

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Chromatografická izolace a frakcionace fosfopeptidů na stacionární fázi
s oxidem titaničitým

Bc. Zuzana Dvořáková

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Dvořáková**
Osobní číslo: **C17432**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Chromatografická izolace a frakcionace fosfopeptidů na stacionární fázi s oxidem titaničitým**
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:

- Proteomická analýza, proteom a posttranslační modifikace s důrazem na fosforylaci proteinů.
- Izolace, purifikace a separace fosfoproteinů a fosfopeptidů.
- LC-MS analýza fosfopeptidů a vyhodnocení dat.
- Rešerši provádět s využitím dostupné vědecké literatury a databází (např. PubMed, WOS, Scopus apod.)

Experimentální část:

- Příprava vzorku pro analýzu - tryptické štěpení analyzovaných proteinů.
- Osvojení standardní metody obohacení fosfopeptidů na oxidu titaničitém.
- Příprava kapilárních kolonek s reverzní fází nebo oxidem titaničitém.
- Purifikace peptidů mikrogradientovým zařízením.
- Tvorba mobilní fáze s gradientem pH v mikrostrůžkače.
- Frakcionace fosfopeptidů mikrogradientovým zařízením s oxidem titaničitém jako stacionární fází s gradientem pH v mobilní fází.
- Frakcionace vzorků obsahujících fosfopeptidy:
 1. jednoduchá směs obsahující digest fosfoproteinu;
 2. komplexní směs peptidů z digestu celobuněčného lyzátu.
- Vyhodnocení získaných experimentálních dat a jejich interpretace.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Rudolf Kupčík**
Katedra biologických a biochemických věd
Ostatní konzultanti: **RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.**
Univerzita obrany, Hradec Králové
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

.....
Zuzana Dvořáková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborný dohled, panu Mgr. Rudolfovi Kupčickovi za vedení, cenné rady a neocenitelnou pomoc v průběhu zpracování celé práce. Dále bych ráda poděkovala panu RNDr. Pavlovi Řehulkovi, Ph.D. z KMPB FVZ UNOB v Hradci Králové za pomoc s měřením výsledků komplexních vzorků, vyhodnocováním a zpracováním naměřených dat.

V neposlední řadě také děkuji své rodině a partnerovi za trpělivost a podporu během celého mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá izolací, purifikací a frakcionací fosfopeptidů mikrogradientovou chromatografií na kolonách se stacionární fází s oxidem titaničitým a následnou analýzou frakcí pomocí hmotnostní spektrometrie. K optimalizaci mikrogradientové separace a frakcionace fosfopeptidů na TiO₂ mikrokuličkách byly použity jednoduché směsi peptidů trypticky naštěpených standardních proteinů α -kaseinu, hovězího sérového albuminu a fosvitinu. Následně byla optimalizovaná separace vyzkoušena a ověřena pomocí celobuněčného lyzátu Jurkat buněk (T-buněčného lymfomu) naštěpeného trypsinem.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fosfoprotein, fosfopeptid, obohacování, frakcionace, afinitní chromatografie, oxid titaničitý, hmotnostní spektrometrie

TITLE

Chromatographic Isolation and Fractionation of Phosphopeptides Using Titanium Dioxide Stationary Phase.

ANNOTATION

This thesis deals with microgradient chromatography using titanium dioxide solid phase for isolation, purification and fractionation of phosphopeptides with mass spectrometry used for its analysis of fractions afterwards. Simple mixtures of digested standard proteins α -casein, bovine serum albumin and phosvitin were used to optimization of microgradient separation and fractionation of phosphopeptides by TiO₂ microparticles. Optimization of microgradient separation was tested and verified by trypsin digested lysate of Jurkat cells (T-cell lymphoma).

KEYWORDS

Phosphoprotein, Phosphopeptides, Enrichment, Fractionation, Affinity Chromatography, Titanium Dioxide, Mass Spectrometry

OBSAH

Úvod.....	16
1 Teoretická část	17
1.1 Proteomika	17
1.1.1 Proteom a stavba proteinu.....	18
1.2 Posttranslační modifikace proteinů	21
1.2.1 Metody detekce posttranslačních modifikací proteinů	22
1.2.2 Fosforylace proteinů	23
1.3 Separační a purifikační metody fosfoproteinů	26
1.3.1 Elektromigrační metody separace proteinů	26
1.3.2 Chromatografické obohacovací techniky fosfoproteinů.....	28
1.3.3 Další obohacovací techniky fosfoproteinů	34
1.3.4 Nové trendy v izolaci fosfoproteinů	37
1.4 Hmotnostní spektrometrie	41
1.4.1 Princip	41
1.4.2 Vybrané ionizační techniky	41
1.4.3 Vybrané hmotnostní analyzátory	43
1.4.4 Detektory	46
1.4.5 MS analýza fosfoproteinů	46
1.4.6 Identifikace proteinů	48
Cíle diplomové práce	49
2 Experimentální část.....	50
2.1 Přístroje a pomůcky.....	50
2.2 Chemikálie a reagentie	51
2.3 Nosiče.....	51
2.4 Vzorky.....	51
2.5 Proteolytické štěpení α -kaseinu pomocí trypsinu	52

2.6	Proteolytické štěpení hovězího sérového albuminu pomocí trypsinu.....	52
2.7	Proteolytické štěpení fosvitinu pomocí trypsinu.....	53
2.8	Obohacování standardních fosfopeptidů na částicích Titansphere ve vsádkovém upořádání	53
2.9	Odsolení vzorků na mikrokolonkách plněných nosičem POROS Oligo R3.....	54
2.10	Příprava kapilárních kolonek.....	55
2.11	Mikrogradientová separace vzorků na kolonce plněné Titansphere 5 μm.....	56
2.12	Modifikace mikrogradientové separace vzorků na kolonce plněné Titansphere 5 μm	58
2.12.1	Mikrogradientová separace B	58
2.12.2	Mikrogradientová separace C	59
2.12.3	Mikrogradientová separace D.....	59
2.13	Obohacování fosvitinu a buněčného lyzátu na částicích Titansphere 5 μm ve vsádkovém uspořádání.....	60
2.14	Odsolení vzorků na mikrokolonkách plněných nosičem C18.....	61
2.15	MS analýza vzorků standardních proteinů	62
2.16	LC-UV analýza vzorků fosvitinu a lyzátu.....	63
2.17	LC-MS analýza vzorků fosvitinu a lyzátu.....	63
3	Výsledky a diskuze	65
3.1	Analýza proteolyticky štěpených standardních proteinů	65
3.2	Mikrogradientová separace fosfopeptidů α-kaseinu	66
3.2.1	Úprava pH elučních roztoků	67
3.2.2	Optimalizace délky kolonky	70
3.3	Optimalizace mikrogradientové separace fosfopeptidů fosvitinu.....	73
3.3.1	Opakované použití kolonky	74
3.3.2	Úprava objemu elučních roztoků použitých při tvorbě gradientu	76
3.4	Analýza komplexního vzorku peptidů	77
3.4.1	LC-UV analýza	77

3.4.2 LC-MS analýza	81
Závěr	89
4 Seznam použité literatury	90
Přílohy.....	101

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Nejjednodušší znázornění α aminokyseliny	19
Obrázek 2: Lokalizace posttranslačních modifikací na obecné struktuře transportního proteinu.	21
Obrázek 3: Schéma serinové fosforylace	24
Obrázek 4: Princip afinitní chromatografie.....	29
Obrázek 5: Bidentátní charakter interakce oxidu kovu a fosfátu (Me = kov).....	31
Obrázek 6: Obohacovací techniky pro fosfopeptidy.....	34
Obrázek 7: Typický experimentální postup pro „bottom-up“ proteomiku s MDLC separací.	37
Obrázek 8: Schématické znázornění a) syntézy magnetických částic Mag TiO ₂ -GSH b) současné obohacení fosfo i glykopeptidů pomocí Mag TiO ₂ -GSH.....	38
Obrázek 9: Modifikace TiO ₂ nanočástic a analýza fosfopeptidů	39
Obrázek 10: Schéma hmotnostního spektrometru	41
Obrázek 11: Ionizace laserem za účasti matrice	42
Obrázek 12: Ionizace elektrosprejem	43
Obrázek 13: Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru	44
Obrázek 14: Schéma iontové pasti (IT).....	45
Obrázek 15: Schéma orbitrapu	46
Obrázek 16: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum α -kaseinu štěpeného trypsinem. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB.....	65
Obrázek 17: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum BSA štěpeného trypsinem. Použitá matrice: CHCA	65
Obrázek 18: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum fosvitinu štěpeného trypsinem. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB.....	66
Obrázek 19: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z druhého gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma A). Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce	68

- Obrázek 20:** MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z druhého gradientu po úpravě pH elučních roztoků (eluční schéma B). Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce70
- Obrázek 21:** MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z prvního gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B) na kolonce dlouhé 21 mm. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce.....71
- Obrázek 22:** MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z druhého gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B) na kolonce dlouhé 21 mm. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce72
- Obrázek 23:** MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z prvního gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B) na kolonce dlouhé 48 mm. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce.....73
- Obrázek 24:** MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum fosvitinu z druhého gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B) prvního a šestého pokusu. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. První obohacení fosfopeptidů: A: první frakce, B: třetí frakce, C: pátá frakce. Šesté obohacení fosfopeptidů: D: první frakce, E: třetí frakce, F: pátá frakce74
- Obrázek 25:** MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum fosvitinu z druhého gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B). Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny červeně. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce75
- Obrázek 26:** MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum fosvitinu druhého gradientu separace s upravenými objemy elučních roztoků (eluční schéma C). Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce77
- Obrázek 27:** Chromatografický záznam získaných frakcí lyzátu z mikrogradientové separace (eluční schéma C). První gradient: A: první frakce, B: druhá frakce. Druhý gradient: C: první frakce, D: druhá frakce, E: třetí frakce, F: čtvrtá frakce, G: pátá frakce, H: šestá frakce.....78
- Obrázek 28:** Chromatografický záznam získaných frakcí lyzátu z mikrogradientové separace (eluční schéma B). První gradient: A: první frakce, B: druhá frakce. Druhý gradient: C: první frakce, D: druhá frakce, E: třetí frakce, F: čtvrtá frakce, G: pátá frakce, H: šestá frakce.....79
- Obrázek 29:** Chromatografický záznam získaných frakcí lyzátu z mikrogradientové separace (eluční schéma D). První gradient: A: první frakce, B: druhá frakce. Druhý gradient: C: první frakce, D: druhá frakce, E: třetí frakce, F: čtvrtá frakce. G: frakce ze samostatné eluce roztokem EB180

- Obrázek 30:** Vennův diagram zobrazující množství identifikovaných nefosforylovaných peptidů ve vybraných frakcích mikrogradientové elučního schématu B.....82
- Obrázek 31:** Vennův diagram zobrazující množství identifikovaných fosforylovaných peptidů ve vybraných frakcích mikrogradientové separace elučního schématu B82
- Obrázek 32:** Vennův diagram zobrazující celkové množství identifikovaných fosfopeptidů ve všech frakcích v elučních schémat B a D83
- Obrázek 33:** Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných fosfopeptidů ze druhého gradientu v mikrogradientové separaci dle elučního schématu B a v prvních elucích dvou pokusů vsádkového obohacování84
- Obrázek 34:** Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných fosfopeptidů v mikrogradientové separaci dle elučního schématu B a ve dvou elucích prvního pokusu vsádkového obohacování85
- Obrázek 35:** Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných nefosforylovaných peptidů ve všech frakcích mikrogradientové separace dle elučního schématu B, v první frakci prvního gradientu elučního schématu B a v první eluci prvního provedení vsádkového obohacování86
- Obrázek 36:** Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných peptidů z druhého gradientu v mikrogradientové separaci dle elučního schématu B a v prvních elucích dvou pokusů vsádkového.....86
- Obrázek 37:** Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných nefosforylovaných peptidů z druhého gradientu v mikrogradientové separaci dle elučního schématu B a v prvních elucích dvou pokusů vsádkového obohacování87
- Obrázek 38:** Vennův diagram srovnávající množství identifikovaných fosfopeptidů v první, třetí a čtvrté frakci druhého gradientu mikrogradientové separace dle elučního schématu B ..88
- Obrázek 39:** Vennův diagram srovnávající množství identifikovaných fosfopeptidů v první, páté a šesté frakci druhého gradientu mikrogradientové separace dle elučního schématu B ...88

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení frakcí pro přípravu prvního elučního gradientu	57
Tabulka 2: Složení frakcí pro přípravu druhého elučního gradientu	58
Tabulka 3: Úprava pH elučních roztoků Bis-Tris propan/HCl	59

SEZNAM ZKRATEK

2DE	dvourozměrná gelová elektroforéza (z angl. Two-Dimensional Electrophoresis)
2D-PAGE	dvourozměrná gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
ABC	hydrogenuhličitan amonný
AC	afinitní chromatografie
ACAS	α -kasein (z angl. α -Casein)
ACN	acetonitril
ADP	adenosindifosfát
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
CE	kapilární elektroforéza (z angl. Capillary Electrophoresis)
CHCA	kyselina skořicová
DAHC	hydrogencitrát dvojamonný
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. Deoxyribonucleic Acid)
DTT	dithiothreitol
EB	eluční roztok (z angl. Elution Buffer)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. Ethylenediaminetetraacetic Acid)
ERLIC	elektrostatická repulzně-hydrofilní interakční chromatografie (z angl. Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography)
ESI	ionizace elektrosprejem
FEP	fluorovaný ethylenpropylen (z angl. Fluorinated Ethylene Propylene)
FWHM	šířka v polovině maxima výšky (z angl. Full Width at Half Maximum)
GC	plynová chromatografie (z angl. Gas Chromatography)
GSH	glutathion
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (z angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. High-Performance Liquid Chromatography)
IAC	jodacetamid
IEF	izoelektrická fokusace (z angl. Isoelectric Focusing)

IEX	iontově výměnná chromatografie (z angl. Ion Exchange Chromatography)
IMAC	afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (z angl. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)
IT	iontová past (z angl. Ion Trap)
LA	kyselina mléčná (z angl. Lactic Acid)
LB	vazebný roztok (z angl. Loading Buffer)
LC	kapalinová chromatografie (z angl. Liquid Chromatography)
LIT	lineární iontová past (z angl. Linear Ion Trap)
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice (z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MDLC	multidimenzionální kapalinová chromatografie
MOAC	afinitní chromatografie s oxidem kovu (z angl. Metal Oxide Affinity Chromatography)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
PA	kyselina fytová (z angl. Phytic Acid)
PAA	polyakrylát
PEI	polyethylenimin
pI	izoelektrický bod (z angl. Isoelectric Point)
ppm	výraz pro jednu miliontinu celku (z angl. Parts Per Million)
PTM	posttranslační modifikace
Q	kvadrupól (z angl. Quadrupole)
RP	reverzní fáze (z angl. Reverse Phase)
rpm	otáčky za minutu (z angl. Revolutions Per Minute)
SAX	iontově výměnná chromatografie na silném anexu (z angl. Strong Anion Exchange Chromatography)
SCX	iontově výměnná chromatografie na silném katexu (z angl. Strong Cation Exchange Chromatography)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. Sodium Dodecylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
TFA	kyselina trifluoroctová (z angl. Trifluoroacetic Acid)
TOF	analyzátor doby letu (z angl. Time of Flight)
WB	promývací roztok (z angl. Washing Buffer)

Úvod

Posttranslační modifikace (PTM) jsou chemické modifikace proteinů, které se mohou vyskytovat na proteinu po jeho vzniku na ribozomu. PTM tak způsobují komplexnost lidského proteomu. Ovlivňují funkci proteinu, jeho stabilitu, lokalizaci, interakci s jinými proteiny i degradaci proteinů. Modifikace již existujících proteinů je schopnost buňky umožňující rychlou reakci na signály ze svého okolí [1, 2].

