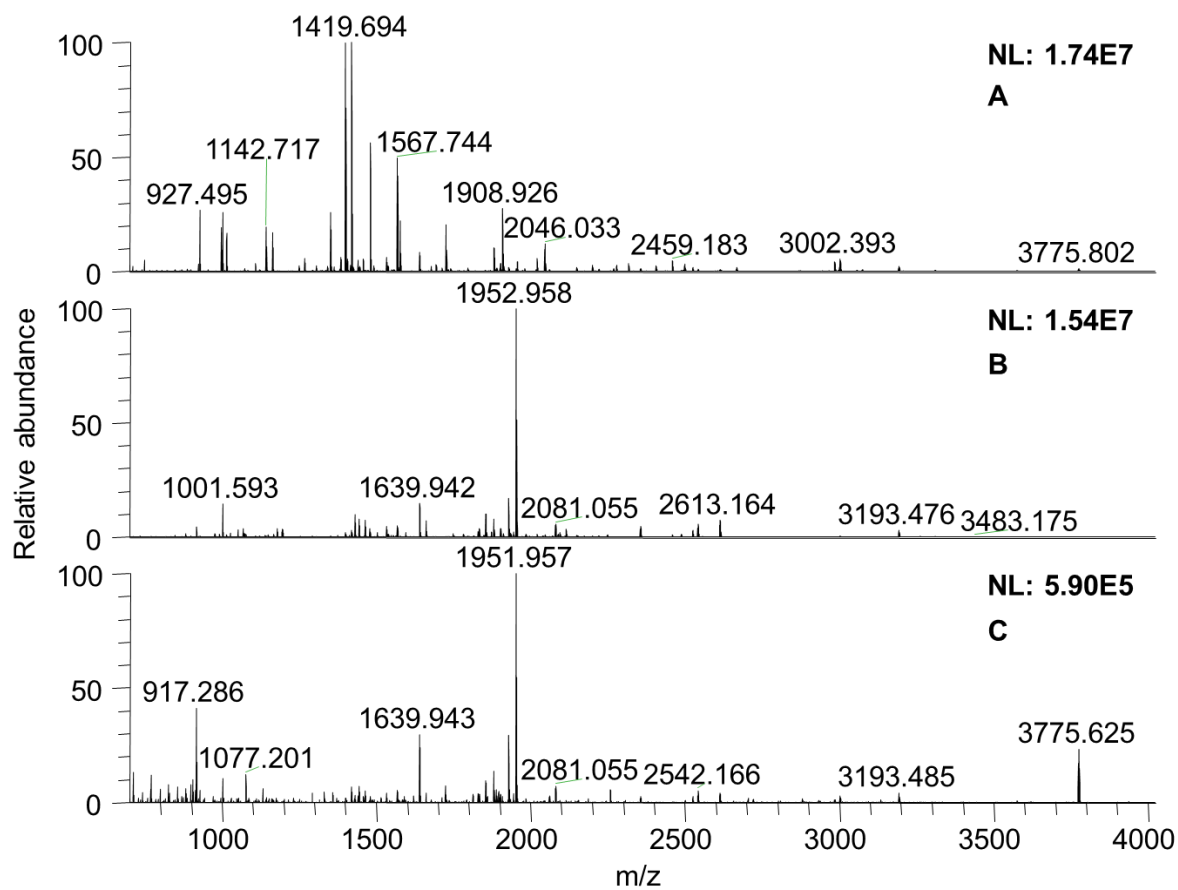




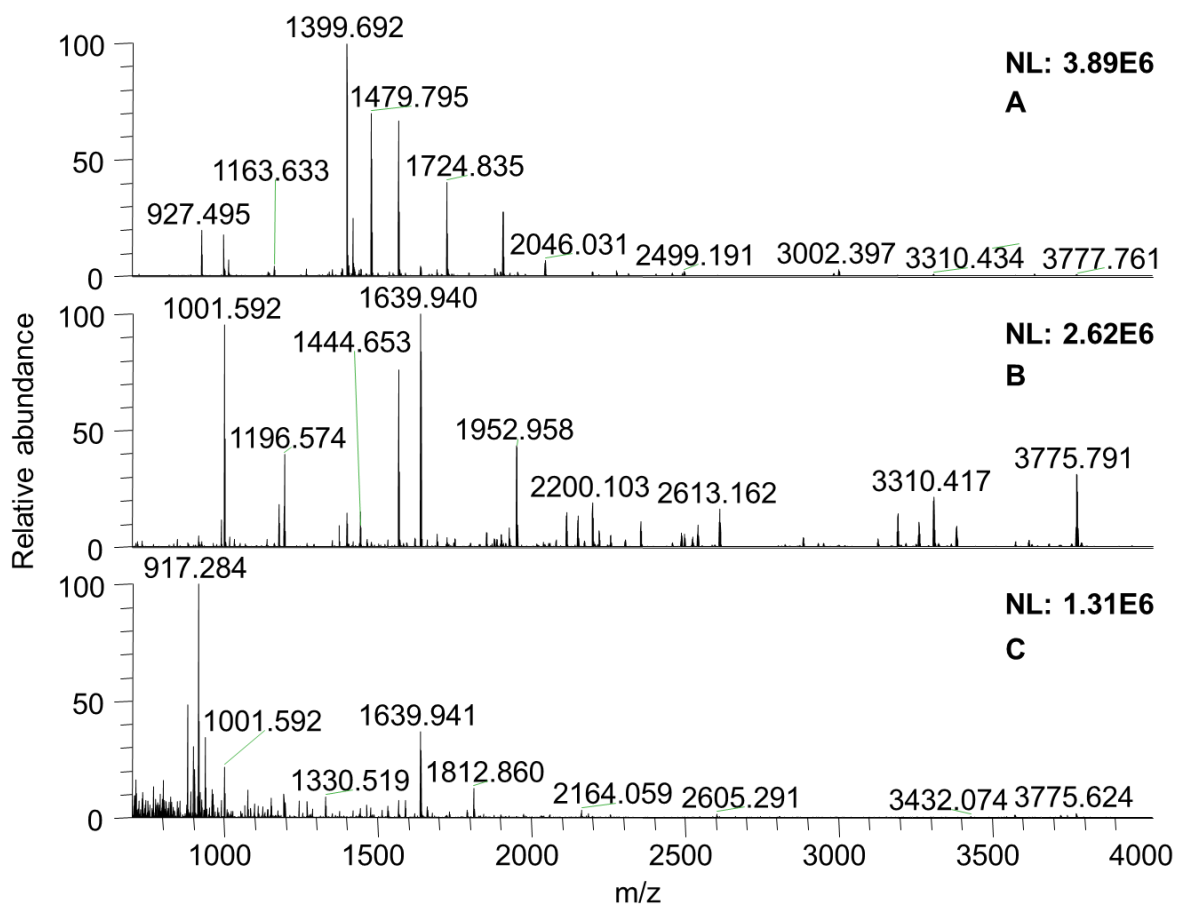
**Obrázek 27:** Spektrum směsi BSA:ACAS 3000:30 pmol po obohacení na nosiči NP; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2



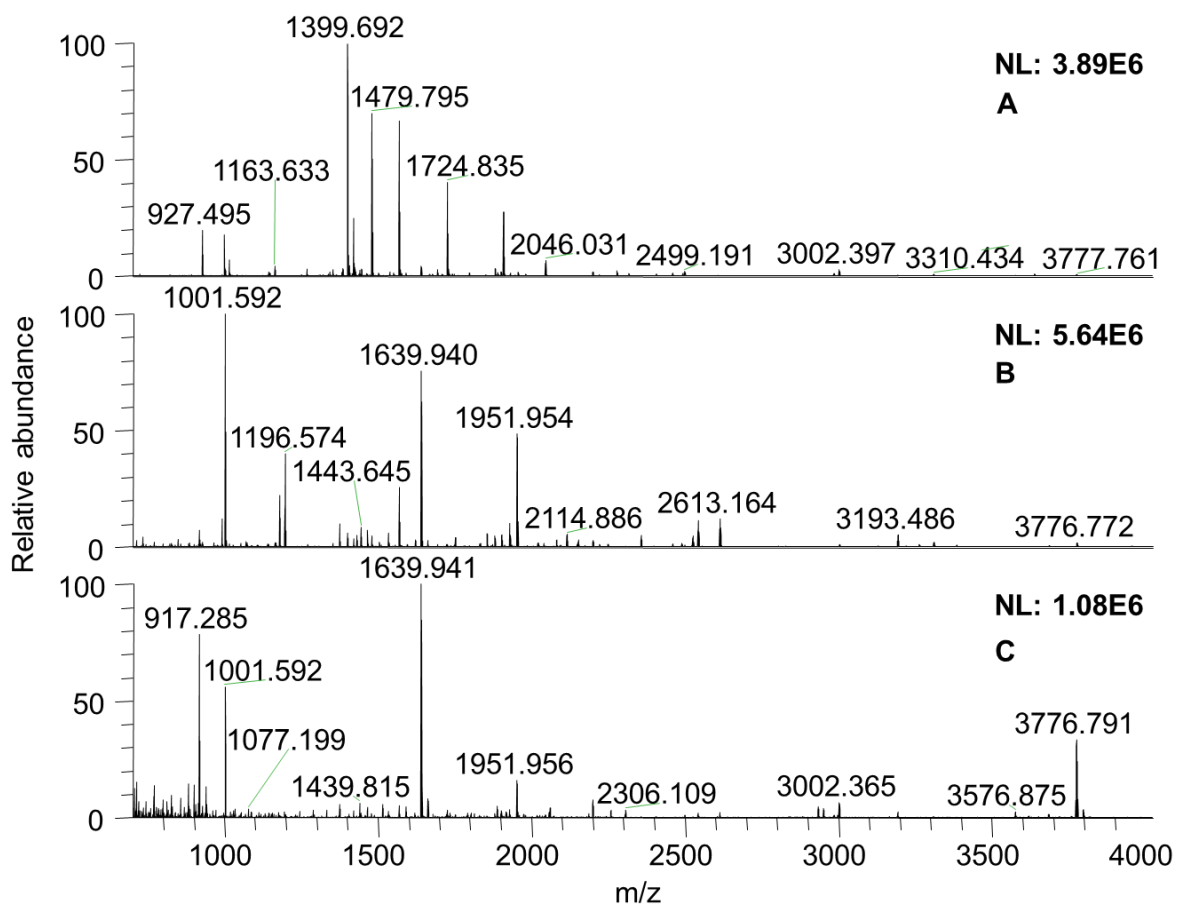
**Obrázek 28:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:5 