Fosforylace patří mezi nejdůležitější PTM proteinů a vyskytuje se zejména na serinových, threoninových a tyrozinových zbytcích. Fosforylace je vysoce dynamický proces. V buňce může být 40 % až 60 % dočasně fosforylovaných proteinů a buňky velmi často používají právě fosforylaci jako molekulární přepínač pro aktivitu proteinu. Prostřednictvím fosforylace a defosforylace je ovlivňováno obrovské množství buněčných procesů zahrnující přenos signálu, diferenciaci buněk i kontrolu buněčného cyklu a metabolismu [2,3]. Téměř všechny procesy regulované fosforylací proteinů jsou reverzibilní a řízené kombinovaným působením dvou různých enzymů. Nejen fosforylace, ale i další PTM hrají důležitou roli v biologické homeostáze. Narušení jejich regulace může vést k patologii, která může přispívat k patogenezi různých onemocnění, jako je například Diabetes mellitus typu II, Cystická fibróza či neurodegenerativní nemoci (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a další). Deregulace těchto cest může vést až k rozvoji rakoviny [1].

Analýza i identifikace fosfoproteinů a zjišťování fosforylačních míst jsou tedy důležité nejen pro porozumění regulační roli, kterou hraje fosforylace v buňkách, ale i pro diagnostiku a účinnou terapii nejen imunologických patologií [4].

Tato práce se zaměřuje na metody separace a purifikace fosfoproteinů následované analýzou pomocí hmotnostního spektrometru. Experimentální část práce se pak zabývá převážně optimalizací mikrogradientové metody separace fosfopeptidů na stacionární fázi s oxidem titaničitým.

1 Teoretická část

1.1 Proteomika

Proteomika je vědní obor, který se zabývá systematickou analýzou proteinů. Základním cílem tohoto oboru je identifikace proteinů ve zdravé nebo patologické buňce či tkáni, analýza jejich struktury, lokalizace, funkce a vzájemné interakce [5]. Proteomické studie přispěly k objasnění fyziologické a farmakologické role proteinů v biologickém systému. Proteomika je zaměřena na porozumění patofyziologických mechanismů v lidském těle, které jsou základem onemocnění [6]. Hlavní průlomové této oblasti umožnily používání proteinů v diagnostice ve formě biomarkerů. Kromě diagnostických biomarkerů se proteomika také zaměřuje na identifikaci prediktivních a terapeutických biomarkerů [5,6].

Podle hlavních cílů se proteomika dělí na analytickou, strukturní, funkční a srovnávací proteomiku. *Analytická proteomika* se snaží o identifikaci proteinů jako je stanovení molekulové hmotnosti, sekvence aminokyselin a určení posttranslačních modifikací. Hlavním cílem *strukturní proteomiky* je studium struktury proteinů různými technikami jako je rentgenová krystalografie, nukleární magnetická rezonance a další. *Funkční proteomika* studuje biologické funkce určitého proteinu s cílem zjistit jeho roli v buňce. *Srovnávací proteomika* porovnává složité směsi proteinů. Sledují se zde změny ve složení proteinů v normálních zdravých buňkách a abnormálních patologických buňkách (například maligních buňkách) [7]. Existují však i další odvětví proteomiky jako je *fosfoproteomika*, zabývající se analýzou fosfoproteinů, *glykoproteomika* studující glykoproteiny, *expresní proteomika* zabývající se počtem proteinů, které jsou exprimovány v různých typech buněk a *klinická proteomika*, která se zabývá analýzou proteinů v biologických vzorcích s cílem identifikovat biomarkery pro diagnózu a léčebné účely [8].

Pro separaci a identifikaci proteomů existují hlavní dva analytické přístupy. Prvním přístupem je „top-down“ proteomika, kde jsou intaktní proteiny rozděleny a poté analyzovány hmotnostní spektrometrií. V „bottom-up“ proteomice se nejdříve štěpí složitá směs proteinů a následně jsou vzniklé peptidy chromatograficky rozděleny a analyzovány nejčastěji tandemovou hmotnostní spektrometrií [7,9].

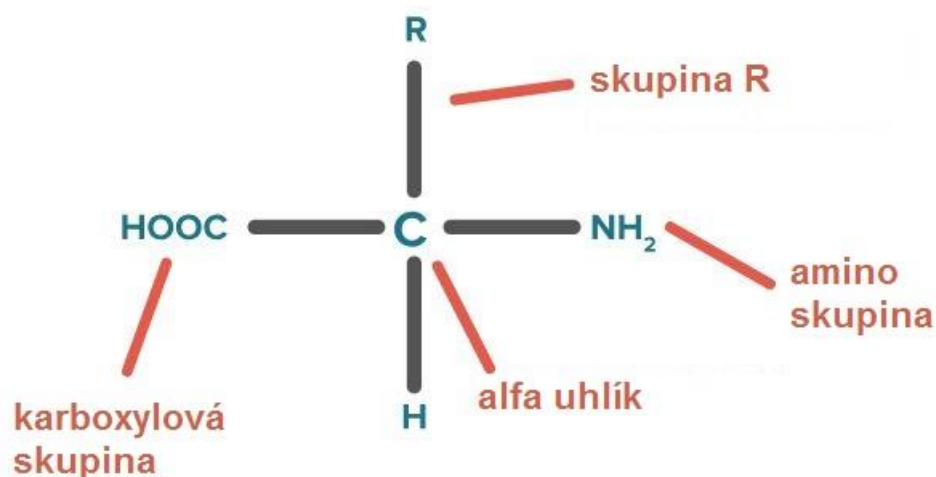
Proteomika se opírá o tři základní technologické kroky. První krok zahrnuje metody frakcionace komplexních směsí proteinů případně peptidů, další je hmotnostní spektrometrie k získání údajů potřebných k identifikaci proteinů a v neposlední řadě je to bioinformatika pro zpracování surových hmotnostních spektrálních dat do proteinových dat [10].

Pokroky v oblasti analytické chemie a vývoj chromatografie a hmotnostní spektrometrie (MS) umožnily přesnou, reprodukovatelnou a spolehlivou analýzu proteinů. Proteomické přístupy založené na rozvoji MS jsou schopny identifikovat a stále přesněji detekovat s velkou citlivostí přítomnost velmi nízkých koncentrací proteinů v poměrně komplexních matricových biologických vzorcích [5,11,12]. MS může být použita ke zjištění lokalizace, struktury, regulace či funkce proteinů [13]. Dále také umožňuje studium četných posttranslačních modifikací proteinů, které regulují buněčné specifické reakce a podmiňují funkční heterogenitu buněčné kompozice [14].

1.1.1 Proteom a stavba proteinu

Termín „proteom“ poprvé použil Mark R. Wilkins v roce 1994. Název vznikl z anglické definice „PROTEin complement expressed by a genOME“ [15]. Proteom zahrnuje veškeré proteiny či jejich různé modifikace, které jsou přítomny v daném okamžiku v buňce nebo tkáni. Tyto proteiny tvoří převažující součást buněčných struktur a vykonávají prakticky všechny buněčné funkce od zpracování a převádění biologických informací až po výměnu látek a energie [16].

Základní stavební jednotkou proteinů jsou aminokyseliny (AMK). Proteiny jsou běžně tvořeny dvaceti tzv. proteinogenními AMK, které jsou navzájem spojeny peptidovými vazbami a vytvářejí dlouhý řetězec. Všechny proteinogenní AMK jsou α -aminokyseliny tzn. na jednom konci mají karboxylovou skupinu a aminoskupinu na atomu uhlíku vedle karboxylové skupiny. Každá α -AMK obsahuje tedy atom uhlíku (α -uhlík), atom vodíku, karboxylovou skupinu, aminoskupinu a skupinu R (postranní řetězec), která je jedinečná pro každou AMK (obr. 1). Podle R skupiny se dají AMK rozdělit na čtyři základní skupiny: hydrofobní (obsahují dlouhé alifatické nebo aromatické postranní řetězce), hydrofilní (nesou polární skupiny $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$), bazické (obsahují více aminoskupin) a kyselé (obsahují dva karboxyly). Všechny proteinogenní AMK mají zásadně L-konfiguraci (aminoskupina směřuje od karboxylu doleva) a jsou opticky aktivní (chirální). Jako chirální uhlík se označuje α -uhlík, na kterém se nacházejí 4 různé substituenty. Výjimkou je nejjednodušší AMK glycin, který je achirální, kde R je atom vodíku. Při acidobazických reakcích fungují všechny AMK jako kyselina a zásada zároveň. Vytvářejí tzv. amfion neboli obojetný iont. Karboxylová skupina odštěpuje proton, aminoskupina proton váže a tím dochází k přesunu náboje. Zda převládá kladný či záporný náboj záleží pouze na pH, ve kterém se AMK nacházejí. pH při kterém jsou v molekule vyrovnány kladné a záporné náboje a výsledný náboj je tedy nulový, se nazývá izoelektrický bod pI [17,18].



Obrázek 1: Znárodnění struktury α aminokyseliny. Převzato a upraveno z [19].

Reakcí dvou AMK, při níž reaguje α -aminoskupina jedné AMK s karboxylovou skupinou druhé AMK za odštěpení molekuly vody, vzniká dipeptid. Zbytky aminokyselin jsou spojeny peptidovou vazbou. Polykondenzací aminokyselin do lineárního řetězce vzniká polypeptid. Každá AMK má různé vlastnosti, které umožňují proteinům rozdílné funkce [17].

Peptid je nízkomolekulární látka vznikající kondenzací AMK. Podle počtu spojených AMK v řetězci se rozdělují na oligopeptidy obsahující 2-10 AMK a polypeptidy 10-100 AMK. Podle struktury řetězce se dají také rozdělit na lineární či cyklické. V lidském organismu zastupují mnoho funkcí. Mohou to být například hormony (insulin, oxytocin apod.), neuromodulátory (endorfiny) a další.

Proteiny jsou vysokomolekulární látky obsahující více než 100 AMK spojených peptidovou vazbou do polypeptidového řetězce. Primární strukturu proteinů určuje lineární sekvence aminokyselin. Specifické pořadí AMK v polypeptidovém řetězci je zakódováno v DNA. Přestože existuje pouze dvacet proteinogenních AMK, je počet jejich variací v molekule obrovský. Primární struktura tedy udává vlastnosti a strukturu proteinu [17,18].

Sekundární struktura je prostorové uspořádání AMK v určitém místě hlavního polypeptidového řetězce bez ohledu na jeho postranní řetězce. Existují dvě základní sekundární struktury α -helix a β -skládaný list. Ve struktuře α -helixu je polypeptidový řetězec stočený do pravotočivé šroubovice. Závity šroubovice jsou stabilizovány vodíkovými můstky mezi karboxy-kyslíkem a amino-vodíkem AMK každé čtvrté peptidové vazby. R-skupiny směřují ven z řetězce. Další sekundární struktura proteinů je β -skládaný list. V této struktuře jsou

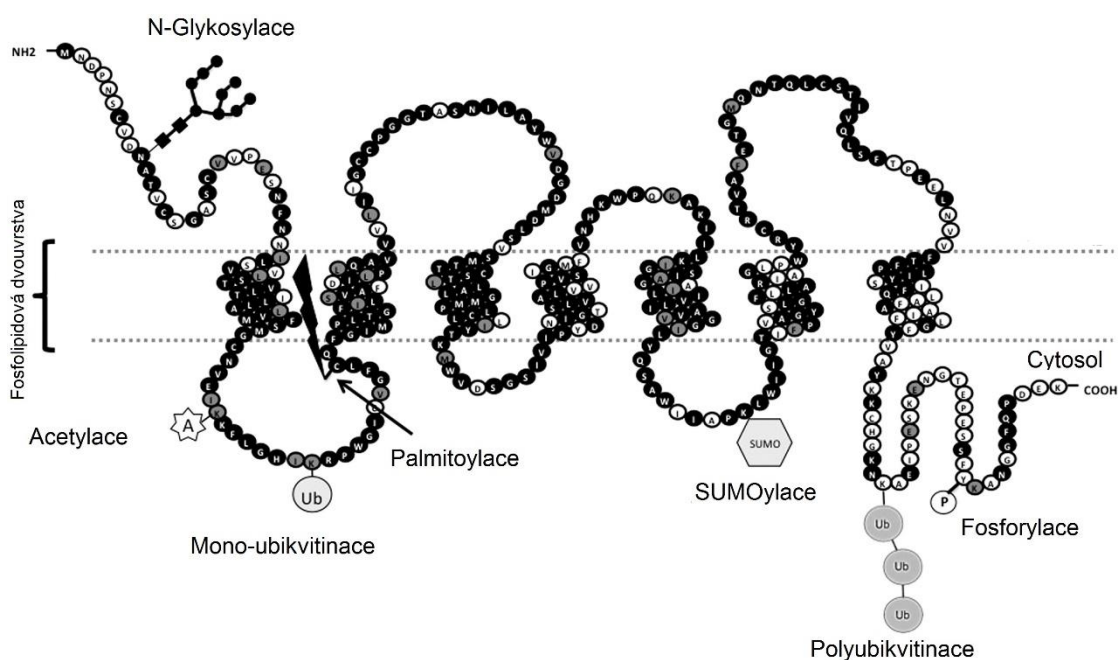
polypeptidové řetězce uspořádány vzájemně rovnoběžně a antiparalelně. Řetězce jsou spojeny vodíkovými vazbami mezi AMK. R-skupiny se v tomto případě nacházejí nad a pod rovinou listu [17,18,20].

Prostorové uspořádání α -helixu či β -skládaného listu tvoří terciární trojrozměrnou strukturu proteinů. Konformaci proteinového řetězce ovlivňují vedle vodíkových vazeb také postranní řetězce jednotlivých AMK a další intramolekulární vazebné interakce. Uplatňují se zde disulfidické můstky, hydrofobní či iontové vazby a van der Waalsovy síly [17,18]. Skládání proteinů je určeno právě iontovými interakcemi mezi nabitými R-skupinami AMK, hydrofobními interakcemi, kdy hydrofobní R-skupiny směřují spíše dovnitř proteinů a hydrofilní R-skupiny jsou na povrchu, kde mohou interagovat s vodou [17]. Proteiny můžeme podle terciární struktury rozdělit na dvě základní skupiny. Fibrilární proteiny, které mají polypeptidové řetězce uspořádány v jednom směru a vodíkové vazby vznikají mezi různými řetězci. Tyto proteiny mají v organismu většinou strukturální funkci. Další jsou globulární proteiny. Vodíkovými vazbami jsou vázány části jednoho řetězce a jejich molekuly mají kulovitý tvar. V organismu to jsou převážně enzymy a transportní či receptorové proteiny.

Kvartérní struktura se vytváří pouze u proteinů, které jsou složeny z více polypeptidových řetězců (podjednotek). Stejně jako terciární struktura je určena iontovými, hydrofobními interakcemi, disulfidickými můstky mezi postranními řetězci AMK. V závislosti na počtu dílčích jednotek je můžeme rozdělit na monomery, dimery, trimery a tak dále. V závislosti, zda jsou podjednotky totožné či nejsou se připojuje předpona homo- nebo hetero- [17,18].

1.2 Posttranslační modifikace proteinů

Posttranslační modifikace jsou specifické chemické změny proteinové struktury, způsobené proteolytickým štěpením nebo přidáním modifikační skupiny k jedné či více aminokyselinám a probíhají po proteosyntéze proteinu na ribozomech. PTM definují funkční a strukturní rozmanitost proteinů, takže genový produkt může být přítomen v několika různých modifikovaných formách [21,22]. Tyto modifikace (obr. 2) jsou způsobeny přidáním funkční skupiny (například fosforylace), přidáním malých proteinů či peptidů (ubikvitinace), cukerných řetězců (glykozylace) nebo přidáním lipidů (palmitoylace) na aminokyselinové zbytky. Tyto kovalentní přídatky se často vyskytují v důsledku signalační kaskády a mohou být reverzibilní v závislosti na typu modifikace a signalační dráhy [23]. Například při signalizaci umožňuje kinázová kaskáda reverzibilní vazbu, popřípadě odstranění fosfátu. Kombinace různých PTM vede k heterogenitě proteinů [22].



Obrázek 2: Lokalizace posttranslačních modifikací na obecné struktuře transportního proteinu. Převzato a upraveno z [23].

Převážná část bílkovin eukaryotických buněk podléhá PTM. Pravděpodobnost pro danou modifikaci je dána aminokyselinovou sekvencí, strukturálním a chemickým složením povrchu bílkovin a také dostupností potřebných proteinových prekurzorů. PTM mají velký biologický význam. Jsou velmi rozšířené a hrají významnou roli při regulaci mnoha proteinových funkcí. Modulují mimo jiné například funkční expresi transportního proteinu. Tyto proteiny jsou rozhodující pro distribuci široké škály endogenních sloučenin jako jsou

hormony, žlučové kyseliny, peptidy, lipidy, léky a další [23]. PTM určují také terciární a kvartérní strukturu proteinů a regulují jejich lokalizaci, obrat či jejich interakci s jinými proteiny [21].

V současné době je známo více než 400 posttranslačních modifikací proteinů [23].

1.2.1 Metody detekce posttranslačních modifikací proteinů

První přístup k identifikaci PTM navrhl Yates et al. v roce 1995. Vyčerpávající přístup k vyhledávání měl však svá závažná omezení, protože mohl zohlednit pouze několik modifikací. To znamenalo, že badatel musel předem odhadnout, které PTM jsou přítomny ve vzorku, což bylo a je nerealistické. V důsledku toho se v současnosti provádí vyhledávání pouze malého souboru PTM (jako je fosforylace) a ignorují se všechny ostatní PTM [24,25].

Metody, které umožňují charakterizaci proteinových ko- a posttranslačních modifikací, se stále rozšiřují, což umožňuje studovat strukturální a funkční roli různých proteinových posttranslačních modifikací a také studium interakce typu protein-protein [23,24]. Pro charakterizaci fosfoproteinů se dříve využívalo peptidové sekvenování s využitím Edmanovy degradace v kombinaci se značením ^{32}P . Metoda má však několik omezení. Peptidy musí být před analýzou odděleny kapalinovou chromatografií. To snižuje celkovou citlivost a zvyšuje se doba analýzy, proto tato metoda není vhodná pro analýzu komplexních vzorků [26].

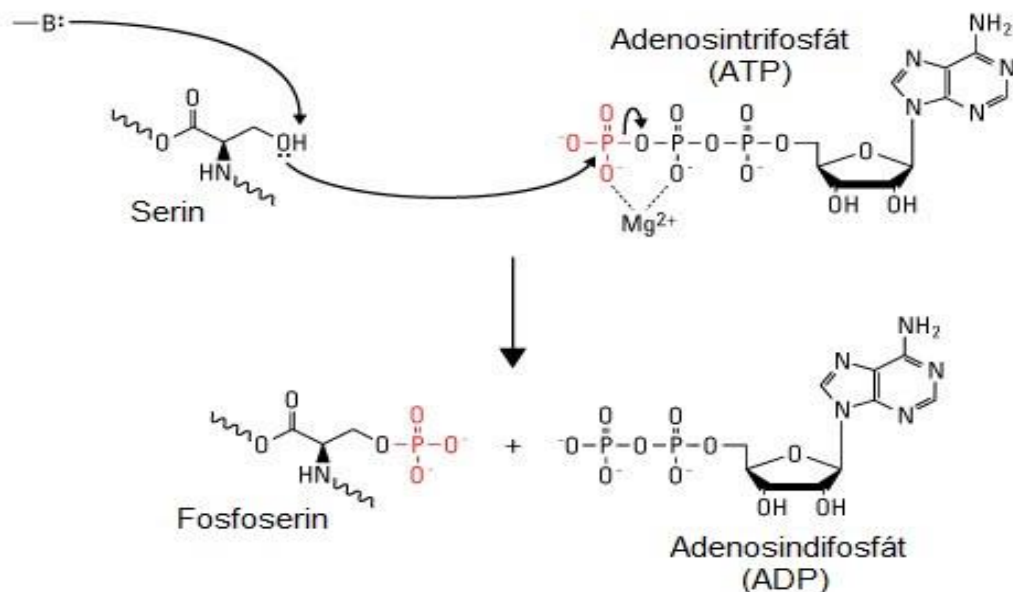
V současné době je základní metodou pro identifikaci a charakterizaci kovalentních modifikací a také pro kvantifikaci jejich změn hmotnostní spektrometrie viz kapitola 1.4.

Další metodou pro detekci a identifikaci PTM je dvourozměrná elektroforéza (2-DE). Tato metoda separace a izolace proteinů je založena na odlišném izoelektrickém bodě a molekulové hmotnosti různě modifikovaných forem určitého proteinu. Pro detekci intaktních modifikovaných proteinů v gelu se používají selektivní specifické sondy, popřípadě blotování na membrány. Například pro specifickou detekci fosfoproteinů v 2-DE gelech je možné použít radioaktivní značení proteinů inkorporací radioaktivním izotopem ^{32}P . Pro specifické barvení glykoproteinů a fosfoproteinů v gelech byly vyvinuty fluorescenční barviva umožňující multiplexní analýzu modifikovaných proteinů. Pro specifickou vizualizaci proteinů v elektroforetických gelech se používá western blot. Tato metoda využívá protilátek proti fosfoamino kyselinám pro detekci fosfoproteinů a konjugovaných lektinů pro detekci glykoproteinů. Pro analýzy pomocí 2-DE je vhodné nejprve proteinové vzorky zjednodušit například přečištěním nebo obohacením modifikovaných proteinů [27].

1.2.2 Fosforylace proteinů

Fosforylace proteinů je rychlá a reverzibilní modifikace s relativně nízkými metabolickými náklady. Postihuje asi dvě třetiny celkového lidského proteomu a je tedy pravděpodobně nejrozšířenější a nejlépe prozkoumaná PTM. Fosfoproteomika byla založena jako podoblast proteomiky, která se zaměřuje pouze na identifikaci a charakterizaci fosforylovaných proteinů [27,28]. V poslední době se fosfoproteomika velice rychle rozvíjí, díky pokrokům v technikách obohacování fosfopeptidů a hmotnostní analýze fosfopeptidů [29]. Existuje několik typů fosforylace. N-, S- a acylfosforylace jsou minoritní, proto se analýza fosforylace zaměřuje především na O-fosforylace, které jsou nejčastější [30].

Souhra dvou typů enzymů, proteinových kináz a fosfatáz, kontroluje modifikaci substrátu. Reverzibilní fosforylaci proteinu (obr. 3) se rozumí kovalentní připojení fosfátové skupiny dodané z adenosintrifosfátu (ATP) na volný hydroxyl postranních řetězců aminokyselin a následné odstranění fosfátu z fosforylovaného proteinu. Připojení fosfátové skupiny je katalyzováno proteinkinázami, které jsou specifické určité aminokyselinové zbytky (například tyrozinkináza), tak i pro určité sekvenční motivy. Proteinkinázový komplement tvoří vzájemně propojenou síť, která řídí buněčné signalizační dráhy a také přímo vzájemně moduluje fosforylace specifické pro danou lokalitu. Mnoho kináz navíc podstupuje intermolekulární autofosforylace v průběhu jejich aktivace v důsledku konformačních změn, například při spojení s extracelulárními ligandy, interagujícími proteinovými faktory nebo molekulami druhých posílů [30,31]. Součástí fosforylace jsou ale také proteinfosfatázy, které zajišťují specifické odstranění fosfátu. Jeden aminokyselinový zbytek může být v případě fosforylace modifikován různými způsoby kináz a fosfatáz, proto mohou být modifikace jednoho aminokyselinového zbytku odlišné [21,28]. V eukaryotických buňkách dochází k fosforylaci nejčastěji na serinu, poté na threoninu a méně často na tyrozinových zbytcích [31]. Fosforylaci také podléhá histidin, avšak fosfohistidin je velmi labilní a obtížný pro analýzu [32].



Obrázek 3: Schéma serinové fosforylace. Převzato a upraveno z [33].

Tato všudypřítomná posttranslační modifikace hraje klíčovou roli v regulaci mnoho buněčných procesů eukaryotických buněk jako je proliferace, diferenciace, metabolismus či apoptóza [29]. Fosforylace reguluje ale i transkripci a translaci. Existují dva základní mechanismy, kterými fosforylace řídí proteinovou aktivitu. Je to modulace interakcí protein-protein a změna konformace proteinů popsána výše. Díky změnám v konformaci proteinů se podílí například na modulaci aktivit četných metabolických enzymů, jako je pyruvát dehydrogenáza či glykogen syntáza. Proto také jako první fosfoprotein byl objeven metabolický enzym glykogen fosforyláza. Kromě výše zmíněných funkcí slouží také jako mechanismus molekulárního přepínání v intracelulárních signálních drahách, obratu proteinů, interakce, konformace či lokalizace proteinů [31]. Deregulované defektní signalizační cesty fosforylace často vedou k abnormalitám vyvolávající různé onemocnění, například diabetes mellitus typu II, cystická fibróza, Alzheimerova choroba a mnoho dalších. Deregulovaná signalizace je také charakteristickým znakem rakoviny. Z tohoto důvodu je velmi důležité správné pochopení fosforylace proteinů a jejich analýza [30,34].

Příkladem regulace metabolismu fosforylací je sekrece inzulínu po jídle. Na inzulín sekretovaný z pankreatu reagují pouze cílové tkáně a buňky (adipocyty, hepatocyty, myocyty) se specifickým povrchovým receptorem pro inzulín. Připojení inzulínu do receptoru je zpracováno klíčovými kinázami a iniciuje se kaskáda intracelulárních fosforylací proteinů v cílových buňkách. Zpracování fosfo-signálu zprostředkované inzulínem není jediný impuls

pro fosforylaci proteinů v buňkách. Fosforylaci také ovlivňují podněty, které buňky obdrží v reakci na jídle, jako je dostupnost živin či změny hladin metabolitů, cirkulujících hormonů, cytokinů a růstových faktorů. Taková integrace signálu probíhá několika mechanismy jako je vícestupňová fosforylace cílových proteinů, časové nebo prostorové kódování informací nebo prostřednictvím komunikace mezi kinázami [31].

Pomocí MS bylo prokázáno, že klíčové regulační proteiny jsou často fosforylovány na více místech a proteiny, které byly považovány za substráty jedné kinázy, jsou ve skutečnosti cíle několika různých kináz [31]. Více fosforylačních míst proteinu umožňuje větší přizpůsobivost různým funkcím, v závislosti na tom, které místo fosforylace bude obsazeno. Například fosforylace jedné konkrétní AMK může způsobit konformační změny proteinu, které mohou vést k fosforylaci dalších aminokyselinových zbytků nebo naopak mohou fosforylaci blízkých AMK zabránit [32].