pmol po obohacení na nosiči TiS; 700-4000; matrice DHB s  $H_3PO_4$ , A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2



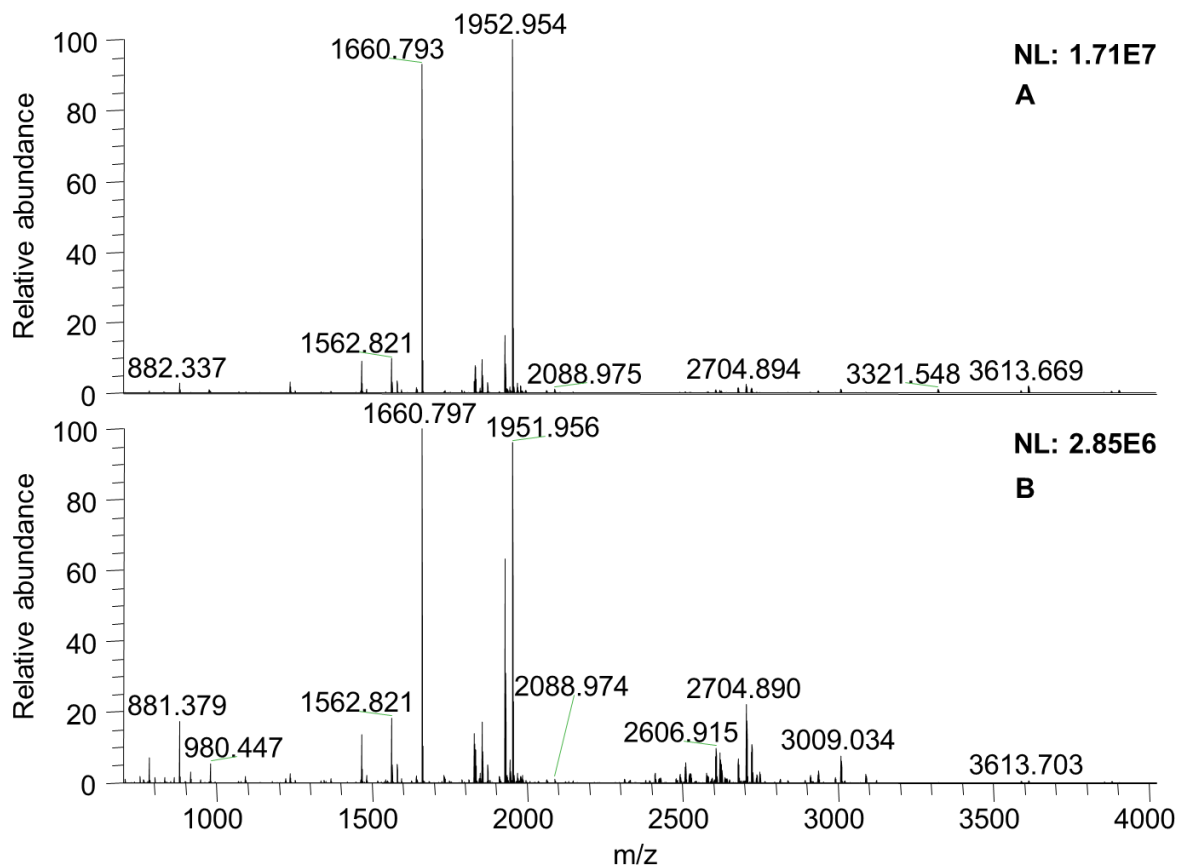
**Obrázek 29:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:5 pmol po obohacení na nosiči TNT; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2