1.3 Separační a purifikační metody fosfoproteinů

Proteomická analýza fosfoproteinů a fosfopeptidů je stále jedním z nejnáročnějších úkolů současného proteomického výzkumu. Rozvíjející se proteomické technologie, jako je obohacování fosfopeptidů, vysoce přesná hmotnostní spektrometrie a s tím související bioinformatika, umožňují analyzovat celé fosfoproteomy. Kvantitativní metody mohou hodnotit relativní změnu fosforylace pro několik tisíc míst v jediném experimentu [35]. Komplexní analýza fosforylace proteinů zahrnuje identifikaci fosfoproteinů a fosfopeptidů, lokalizaci fosforylovaných zbytků a kvantitativní stanovení fosforylace [32].

Analýza fosfoproteomů se skládá z několika kroků. Důležitou součástí analýzy fosforylace peptidů je vhodná příprava vzorků. Prvním krokem je frakcionace komplexních směsí proteinů pomocí SDS-PAGE, případně 2D-PAGE. Dalším velmi důležitým krokem je proteolytické štěpení proteinů na směs peptidů, které mohou být opět frakcionovány [29,32]. Jedním z klíčových požadavků na fosfoproteomovou analýzu je také odstranění hojně zastoupených nefosforylovaných peptidů z komplexních směsí a zakoncentrování méně zastoupených fosfopeptidů. Proto se často před MS analýzou provádí purifikace fosforylovaných peptidů obohacovacími technikami (viz kapitola 1.3.2) [36,37]. Strategie purifikace využívají často fyzikální vlastnosti proteinu k jejich izolaci. V každém kroku čištění je důležité vybírat vhodné podmínky s ohledem na lýzu buněk, pro zachování co největšího množství fosforylovaných proteinů. Problémem při lýze buněk je uvolnění všech fosfatáz a proteáz z buňky. Působením proteáz by docházelo k degradaci proteinů a působením fosfatáz k defosforylaci během přípravy vzorků. To lze potlačit přidáním vhodné směsi inhibitorů proteáz a fosfatáz. Například některé inhibitory fosfatáz inhibují pouze odstranění fosfátu ze serinu či threoninu, ale neinhibují defosforylaci tyrozinu. Z tohoto důvodu je nutné používat směs více typů inhibitorů fosfatáz. Při studiu dynamické fosforylace proteinů je také důležité inhibovat proteinové kinázy. Toho se nejčastěji dosahuje přidáním EDTA nebo inhibitorů specifických kináz do pufrů [18, 36]. Analýza fosforylací by měla mít přesně naplánované vhodné podmínky jako jsou pufr, rozsah pH či teplota během analýzy [38].

1.3.1 Elektromigrační metody separace proteinů

Detekce fosfoproteinů v komplexních směsích je velmi složitá bez předchozí separace proteinů. Základní metodou pro separaci proteinů je elektroforéza. Elektroforéza využívá rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Rychlost pohybu částic závisí na velikosti náboje a velikosti molekuly.

Nejběžnějším typem elektroforetických metod v analýze proteinů je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Existují dva hlavní typy gelové elektroforézy. Nativní gelové elektroforéza, která probíhá bez denaturačních činidel a proteiny migrují podle svého celkového náboje, velikosti a tvaru. Druhým typem je gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). SDS je aniontový detergent, který denaturuje proteiny a poskytuje jim uniformní záporný náboj. Proteiny se díky tomu separují pouze na základě své molekulové hmotnosti [8,39].

Další elektroforetickou metodou pro separaci proteinů je dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) po které následuje analýza MS. Tato metoda primárně slouží k rozdělení komplexních směsí proteinů podle jejich *pI* a molekulové hmotnosti, ale umožňuje také srovnávat relativní množství proteinů z různých proteinových vzorků. Posttranslačně modifikované proteiny mají různé *pI*, kdy díky přidané, popřípadě ubrané chemické skupině dochází k detekovatelné změně *pI* proteinu. Tato změna je pak ještě více patrná u vícenásobně fosforylovaných proteinů [10,35,37].

Fosfoproteiny oddělené 2D-PAGE mohou být vizualizovány několika způsoby přímo v 2D gelech s použitím fosfospecifických skvrn nebo technikou Western blot. Prvním způsobem je standardní barvení proteinových skvrn pomocí Coomassie Brilliant Blue nebo stříbření. Dalším způsobem může být použití fosfospecifického barvení. Využívá se fluorescenční barva Pro-Q Diamond, která selektivně barví fosfátové skupiny navázané na threoninu, serinu a tyrozinu. Alternativou může také být velmi citlivé radioaktivní značení fosfoproteinů pomocí radioaktivních izotopů ^{32}P nebo ^{33}P a následným radioimunoblotováním. Radioaktivní značení proteinů je možné jak *in vivo*, tak *in vitro*. Buňky v *in vivo* značení se inkubují přímo s ^{32}P . Nevýhodou tohoto značení je, že ^{32}P je po mnoho buněk toxický. Vlivem radioaktivity může docházet k poškození DNA a následné aktivaci systému oprav DNA, případně k apoptóze buněk. Dalším problémem této detekce je, že konstitutivně fosforylované proteiny s nízkým obratem fosfátu obsahují pouze malé množství radioaktivity a tím mohou unikat detekci. *In vitro* značení zahrnuje inkubaci proteinů se specifickými kinázami v přítomnosti [γ - $^{32/33}\text{P}$]-ATP. Za vhodných podmínek se ^{32}P začlení do fosforylované AMK. Hlavní nevýhodou této metody je nespecifická fosforylace cílových proteinů kinázami. Tento problém je způsoben především nepříroze vysokou koncentrací kinázy ve srovnání s koncentrací substrátu [35,37].

Další metoda používaná k detekci specifických proteinů je Western blot (WB). Kombinuje elektroforetickou separaci s imunoafinitní detekcí k identifikaci specifických proteinů. Skládá se ze tří základních kroků. Prvním krokem je separace proteinů podle jejich velikosti za použití SDS-PAGE. Následně jsou separované proteiny přeneseny na membránu elektroblotováním [40,41]. Přítomnost daného proteinu je na membráně detekována pomocí fosfospecifických protilátek. Tato metoda je schopna detekovat velmi malé množství fosfoproteinů, ale specifita a citlivost velmi závisí na použité protilátce. Detekce s využitím protilátky proti fosfoserinu, fosfothreoninu nebo fosfotyrozinu neposkytuje žádné informace o specifických fosforylačních místech proteinu. Musí se proto dále ještě provést MS analýza vyříznutých proteinových skvrn z gelu, která má ovšem také svá úskalí z důvodu společné migrace proteinů. Druhou možností vizualizace je použití protilátek proti specifickým fosforylačním místům v proteinech [32,36].

1.3.2 Chromatografické obohacovací techniky fosfoproteinů

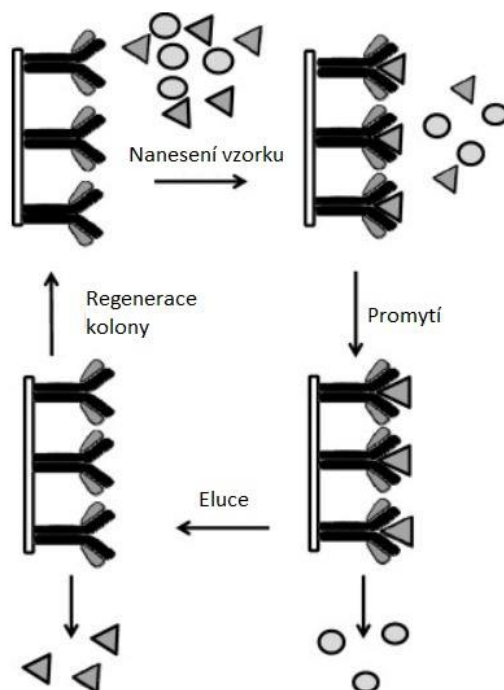
V současné době existují různé strategie fosfoproteomického obohacování. Mezi nejvíce využívané patří zejména afinitní chromatografie, například afinitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC), afinitní chromatografie s oxidem kovu (MOAC) - například chromatografie s oxidem titaničitým, chromatografie s výměnou kationtů (SCX) a další. Žádný postup však nedokáže poskytnout komplexní profil fosfopeptidů a tyto metody jsou vzájemně komplementární [42]. Z těchto metod jsou často IMAC a chromatografie s TiO_2 využívány jako druhý rozměr obohacování fosfopeptidů. V prvním rozměru obohacování a separaci peptidů se využívá nejčastěji separační technika SCX. Jako alternativa k SCX by mohla být také izoelektrická fokusace (IEF) [43].

Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie (AC) se využívá před separací proteinů ke snížení složitosti vzorku, k předkoncentraci a zachycení specifických proteinů/peptidů pro zvýšení citlivosti před MS analýzou. Purifikace proteinových směsí pomocí AC a následná MS analýza slouží pro studium interakcí protein-protein. AC peptidových směsí a MS analýza poskytuje studium PTM míst. AC se také mimo jiné využívá před separací proteinů pomocí 2-DE pro zakoncentrování a předběžnou úpravu vzorků. Dochází k odstranění proteinů, které by mohly rušit separaci pomocí 2-DE, vizualizace proteinů s nízkou koncentrací atd. [44,45].

Principem afinitní chromatografie (obr. 4) je specifická interakce imobilizovaného ligandu a cílového proteinu. Ligand je kovalentně vázaný na nosič. Velký rozsah ligandů umožňuje oddělit různé druhy proteinů z komplexního vzorku. Z komplexních směsí lze také

poměrně snadno izolovat proteiny s PTM, které se ve vzorcích vyskytují v nízkých koncentracích. Pokud mobilní fáze protékající kolonou obsahuje proteiny s vysokou afinitou k ligandu, dojde k jejich zachycení. Proteiny, které nevykazují afinitu k ligandu, kolonou pouze protékají. Vazba mezi ligandem a proteinem musí být dostatečně specifická a reverzibilní, tj. že se protein na ligand váže nekovalentní vazbou. Tím je umožněno šetrné uvolnění proteinu z ligandu. Eluce proteinu je možná dvěma způsoby. Prvním z nich je kompetitivní eluce. Eluce se provádí elučním roztokem obsahující exogenní nebo volný ligand, který soutěží o vazebné místo proteinu s imobilizovaným ligandem na nosiči. Eluční roztok může také obsahovat analyt s vyšší afinitou k ligandu, než má protein a dojde k vytěsnění. Druhou metodou eluce proteinu je změna podmínek, ve kterých protein nevykazuje afinitu k ligandu a z vazby se uvolňuje. Vhodnou změnou podmínek zde bývá nejčastěji mírná změna pH případně změna iontové síly roztoku [18,46,47].



Obrázek 4: Princip afinitní chromatografie. Převzato a upraveno z [45].

Chromatografie na imobilizovaných kovových iontech (IMAC)

IMAC je široce používaná afinitní technika pro obohacování fosfopeptidů před analýzou MS (obr. 6). Obohacuje fosforylované serinové, threoninové i tyrozinové zbytky. IMAC využívá vysokou afinitu fosfátů ke stacionární fázi s kovovým chelátem zejména trojmocných kationtů Fe^{3+} , Ga^{3+} , popřípadě Al^{3+} standardně používaných. Avšak nedávno byly

zavedeny i tetravalentní kationty Ti^{4+} a Zr^{4+} . Pozitivně nabité kovové ionty jsou v koloně imobilizovány na polymerních nosičích různými chelatačními látkami. Nejvíce využívané jsou kyselina nitrilotrioctová a kyselina iminodioctová [38,48]. Zbývající koordinační místo na kovovém iontu umožňuje interakci s fosfátem [30].

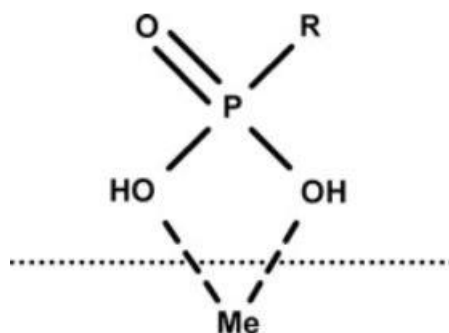
IMAC je založena na přítomnosti negativně nabitých fosfátových skupin. Fosfopeptidy při průchodu kolonou vytvářejí komplexy s kladně nabitými kovovými ionty a tím jsou v koloně zachyceny. Nefosforylované peptidy jsou vymyty z kolony a poté mohou být fosfopeptidy eluovány z kolony pomocí solných či pH gradientů. Nevýhodou této metody je, že nefosforylované peptidy obsahující vícečetné kyselé aminokyselinové zbytky (kyselina asparagová a kyselina glutamová) vykazují také afinitu ke stacionární fázi, čímž se snižuje selektivita metody. Tento problém lze vyřešit derivatizací (esterifikací) karboxylových skupin na kyselých postranních řetězcích aspartátu a glutamátu. Pro zvýšení účinnosti systému IMAC je vhodné zjednodušit peptidový vzorek. Toho lze dosáhnout využitím prefrakcionačních metod jako je imunoprecipitace zmíněná výše, dále pak IEF, iontoměničovou chromatografií nebo hydrofilní interakční chromatografií (HILIC). IMAC je také kompatibilní pro následné dělení a detekci fosfopeptidů pomocí kapilární elektroforézy (CE), LC-MS/MS či MALDI-MS [30,31,37,49,50]. Obdobou IMAC je sekvenční eluce z IMAC (SIMAC), která se využívá k oddělení multifosforylovaných peptidů od monofosforylovaných [37].

Chromatografie s oxidem kovu (MOAC)

Další metodou selektivního obohacování fosfopeptidů je afinitní chromatografie s oxidem kovu (MOAC) založená na specifické afinitě oxidů kovů k fosfátové skupině (obr. 6) [30,35]. MOAC tak představuje důležitou alternativu k IMAC. Nejčastěji používanými materiály jsou oxid titaničitý a oxid zirkoničitý. Další méně používané oxidy kovů zahrnují také oxid cíničitý, oxid hafnia, oxid galia či hydroxyapatit. Většinou se využívají komerčně dostupné částicové sorbenty a obohacování se provádí v dávkovém režimu [51,52]. Oxid titaničitý je vysoce chemicky stabilní, tuhý a má jedinečné amfoterní iontoměničové vlastnosti. TiO_2 je také tolerantní vůči většině používaných pufrů a solí [35]. Mimo jiné vykazuje vysokou afinitu ke sloučeninám obsahující fosfáty. TiO_2 chromatografie je vysoce selektivní pro fosfopeptidy a v offline nastavení představuje poměrně snadné a rychlé provedení bez potřeby drahého vybavení [32]. Proto se offline přístup využívá nejčastěji. Možné je i použití online nastavení, které umožňuje automatizaci. Online přístup je vhodný především pro vzorky s malým omezeným množstvím, protože jsou zde minimalizovány kroky pro zpracování vzorku. Online

nastavení je využíváno zejména v systému LC-MS, kde jsou oxidy kovů imobilizovány v předkolumnách před konečným krokem chromatografické separace [30].

Interakce oxidů kovů se sloučeninami obsahující fosfát je stále zkoumána. Byl prokázán bidentátní charakter vazby fosfátových aniontů k TiO_2 (obr. 5). Interakce oxidu kovu a fosfát mohou být také založené na principu výměny iontů, kde oxidy kovů působí jako Lewisova kyselina. Fosfopeptidy jsou proto neúčinněji obohaceny při nízkém pH. Typický je rozsah pH 2-3 pro zabránění nespecifické vazby nefosforylovaných peptidů díky protonaci jejich karboxylových skupin. Pro zvýšení specifčnosti MOAC se k rozpouštědlům používaných pro vazbu přidávají například kyselina trifluoroctová nebo kyselina mravenčí pro kontrolu pH a acetonitril (50-80%) pro zabránění hydrofobních interakcí se sorbentem [30]. Tyto přídavné látky jsou většinou monokarboxylové, popřípadě dikarboxylové kyseliny, které soutěží s kyselými nefosforylovanými peptidy o vazebná místa oxidu kovu. Příkladem těchto přísad je také kyselina mléčná nebo kyselina 2,5-dihydroxybenzoová vhodnější pro MOAC na TiO_2 či kyselina β -hydroxypropanová pro ZrO_2 . Výhodou je také, že tyto kyseliny snižují afinitu fosfopeptidů k použitým oxidům kovů [36,48].



Obrázek 5: Bidentátní charakter interakce oxidu kovu a fosfátu (Me = kov). Převzato z [30].

Iontově výměnná chromatografie (IEX)

Iontově výměnná chromatografie (IEX) separuje proteiny s rozdílným povrchovým nábojem a separace je tak založena na reverzibilní interakci nabitého proteinu/peptidu a nabité stacionární fáze. Tyto reverzibilní interakce jsou řízeny tak, aby probíhala buď vazba proteinu nebo jeho eluce. Celkový náboj proteinu závisí na počtu a typu ionizovatelných aminokyselinových skupin a mění se v závislosti na pH média. Každý protein má hodnotu pI , která odpovídá pH, při kterém má tento protein nulový náboj a neinteraguje s nabitým sorbentem. Při hodnotách pH média vyšších, než pI proteinu je protein záporně nabitý a při

hodnotách pH nižších, než pI je protein kladně nabitý [53]. Iontově výměnná chromatografie tedy umožňuje separaci jak kationtů, tak aniontů prostřednictvím interakce s nabitou stacionární fází. Funkční skupiny matrice mohou být nabitý jak kladně, tak záporně v závislosti na principu IEX. Pozitivně nabitá matrice váže negativně nabité ionty neboli anionty například ionizované karboxylové kyseliny. Nejčastěji používanými funkčními skupinami jsou kvarterní aminy a diethyl-aminoethylové skupiny. Naopak katex je tvořen částicemi obsahující záporně nabitou funkční skupinu a je schopný vázat kationty, jako jsou například protonované báze. Používají se sulfopropylové nebo karboxymethylové skupiny [54–56]. Jak anex, tak katex můžeme klasifikovat na slabé a silné ionexy. Slabý katex je tvořen slabou kyselinou, která postupně při poklesu pH ztrácí svůj náboj. Sem můžeme zařadit již zmíněnou karboxymethylovou funkční skupinu. Silný katex je tvořen silnou kyselinou, která udrží svůj náboj v širokém rozmezí pH. V tomto případě se používají sulfopropylové funkční skupiny. Slabý anex je tvořen diethyl-aminoethylovými skupinami a silný anex kvarterními aminovými skupinami [55].

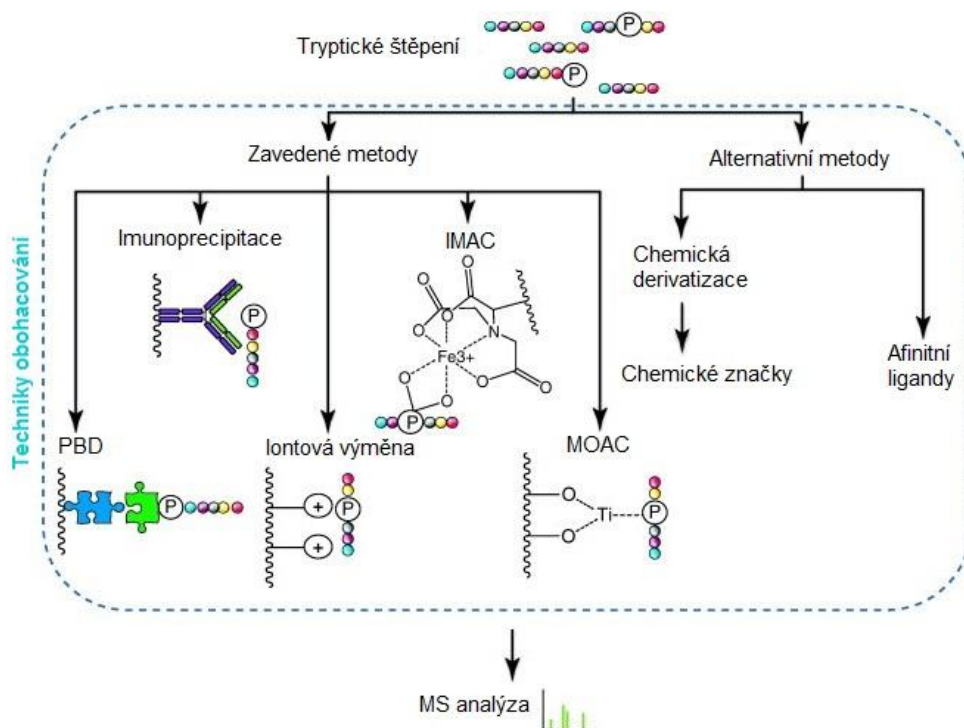
Mobilní fáze obsahuje pufr pro udržení stabilního pH. MF také obsahuje konkurenční iont neboli protiiont, který slouží k vytěsnění iontů analytu ze stacionární fáze. Protiiont má stejný náboj jako ionty vzorku [57]. Proteiny/peptidy se na kolonu vážou při nízké iontové síle. Síla interakce protein-stacionární fáze je dána počtem nábojů na analyzovaných molekulách a na funkčních skupinách. Při změně podmínek jsou navázané proteiny desorbovány. Eluci je možné provést dvojím způsobem, a to buď gradientem soli nebo pH gradientem. Prvním způsobem je tedy zvýšení koncentrace soli, kdy se nejprve začnou eluovat slabě vázané proteiny. Se stoupající koncentrací soli se následně eluují i silněji vázané proteiny. Druhým způsobem je eluce pH gradientem, kdy je nízká konstantní iontová síla a v průběhu eluce dochází pouze ke změně pH elučního roztoku. Eluce také závisí, zda je separace prováděna na silném katexu (SCX) nebo na silném anexu (SAX). Zvýšení pH pufru mobilní fáze v režimu SCX způsobí, že je molekula méně pozitivně nabitá a protein tedy vytváří slabší iontovou interakci se záporně nabitými skupinami stacionární fáze a dojde k poklesu retence. Naopak při snížení pH pufru mobilní fáze se retence zvýší. Přesně opačně je tomu v režimu SAX, kdy zvýšení pH mobilní fáze zvýší i retenci molekul a snížením pH mobilní fáze se molekula stává protonizovanou, tedy méně negativně nabitou a retence je nižší [55,58,59]. Proteiny jsou během eluce pH gradientem zaostřeny v užších pásech, což způsobuje vyšší rozlišení oproti eluci gradientem soli. Další výhodou pH gradientu je, že je poměrně dobře regulovatelný a opakovatelný v širokém rozsahu pH [59]. Při substituci hydroxylových skupin serinu,

threoninu a tyrozinu negativně nabitou fosfoskupinou dojde ke změně *pI* proteinu. Jak je známo, proteiny se eluují v pořadí podle jejich *pI* v pH gradientu, a proto touto změnou *pI* lze nejen oddělit fosforylované proteiny od nefosforylovaných, ale také umožňuje postupnou eluci vícefosforylovaných izoform proteinu. K takovéto eluci je však zapotřebí dostatečně dlouhý gradient [53,59].

IEX konkrétně chromatografie s výměnou kationtů (SCX) se často používá k separaci a předfrakcionaci komplexních směsí obsahující fosforylované peptidy (obr. 6) před analýzou kapalinové chromatografie s reverzní fází LC-MS [60]. Principem obohacování fosfopeptidů založené na silné výměně kationtů je rozdíl nábojových stavů fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů. Separace se provádí při pH menší než 3, kdy karboxylové skupiny kyseliny asparagové a glutamové jsou protonovány a kyslejší fosfátová skupina není. Fosfoskupina uděluje peptidu záporný náboj a z tohoto důvodu se fosfopeptidy na koloně zadržují velmi špatně, popřípadě vůbec. Čím více je peptid fosforylovaný, tím dříve se eluje tzn. nejprve jsou eluovány mnohonásobně fosforylované peptidy, následně difosforylované, monofosforylované peptidy, a nakonec nefosforylované peptidy. Nevýhodou této metody je časná eluce jiných modifikovaných peptidů například N-acetylovaných peptidů či glykopeptidů, které nereagují se stacionární fází, a proto je potřeba ještě další metoda obohacování k oddělení nefosforylovaných peptidů od fosfopeptidů. SCX se díky tomu často používá v kombinaci s IMAC (SCX-IMAC) nebo TiO_2 (SCX- TiO_2). Velkou výhodou SCX je schopnost odstranit detergenty a chaotropní látky, které by následně zhoršovaly MS analýzu [30, 34, 60, 61]. Henrich et al. vyvinuli také dvourozměrnou SCX. Separace se zde provádí při dvou různých kyselých hodnotách pH, což umožňuje obohacení různých tříd fosfopeptidů. Nejprve je separace a eluce provedena při pH 3, kdy dochází k eluci „neutrálních“ fosfopeptidů a následně jsou společně eluovány obvyklé peptidy a „bazické“ fosfopeptidy. Tato koeluce je dále oddělena SCX při pH 1. Peptidy, které neobsahují fosfátovou skupinu nejsou tímto pH ovlivněny, naopak fosfátové skupiny fosfopeptidů při pH 1 jsou protonovány. Změna náboje fosfopeptidů tak umožní jejich účinné obohacení [62,63].

Při iontově výměnné chromatografii na silném anexu (SAX) se na koloně zadržují fosfopeptidy a nefosforylované peptidy protékají kolonou bez zachycení [32,64]. Důležitým faktorem při obohacování fosfopeptidů pomocí SAX je pH nanášecího roztoku. Nefosforylované peptidy obsahují karboxylové skupiny, které při kyselém pH menší než 2 částečně ionizují, jsou nenabité a na anexu se nezadržují [65]. Zatímco fosfopeptidy jsou při tak nízkém pH díky přítomnosti fosfátových skupin záporněji nabité, proto mají na koloně vyšší

retenci. Výhodou SAX oproti SCX je, že nedochází ke ztrátám mnohonásobně fosforylovaných peptidů, protože mají nejzápornější náboj a tudíž se stacionární fází interagují nejsilněji [64,66].



Obrázek 6: Obohacovací techniky pro fosfopeptidy. Převzato a upraveno z [67].

1.3.3 Další obohacovací techniky fosfoproteinů

Kapalinová chromatografie

Další metodou pro separaci proteinů ze směsi je kapalinová chromatografie (LC). V proteomice se LC nejčastěji používá v režimu s reverzní fází (RP-LC), díky kompatibilitě mobilních fází s následnou MS detekcí. Chromatografická separace snižuje počet analytů vstupujících do hmotnostního spektrometru, čímž se sníží potenciál pro potlačení ionizace. Další výhodou zavedení RP-LC před MS analýzou je zakoncentrování analytů a zvýšení citlivosti detekce MS. Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií je tedy klíčovým prvkem kvantitativní proteomiky [9,68].

Obecným principem kapalinové chromatografie je distribuce látek mezi stacionární fází a mobilní kapalnou fází, která protéká kolonou. Nejčastější stacionární fází v RP-LC je nepolární oktadecylsilikagel. Polárnější mobilní fází je směs vody a organického rozpouštědla mísitelného s vodou (acetonitril). Pro denaturaci proteinů/peptidů a pro snížení iontové interakce se stacionární fází, se do mobilní fáze přidává navíc kyselina trifluoroctová, mravenčí

případně octová [9]. Základem separace peptidů je hydrofobní interakce peptidů a stacionární fáze. Peptidy jsou na kolonu nanášeny za podmínek s nízkým organickým rozpouštědlem v mobilní fázi. Peptidy jsou poté eluovány gradientem organického rozpouštědla a uvolňují se z kolony podle síly hydrofobních interakcí se stacionárním nosičem [69,70]. Fosfopeptidy jsou hydrofilní molekuly a proto je jejich retenční na stacionární fázi snížena [71].

Hydrofilní interakční chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je alternativou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro separaci polárních látek. V HILIC se využívají hydrofilní stacionární fáze jako je například oxid křemičitý a hydrofobní organické mobilní fáze. Hydrofilní stacionární fáze obsahuje vodu z pufru, která vytváří vodní vrstvu. To umožňuje rozdělení hydrofilních analytů mezi hydrofilní vrstvu a hydrofobní eluční pufr [72,73]. Na základě silné hydrofilnosti fosfátové skupiny fosforylovaných peptidů lze HILIC použít i pro selektivní obohacení a frakcionaci fosfopeptidů [74]. Peptidy se nanášou na kolonu v organickém rozpouštědle a eluují se gradientem vodného rozpouštědla. Gradientová eluce začíná organickým rozpouštědlem s nízkou polaritou a postupně dochází ke zvýšení hydrofilnosti mobilní fáze zvyšováním obsahu vody. Za optimálních podmínek dochází k separaci fosfopeptidů od nefosforylovaných a kyselých peptidů. Tato metoda je standardní metodou online separace před analýzou MS [73,74].