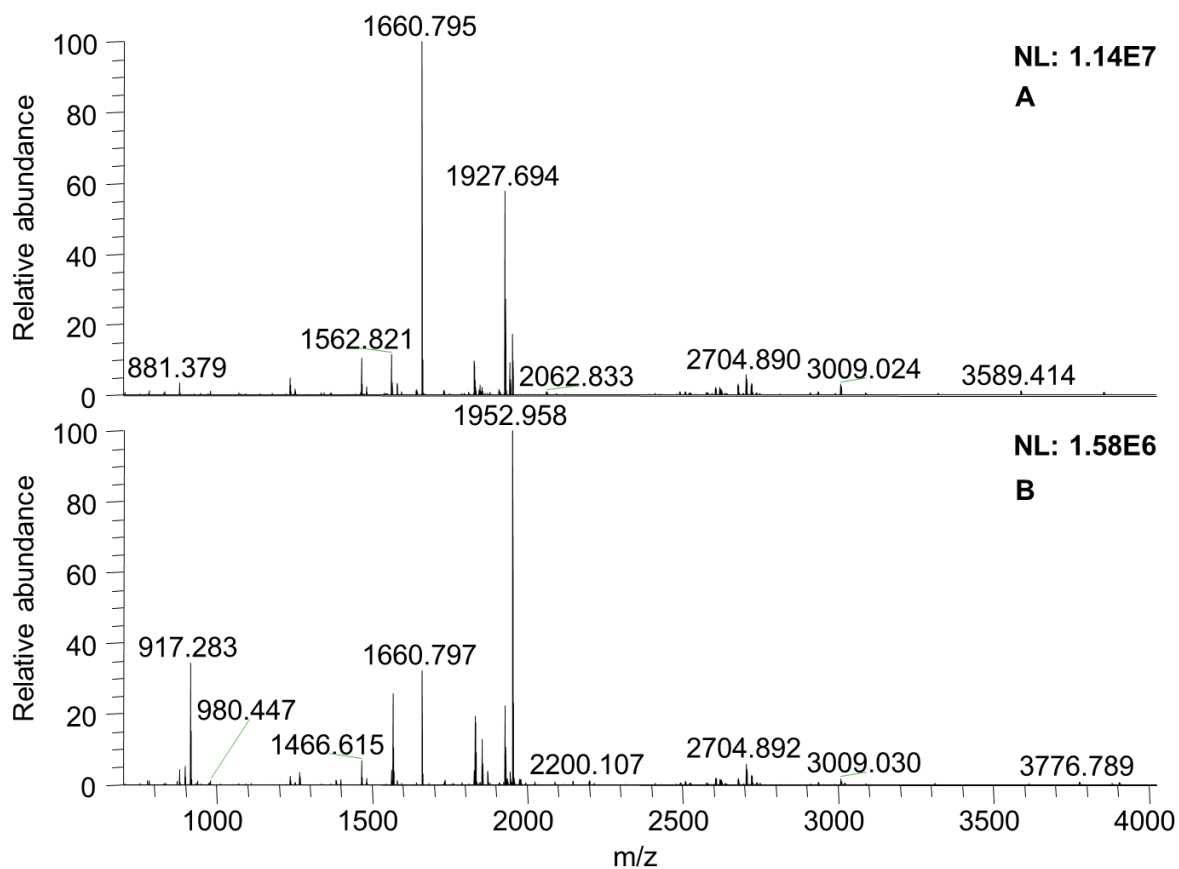
**Obrázek 30:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:1 pmol po obohacení na nosiči TiS; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2



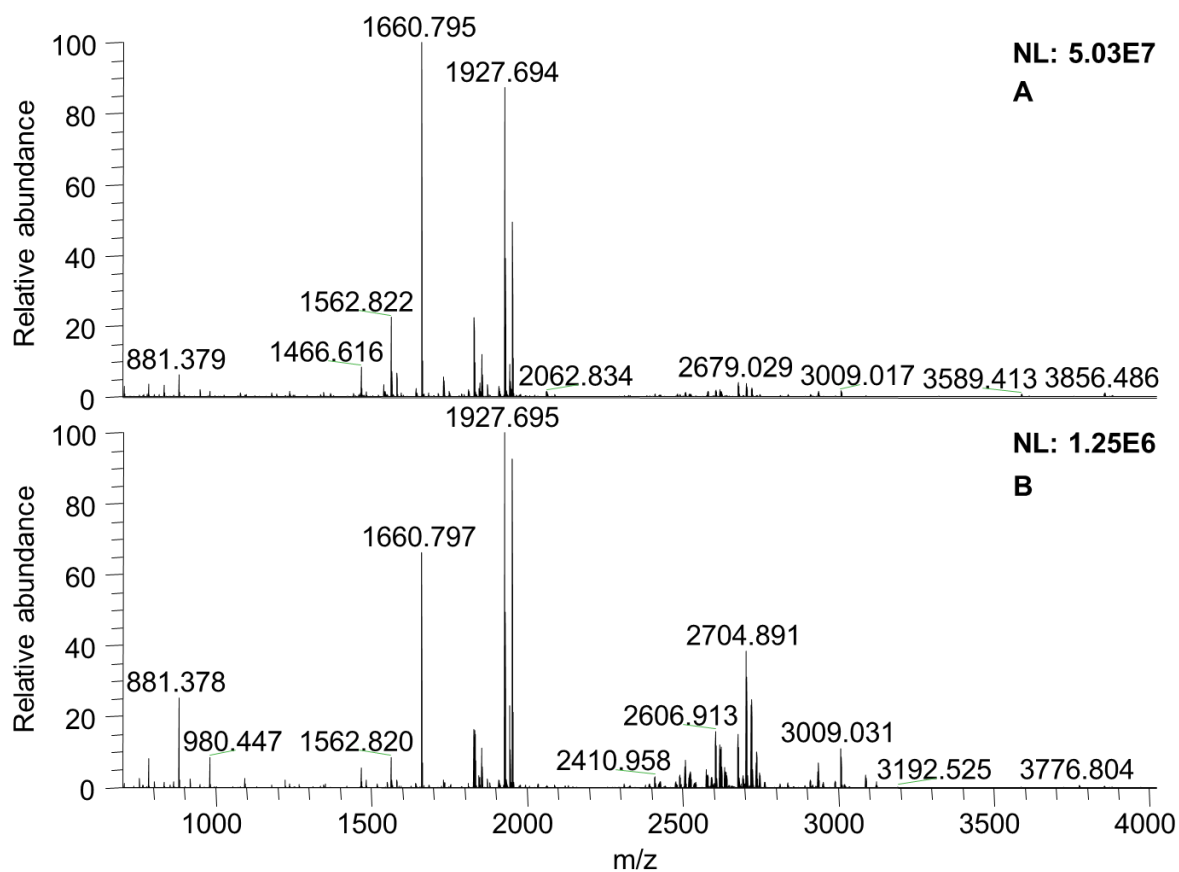
**Obrázek 31:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:1 pmol po obohacení na nosiči TNT; 700-4000; matrice DHB s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, A: původní vzorek; B: eluce 1; C: eluce 2



**Obrázek 32:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:150 pmol po obohacení na nosiči TiS; 700-4000; matrice DHB s  $H_3PO_4$ , A: eluce 1; B: eluce 2



**Obrázek 33:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:150 pmol po obohacení na nosiči NP; 700-4000; matrice DHB s  $H_3PO_4$ , A eluce 1; B: eluce 2



**Obrázek 34:** Spektrum směsi BSA:ACAS 300:150 pmol po obohacení na nosiči TNT; 700-4000; matrice DHB s  $H_3PO_4$ , A eluce 1; B: eluce 2