Zvláštním typem HILIC je elektrostatická repulzně-hydrofilní interakční chromatografie (ERLIC). ERLIC je stejně jako HILIC vhodná metoda pro selektivní izolaci fosfopeptidů po tryptickém štěpení. Principem je elektrostatické odpuzování a hydrofilní interakce. Stacionární fáze má podobný náboj jako analyty, které mají být separované. Bazické aminokyseliny v peptidech jsou odpuzovány stacionární fází a zároveň jsou fosfopeptidy zadržovány ve vodné vrstvě kolem stacionární fáze [73,75].

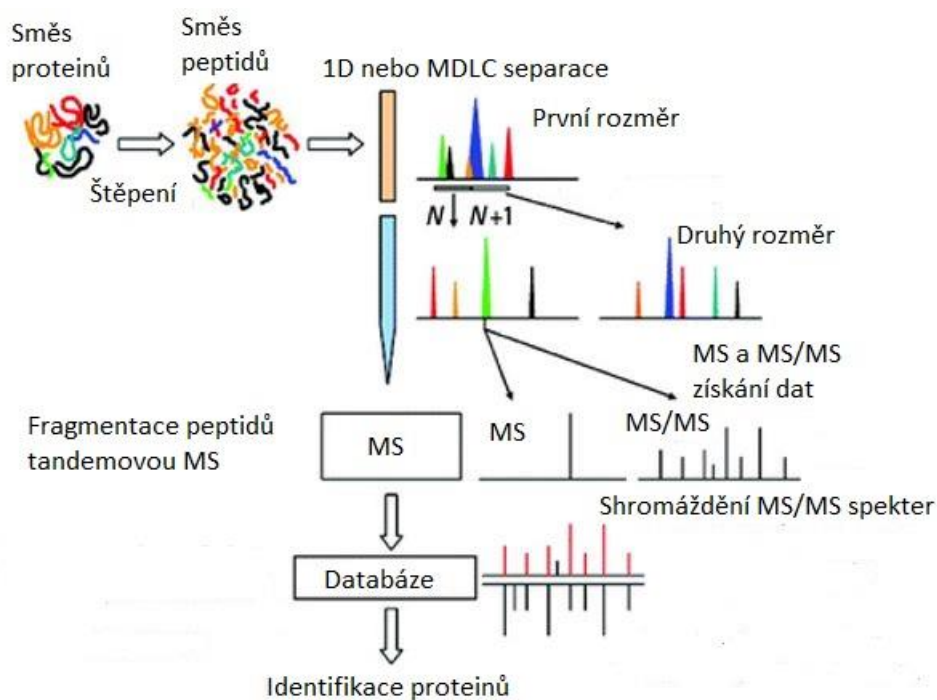
Multidimenzionální kapalinová chromatografie

Komplexní vzorky vyžadují separační techniky, které mají vysokou rozlišovací schopnost. Jeden chromatografický rozměr bývá nedostatečný pro úplné rozdělení komplexních směsí, proto se v současné době v proteomické analýze hojně využívá multidimenzionální kapalinová chromatografie (MDLC). Vzorek je podroben dvěma odlišným separačním mechanismům. Základem je RP-LC v kombinaci s dalšími chromatografickými metodami například SCX, IMAC, HILIC atd. Hlavním cílem je frakcionace vzorků před analýzou

RP-LC/MS [68]. MDLC jsou vyvinuty převážně pro „bottom-up“ proteomiku (obr. 7). Proteiny jsou izolovány z buněčného lyzátu a poté enzymaticky naštěpeny nejčastěji trypsinem. Každý protein je naštěpen na mnoho peptidů (30-50 i více), čímž se výrazně zvyšuje složitost vzorků. Peptidy jsou následně separovány pomocí MDLC a poté analyzovány hmotnostním spektrometrem [76,77]. Výhodou systému MDLC-MS je vysoké rozlišení a vysoká kapacita pro separaci peptidů [78].

SCX/RP-LC je jednou z nejčastěji využívaných kombinací MDLC systému pro separaci peptidů. V prvním rozměru jsou peptidy rozděleny na frakce podle svého náboje a ve druhém rozměru (RP-LC) se v každé frakci z SCX-LC dělí peptidy na základě hydrofobicity. Vysoká účinnost separace je dána zejména kombinací vysoce ortogonálních separačních mechanismů, které mají odlišené separační principy. Vhodnou ortogonalitu zajišťuje také kombinace HILIC/RP-LC [68]. RP-LC je velmi často používána jako druhý rozměr, protože je kompatibilní s MS [79].

Podle způsobu přenosu vzorku z první dimenze na druhou může MDLC probíhat v online i v offline režimu. Online MDLC lze rozdělit na „heart-cutting“ a „comprehensive“ LC. Hlavním rozdílem mezi těmito dvěma technikami je množství separované směsi, která se přenáší z prvního rozměru do druhého. Při „heart-cutting“ provedení jsou do druhého rozměru přenášeny pouze frakce vzorku, které obsahují cílovou látku. V „comprehensive“ provedení se separuje celá komplexní směs oběma rozměry [77]. Hlavní výhodou online provedení je, že nedochází ke ztrátě vzorku. Nevýhodou je omezená flexibilita následné analýzy získaných frakcí. Online režim je vhodný zejména pro analýzu omezených množství vzorků případně nestabilních sloučenin. V offline provedení jsou vzorky rozděleny v prvním rozměru a poté se sbírají frakce, které jsou pak nanášeny a rozděleny ve druhém rozměru. Zvyšuje se tedy pravděpodobnost vzniku chyb a velkou nevýhodou jsou ztráty vzorku a nízká reprodukovatelnost. Výhodou offline frakcionace je flexibilnější analýza. Umožňuje dávkování většího množství počátečních vzorků, více cyklů separace každé frakce, další zpracování vzorků po frakcionaci, ale také analýzu každé frakce na různých typech hmotnostního spektrometru, které mohou poskytovat různé informace atd. Využívá se hlavně pro analýzu velmi složitých vzorků [68,78].



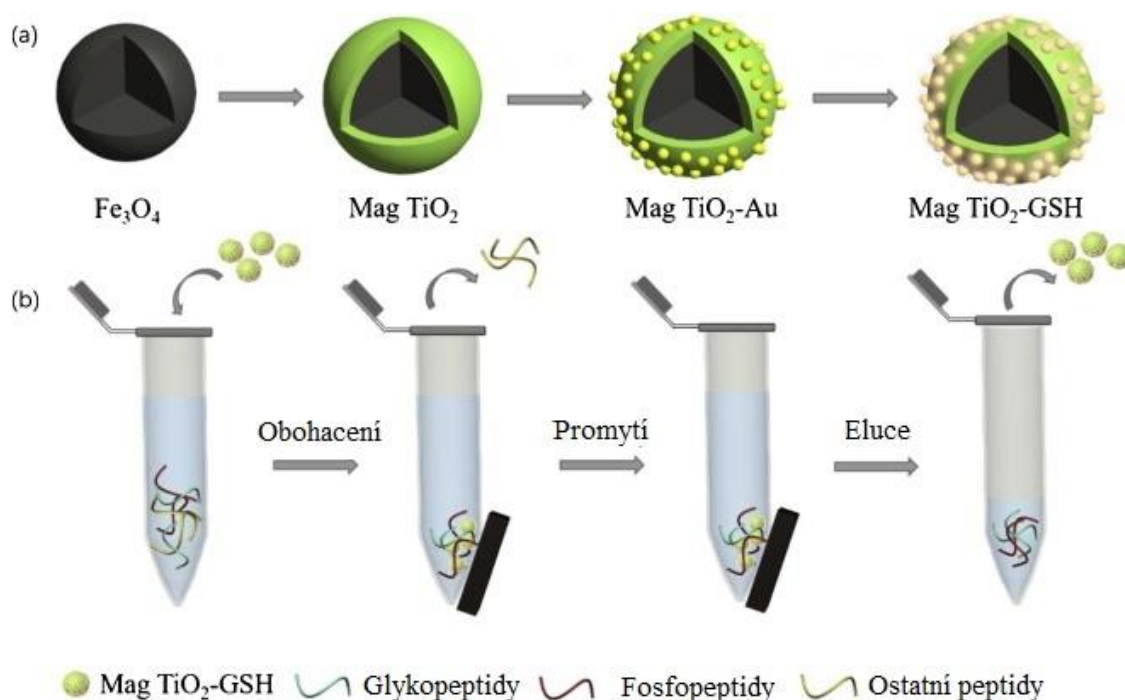
Obrázek 7: Typický experimentální postup pro „bottom-up“ proteomiku s MDLC separací. Převzato a upraveno z [69].

1.3.4 Nové trendy v izolaci fosfoproteinů

Pro zlepšení účinnosti extrakce během obohacování fosfopeptidů je snaha o vývoj a používání různých druhů technik a materiálů. Příkladem je používání polymerů, mezoporézních materiálů a nanomateriálů, které zvyšují účinnosti extrakce díky jejich vysokému specifickému povrchu. Navíc mezoporézní materiály a nanomateriály mají také speciální vlastnosti povrchu, které účinně zlepšují obohacování fosfopeptidů [63]. Vznik nanomateriálů umožnilo rychlé, efektivní a pohodlné separace a obohacení makromolekul proteomu. Proto je v poslední době trendem vývoj různých druhů nanočástic nejen v MOAC. Typické jsou magnetické kuličky o velikosti nm, které se skládají z magnetitového jádra potažené tenkou vrstvou oxidu kovu. Nanomateriály mají velký poměr povrchu k objemu a poskytují tak větší kontakt s cílovými analyty, což podporuje jejich obohacování. Další výhodou nanomateriálů je také to, že vykazují lepší vazebnou kapacitu oproti konvenčním afinitním sorbentům. Nanočástice mohou být imobilizovány v koloně na povrchu částicových nebo monolitických nosičů. Nespornou výhodou magnetického jádra částice je také snadné odstraňování nechtěných nenavázaných analytů přítomných v roztoku vzorku [30,65,80–82].

V současné době je snaha vyvinout nové strategie a materiály pro obohacení fosfopeptidů a glykopeptidů zároveň. Dochází ke spojení zejména HILIC pro obohacení glykopeptidů

a MOAC (hlavně TiO_2) pro obohacení fosfopeptidů. Tyto strategie vyžadují návrh nových multifunkčních materiálů obsahující hydrofilní skupiny a oxidy kovů, které by současně využívaly jak výhod MOAC, tak HILIC [83]. Xu et al. navrhli a syntetizovali selektivní $\text{SiO}_2\text{-NH}_2@ \text{TiO}_2$ duté mikrokuličky. Tyto mikrokuličky byly úspěšně aplikovány na současné obohacení jak fosfopeptidů, tak glykopeptidů jedním materiálem s různými funkcemi. Nicméně kvůli nedostatečné afinitní schopnosti $\text{SiO}_2\text{-NH}_2@ \text{TiO}_2$ mikrokuliček nebylo obohacení fosfopeptidů a glykopeptidů dostatečně uspokojivé, proto je nutné zkoumat další multifunkční materiály pro současné obohacení fosfopeptidů a glykopeptidů [84,85]. Dalším takovým příkladem je právě příprava magnetických hybridních nanokompozit na bázi oxidu titaničitého. V tomto případě je k vrstvě oxidu titaničitého na povrchu magnetické částice vázán glutathion (GSH) prostřednictvím vazebné interakce mezi thiolovou skupinou GSH a nanočásticemi zlata. Vznikají tedy hydrofilní magnetické částice tzv. Mag $\text{TiO}_2\text{-GSH}$ (obr. 8), které mají díky TiO_2 a GSH afinitu k fosfopeptidům i glykopeptidům a zároveň díky jádru částic z Fe_3O_4 je poměrně usnadněna a urychlena separace chtěných analytů od kapaliny [84].

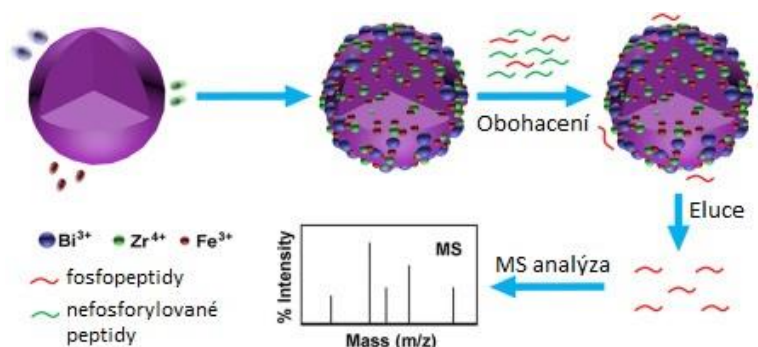


Obrázek 8: Schématické znázornění a) syntézy magnetických částic Mag $\text{TiO}_2\text{-GSH}$
b) současné obohacení fosfo i glykopeptidů pomocí Mag $\text{TiO}_2\text{-GSH}$. Převzato a upraveno z [84].

Stejně tak jako jsou spojeny HILIC a MOAC pro separaci glykoproteinů a fosfoproteinů, mohou být spojeny i principy HILIC a IMAC. V tomto případě se využívá magnetických mesoporézních mikročástic oxidu křemičitého (Mag-MSMs), které jsou modifikovány

polyethyleniminem (PEI), kyselinou fytoovou (PA) a ionty Ti^{4+} . Takovéto částice jsou označovány Mag-MSMS@PEI-PA- Ti^{4+} [86]. Dalším příkladem mohou být grafenové částice modifikované PEI, PA a Ti^{4+} (MagG@PEI@PA- Ti^{4+}) [87]. Kyselina fytoová použitá jako modifikační materiál má v tomto případě mnoho výhod. Díky šesti fosfátovým skupinám ve struktuře poskytuje silná afinitní místa pro vazbu kovových iontů například Ti^{4+} a tím vzniká afinitní materiál IMAC pro separaci fosfopeptidů. Na základě dobré hydrofilnosti PEI i PA mohou být separovány glykopeptidy přes hydrofilní interakce. Vzniká tak dvouúčelový materiál, který podle různých vazebných schopností umožňuje současné obohacení fosfopeptidů a N-glykopeptidů. Za použití různých vazebných podmínek obohacení, lze dosáhnout selektivního obohacení buď fosfopeptidů nebo glykopeptidů [86, 87].

Zhu et al. ve své studii představili vývoj nového nanokompozitu pro separaci a obohacení fosfopeptidů. Vytvořili $TiO_2/Bi/Fe/Zr$ nanokompozit, kde byly na komerčně dostupné nanočástice TiO_2 současně včleněny tři kovové kationty Bi^{3+} , Fe^{3+} a Zr^{4+} (obr. 9). Tento nový nanokompozit vykazoval nižší detekční limit a vyšší selektivní vazbu fosfopeptidů z jednoduchých i komplexních směsí [88].



Obrázek 9: Modifikace TiO_2 nanočástic a analýza fosfopeptidů. Převzato a upraveno z [88].

Pro zlepšení specifčnosti obohacování fosfopeptidů bylo vyvinuto mnoho různých materiálů. Takovým příkladem nového afinitního materiálu může být i kompozit PAA-Ti/ TiO_2 vyroben koordinací titanu s polyakrylátem (PAA). Díky přítomnosti silně hydrofilních karboxylových skupin je inhibována nespecifická vazba kyselých nefosforylovaných peptidů a oxid titaničitý umožňuje selektivní obohacení fosfopeptidů. Vynikající citlivost, vysoká selektivita i dobrá regenerace PAA-Ti/ TiO_2 kompozit po obohacování fosfopeptidů představuje velký potenciál tohoto materiálu ve výzkumu fosfoproteomu [89].

Dalším příkladem pro selektivní obohacení fosfopeptidů může být materiál pro afinitní chromatografii s imobilizovanými kovovými ionty na bázi gadolinia, který navrhli Jiang et al. Na povrch magnetické nanočástice potažené glutationem byl imobilizován Gd^{3+} iont, který vykazuje specifickou afinitu k fosfátovým skupinám GSH obsahuje různé koordinační skupiny včetně karboxylu, aminu thiolu a amidu a umožňuje tak poměrně silné koordinační interakce přes karboxylové skupiny s prvky vzácných zemin mezi které patří i gadolium. V této studii byl tak poprvé pro obohacení fosfopeptidů využit IMAC materiál na bázi Gd^{3+} s GSH jako chelatačním činidlem. Díky vysoké selektivitě materiálu by mohla mít tato nová strategie obohacování velký potenciál pro budoucí výzkum fosfoproteomu [90].

Neexistuje však žádná metoda, která by byla schopna poskytnout komplexní profil celého fosfoproteomu. IMAC obohacuje více multifosforylované peptidy, zatímco MOAC monofosforylované peptidy. Da-Song et al. vytvořili hybridní materiál, který tyto dvě metody spojuje. Připravili nanočástice $Fe_3O_4@nSiO_2@mSiO_2/TiO_2-Ti^{4+}$, které spojují výhody pro obohacení mono a multifosforylovaných peptidů. V těchto částicích je na povrch oxidu křemičitého nanosená vrstva TiO_2 a následně jsou pomocí propyl-methyl-fosfonátu chelatovány ionty Ti^{4+} . Takovéto částice mají vysokou povrchovou plochu, vysokou adsorpční kapacitu i dobrou citlivost pro obohacování fosfopeptidů z komplexních směsí [65].

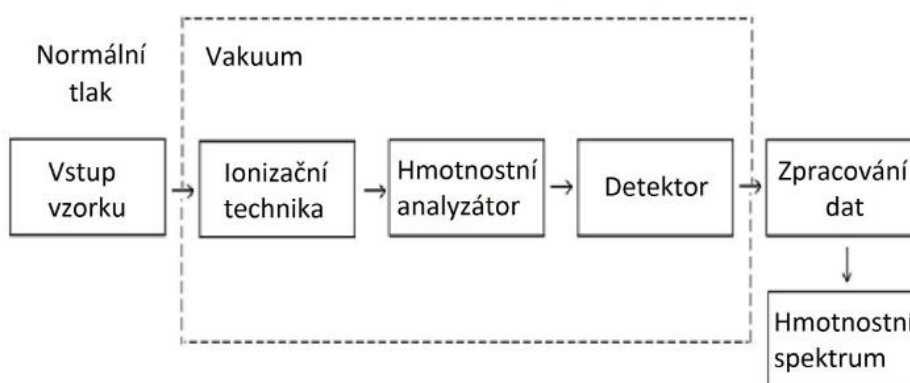
V roce 2016 byly také poprvé připraveny a úspěšně použity magnetické částice na bázi magnetického grafitového nitridu uhlíku $g-C_3N_4$. Tyto částice byly vyvinuty pro obohacení fosfopeptidů na anexu (AEX). $g-C_3N_4$ byl imobilizován na $Fe_3O_4@SiO_2$ částice tepelnou polykondenzací. Magnetický $g-C_3N_4$ sorbent je v kyselém prostředí stabilní a minimalizuje nespecifickou adsorpci. Velké množství dusíku na povrchu částic zvýšilo vazebnou kapacitu a tím se zlepšila i retence fosfopeptidů. Zavedení tohoto magnetického $g-C_3N_4$ by mohlo mít potenciál pro zlepšení obohacování fosfopeptidů v režimu AEX [65,91].

1.4 Hmotnostní spektrometrie

1.4.1 Princip

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda. V hmotnostním spektrometru dochází k ionizaci původně neutrálních molekul na ionty. Ionty jsou následně v hmotnostním analyzátoru rozděleny podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) v elektrostatických, magnetostatických nebo elektromagnetických polích [92]. Výsledný záznam signálů z detektoru je zpracován ve formě hmotnostních spekter, kde osa x je poměr hmotnosti a náboje jednotlivých iontů a osa y relativní množství.

Existuje mnoho typů hmotnostních spektrometrů díky velkému počtu kombinací ionizačních metod a hmotnostních analyzátorů pro separaci iontů. Společným znakem většiny hmotnostních spektrometrů je, že ionizace a iontová separace probíhají z pevné nebo kapalné fáze v plynné fázi ve vakuu, kdy analyzované sloučeniny musí být odpařeny a přeneseny do vakua buď před nebo během ionizace. Dalším důležitým znakem hmotnostních spektrometrů je, že jsou spojitelné se separačními technikami jako je plynová chromatografie nebo HPLC. Všechny hmotnostní spektrometry se skládají ze tří základních částí: iontový zdroj, analyzátor a detektor částic (obr. 10) [92,93].



Obrázek 10: Schéma hmotnostního spektrometru.

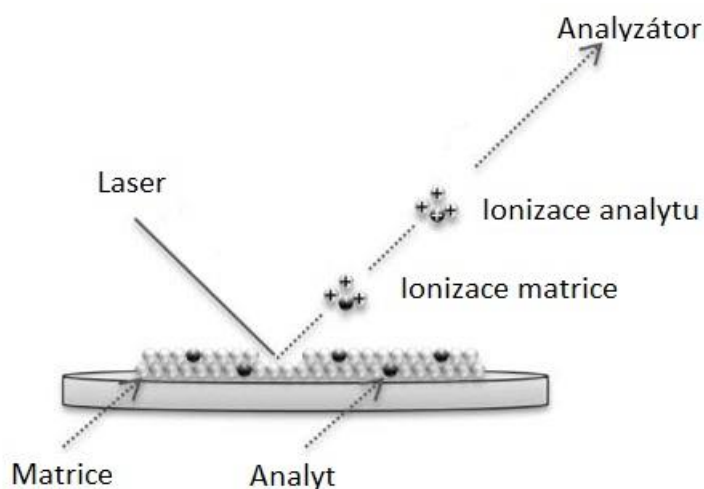
1.4.2 Vybrané ionizační techniky

Ionizace vzorku je důležitým krokem, který se provádí v iontovém zdroji. V závislosti na analyzované molekule je třeba použít různých ionizačních metod. Například netěkavé molekuly citlivé na teplo, jako je většina biomolekul, nemohou být ionizovány elektronovou ionizací [92]. Tato metoda je typickým zástupcem tvrdých ionizačních technik. K ionizaci

biomolekul mezi které patří i fosfoproteiny/fosfopeptidy se používají zejména měkké ionizační techniky, například ionizace elektrosprejem (ESI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) atd. Tyto měkké ionizační techniky ionizují velké molekuly bez ovlivnění jejich integrity [93]. V případě proteinů/peptidů musí ionizační zdroj nejen ionizovat molekuly, ale musí také produkovat desolvatované ionty v plynné fázi. Z tohoto důvodu se k ionizaci proteinů využívají výhradně ESI nebo MALDI [94].

Ionizace laserem za účasti matrice

MALDI patří mezi laserové desorpční ionizace a celý proces probíhá ve vakuu. Tato metoda je tříkroková, kdy nejprve před ionizací dochází ke smíchání vzorku s matricí, které jsou společně nanášeny na spotu destičky. Poté matrice v hmotnostním spektrometru absorbuje ultrafialové (UV) světlo z laserového paprsku. Tím dochází k ohřátí části matrice, která se desorbuje a nese neporušené molekuly analytu (obr. 11). Současně dochází k ionizaci matrice, která předává náboj analytu a dochází také k jeho ionizaci [93–95]. Nejčastěji jsou používány dusíkové UV lasery, pro které se používají různé matrice například, kyselina α -kyani-4-hydroxyskořicová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová apod. Všechny tyto matrice mají absorpci kolem 337 nm, což je vlnová délka N_2 laseru [92].

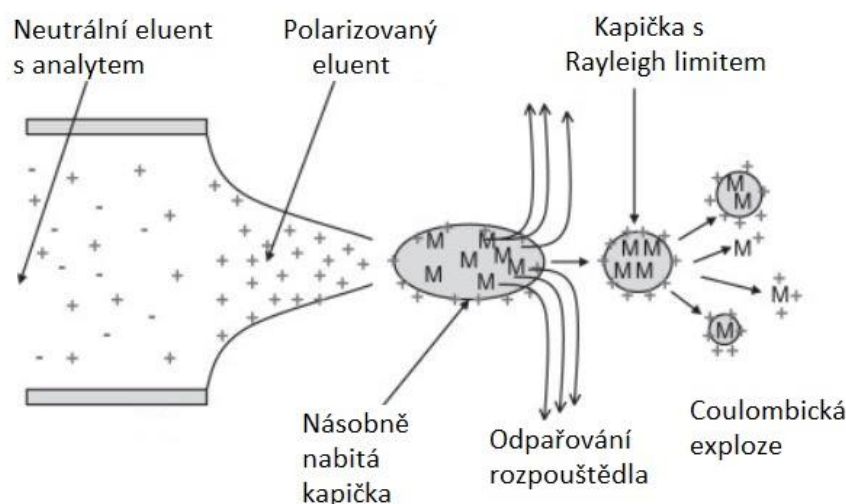


Obrázek 11: Ionizace laserem za účasti matrice. Převzato a upraveno z [93].

Ionizace elektrosprejem

Principem ESI je průchod rozpuštěného analytu kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (2-5 kV). Elektrosprej je vytvořen v důsledku velkého rozdílu elektrostatického potenciálu mezi hrotem kapiláry a elektrodou. V přítomnosti velkého elektrostatického pole jsou vznikající kapičky na hrotu kapiláry polarizovány. Kapičky nesou

na svém povrchu velké množství nábojů a pomocí proudícího zmlžujícího plynu (dusíku) vytvářejí aerosol. Rozpouštědlo je následně z nabitých kapiček odpařováno a dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty tzv. „Rayleighova“ limitu dochází ke Coulombické explozi a rozpadu kapky na ještě menší kapičky. Opakováním tohoto procesu vznikají menší a menší kapičky a při zmenšení na určitou mez dochází k uvolnění iontů z povrchu kapiček do plynné fáze. Tyto ionty jsou následně vedeny do analyzátoru a detektoru [92, 93]. Vlastností ESI je, že ionty mohou získat i vícenásobné náboje. Pro proteiny/peptidy lze získat ionty s různými poměry m/z. Peptidy štěpené trypsinem bývají obvykle dvakrát až třikrát nabitě a poměrně snadno se fragmentují i s nižší aktivační energií [94]. Nevýhodou je potlačení ionizace analytu, pokud jsou ve stejném okamžiku přítomny také různé soli ze vzorků, které mají řádově vyšší koncentrace a snáz se ionizují. Této nevýhodě lze předcházet vhodnou separací analytu od složek potlačujících jeho ionizaci. Nejčastěji se používá kapalinová chromatografie [93].



Obrázek 12: Ionizace elektrosprejem. Převzato a upraveno z [92].

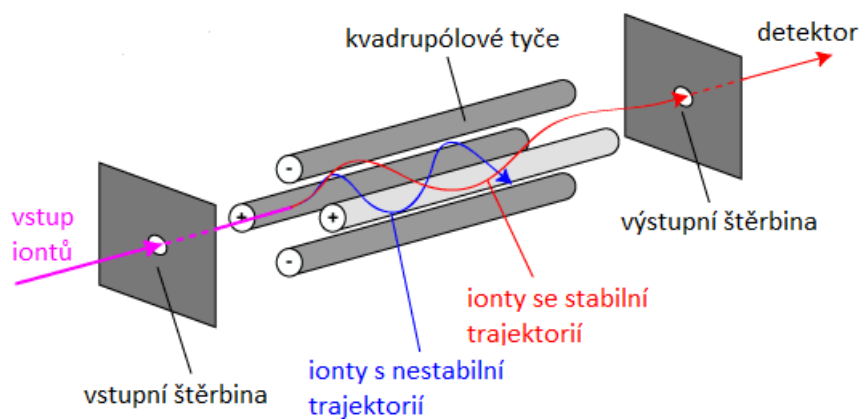
1.4.3 Vybrané hmotnostní analyzátoary

Analyzátoar slouží k oddělení získaných iontů v iontovém zdroji. Hmotnostní analyzátoar používá pro separaci iontů fyzikální vlastnosti, zejména elektrické nebo magnetické pole [94]. V proteomice mohou být použity různé hmotnostní analyzátoary ve spojení se správným zdrojem iontů, který lze použít pro ionizaci proteinů a peptidů. Nejčastěji se používají kvadrupóly (Q), analyzátoary doby letu (TOF) a iontové pasti, případně jejich kombinací vznikají hybridní analyzátoary. Kombinují schopnosti různých analyzátoarů a jsou to například

Q-TOF, Q-q-Q, TOF-TOF, LTQ Orbitrap, Q Orbitrap apod. Hmotnostní analyzátoři jsou velmi důležitou a neustále se rozvíjející složkou hmotnostních spektrometrů [94,96–98]

Kvadrupól

Kvadrupólový hmotnostní analyzátoř se skládá ze čtyř rovnoběžných tyčí (obr. 13), na které je vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. Na dvě protilehlé tyče je současně vedeno také kladné stejnosměrné napětí a na další dvě je aplikováno záporné stejnosměrné napětí. Ionty uvnitř kvadrupólu oscilují a pro danou hodnotu stejnosměrného a střídavého napětí jsou stabilní oscilace pouze pro definovaný rozsah hodnot m/z . Ionty se stabilní trajektorií prochází analyzátořem do detektoru. Ionty s nestabilní oscilací jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu a tím se nedostávají do detektoru. Postupnou změnou velikosti střídavého a stejnosměrného napětí lze proskenovat zvolený rozsah m/z hodnot [94,99,100].

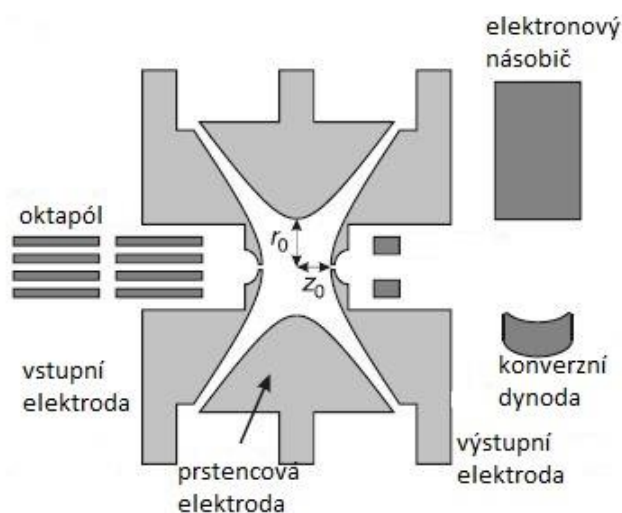


Obrázek 13: Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoř. Přeřvato a upraveno z [101].

Iontová past

Iontová past (IT) se skládá z jedné prstencové elektrody (obr. 14) a ze dvou hyperbolických koncových elektrod, které slouží jako koncové uzávěry. Na elektrody je vloženo napětí. Ionty generované ve zdroji jsou do pasti přiváděny krátkým napěťovým pulzem a procházejí vstupním otvorem koncové elektrody. Uvnitř pasti se za stabilních podmínek ionty pohybují po složitých drahách. Postupnou změnou amplitudy na prstencové elektrodě získávají ionty nestabilní oscilace a podle m/z jsou vypuzovány výstupním otvorem koncové elektrody na detektor. Uvnitř pasti se také nachází tlumící plyn, nejčastěji helium. Pomáhá při zachytávání iontů, tlumí oscilace v ose z a udržuje tak ionty ve středu pasti. Přítomností plynu jsou výrazně zvýšeny citlivost a hmotnostní rozlišení [99,100].

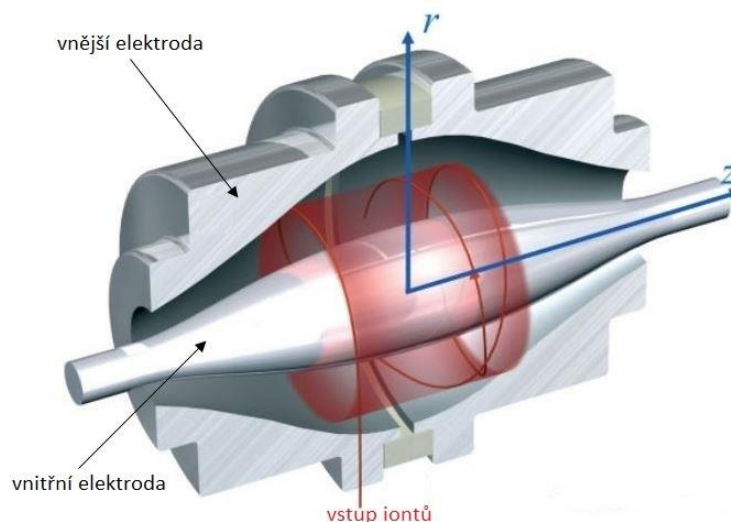
IT existuje i v lineárním uspořádání (LIT). Výhodou LIT je vyšší kapacita pasti akumulace iontů i lepší účinnost jejich zachycení. Je tvořena hyperbolickými tyčemi a ve středové části pasti jsou ionty zadržovány aplikací vhodného napětí na tyče. Následně jsou ionty z pasti vypuzovány přivedením rezonančního signálu [102,103]



Obrázek 14: Schéma iontové pasti (IT). Převzato a upraveno z [100].

Orbitrap

Hmotnostní analyzátor Orbitrap je iontová past bez vysokofrekvenčního napětí nebo magnetického pole. Má poměrně vysokou rozlišovací schopnost (více než 100 000) a vysokou přesnost určení hmoty (pod 1 ppm s interní kalibrací). Orbitrap se skládá ze dvou vnějších elektrod a jedné centrální elektrody (obr. 15). Mezi elektrodami je aplikováno stejnosměrné napětí. Ionty jsou v Orbitrapu zachyceny elektrodynamickým stlačením a následně rotují kolem vnitřní elektrody a zároveň i kolmo na ni v ose z , přičemž elektrostatická přitažlivá síla je v rovnováze s odstředivou silou rotujícího iontu. Různé ionty oscilují s různou frekvencí podél osy z podle jejich m/z a to vede k měření jejich m/z hodnot. Frekvence oscilace iontů jsou pomocí Fourierovy transformace převedeny na hmotnostní spektra [97,104–106].



Obrázek 15: Schéma orbitrapu. Převzato a upraveno z [106].

1.4.4 Detektory

Detektor přeměňuje energii příchozích iontů z analyzátoru na signál, který je následně měřen elektronickými zařízeními a přenesen do počítače, kde vzniká hmotnostní spektrum. Detektory jsou využívány téměř u všech analyzátorů s výjimkou Orbitrapu a iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací, kde je analyzátor zároveň i detektorem. Nejčastěji jsou používané tři typy detektorů – elektronový násobič, fotonásobič a Faradayova klec [99,100].

1.4.5 MS analýza fosfoproteinů

Hmotnostní spektrometrie se používá buď pro měření molekulové hmotnosti polypeptidu nebo pro stanovení dalších strukturních znaků, včetně aminokyselinové sekvence nebo místa připojení a typu PTM. PTM proteinu vede k hmotnostnímu přírůstku případně deficitu vzhledem k molekulové hmotnosti aminokyselinové sekvence bez PTM. Například fosforylace serinu vede ke zvýšení molekulové hmotnosti o 80 Daltonů (Da) to znamená, že molekulární hmotnost serinového zbytku se zvýší z 87 Da na 167 Da. Přesným stanovením molekulové hmotnosti intaktního proteinu pomocí MS může být tento hmotnostní přírůstek detekován. Modifikované oblasti proteinů jsou dále charakterizovány také mapováním peptidové hmoty a dalším enzymatickým štěpením proteinu. Fosforylovaný protein je enzymaticky štěpen na směs peptidů, které jsou analyzovány pomocí MS pro detekci hmotnostního přírůstku opět 80 Da na jednu fosfátovou skupinu v peptidu. Porovnáním s předpokládanou molekulovou hmotností jednotlivých peptidů se zkoumá změřená molekulová hmotnost naštěpených peptidů

[107,108]. Problémem je sulfonace, která způsobuje téměř stejný posun hmoty jako fosforylace. Proto je analýza naštěpené směsi fosfopeptidů často kombinována s použitím fosfatázy, která specificky odštěpuje fosfátové skupiny na peptidu. Tato hmotnostní změna je pomocí MS detekována jako úbytek 80 Da [26].

Dalšími PTM, které mohou být identifikovány pomocí MS jsou například acetylace, která zvyšuje molekulovou hmotnost o 42 Da, methylace +14 Da, N-glykozylace >800 či disulfidické můstky, které molekulovou hmotnost naopak snižují přibližně o 2 Da [23].

Identifikace a charakterizace fosfopeptidů v komplexní směsi není však možná bez předchozích obohacovacích kroků díky jejich nízké koncentraci ve vzorcích. V přítomnosti nefosforylovaných peptidů dochází k potlačení signálu fosfopeptidů, což je nežádoucí. Důvodem je zejména vliv fosfátové skupiny na ionizaci fosforylovaných peptidů v MS čímž dochází ke snížení ionizační účinnosti fosfopeptidů v přítomnosti nefosforylovaných peptidů ve vzorku, které mají obvykle účinnější ionizaci. Dochází k potlačení intenzity signálu a k nižší detekci fosfopeptidů v přítomnosti nefosforylovaných peptidů. To činí analýzu náročnou a pro zvýšení ionizační účinnosti, detekční citlivosti a efektivnější charakterizaci fosfopeptidů se před analýzou MS provádí obohacování fosforylovaných peptidů z komplexních peptidových směsí. I přesto jsou vzorky často velmi složité pro hloubkovou charakterizaci pomocí MS, proto se může před obohacováním provádět i předfrakcionační krok například kapalinovou chromatografií. Důležitá je tedy před MS analýzou vhodná izolace a purifikace fosfopeptidových vzorků (viz kapitola 1.3) [29,31,32,36,38].

Přestože MS za poslední roky ve svém vývoji velmi pokročila a v současné době je možné kvalitativně i kvantitativně monitorovat tisíce fosforylací proteinů je MS analýza fosforylací proteinů stále náročná. To je způsobeno zejména díky substechiometrické fosforylaci proteinů a vnitřní lability fosfátové skupiny. Problémem je také jednoznačná lokalizace fosforylovaných míst v identifikovaných fosfopeptidech. Protože fosfátová skupina je poměrně labilní může docházet k její ztrátě a to buď jako ztráta neutrální kyseliny fosforečné H_3PO_4 nebo jako ztráta metafosforečné kyseliny HPO_3 . Přestože tyto ztráty nenarušují identifikaci fosfopeptidů, mohou bránit správné identifikaci fosforylovaných míst v peptidu [109].

1.4.6 Identifikace proteinů

V současné době existuje mnoho prohledávacích programů jako jsou například Mascot, Sequest, Protein Prospector a další, které pomocí různých algoritmů porovnávají získaná experimentální hmotnostní spektra s daty v proteinových databázích. Výsledkem je identifikace konkrétních proteinů a peptidů. Stejně jako existují různé srovnávací nástroje, tak jsou k dispozici i různé proteinové databáze ve kterých lze data o proteinech vyhledávat. Příkladem jsou proteinové databáze na serveru UniProt (SwissProt, TrEMBL) [97,110].

Existují i různé přístupy pro identifikaci peptidů. Metody se dají rozdělit na metody *de novo*, které analyzují spektra bez referenčních peptidů, či metody databázového vyhledávání, kde jsou naměřená spektra porovnávána s teoreticky predikovaným spektrem pro každý peptid v databázi. Dále jsou to hybridní metody, které jsou kombinací předcházejících dvou přístupů a poslední metodou je vyhledávání v knihovnách, kdy se naměřená spektra porovnávají s dříve změřenými a anotovanými spektry peptidů [111].

Cíle diplomové práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo optimalizovat chromatografickou metodu separace fosfoproteinů konkrétně mikrogradientovou separací a frakcionací fosfopeptidů na stacionární fázi s oxidem titaničitým a s gradientem pH v mobilní fázi. Dalším cílem bylo také porovnání účinnosti této mikrogradientové separace s účinností izolace fosfopeptidů pomocí vsádkového uspořádání.

Seznam cílů diplomové práce:

- Příprava vzorku pro analýzu – tryptické štěpení analyzovaných proteinů.
- Osvojení standardní metody obohacení fosfopeptidů na oxidu titaničitém.
- Příprava kapilárních kolonek s reverzní fází nebo oxidem titaničitým.
- Purifikace peptidů mikrogradientovým zařízením.
- Tvorba mobilní fáze s gradientem pH v mikrostříkačce.
- Frakcionace fosfopeptidů mikrogradientovým zařízením s oxidem titaničitým jako stacionární fází s gradientem pH v mobilní fázi.
- Frakcionace vzorků obsahujících fosfopeptidy:
 1. jednoduchá směs obsahující naštěpený fosfoproteinu;
 2. komplexní směs peptidů pocházející z naštěpeného celobuněčného lyzátu.

2 Experimentální část

2.1 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy Kern ABT-220-5DM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- FEP hadička 1/16'' OD × 0,25 mm ID (VICI AG+, dodavatel Labicom, Olomouc, ČR)
- hmotnostní spektrometr MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- hmotnostní spektrometr Q Exactive (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- insulinová stříkačka bez jehly, objem 100 µl, (Becton Dickinson (BD), New York, NJ, USA)
- kapalinový chromatograf UltiMate 3000 HPLC system (Dionex, USA)
- kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC systém (Dionex, USA)
- koncentrátor Concentrator Plus 5305 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- MALDI deska 384 Well Plate (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- mikrostříkačka Hamilton (25 µl, 100 µl, 250 µl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- mikrozkušavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- skleněný filtr 9.0 (Whatman, Maidstone, UK)
- stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- špičky GELoader (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- termomixér TS-100 (Biosan, Riga, Litva)
- třepačka Vortex mixer Wx (Velp Scientifica, Usmate, Itálie)
- ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Berlín, Německo)

2.2 Chemikálie a reagensie

- Acetonitril (ACN; Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- Amoniak vodný roztok (Penta, Chrudim, ČR)
- Bis-Tris propan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dithiotreitol (DTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Penta, Chrudim, ČR)
- Hydrogencitrát dvojamonný (DAHC; Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- Hydrogenfosforečnan disodný·12 H₂O (Penta, Chrudim, ČR)
- Hydrogenuhličitan amonný (ABC; Penta, Chrudim, ČR)
- Hydroxid amonný (NH₄OH, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Jodoacetamid (IAC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB; LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, Francie)
- Kyselina mléčná (LA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová (Lach:ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina o-fosforečná (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Kyselina skořicová (CHCA; Honeywell Fluka, New Jersey, USA)
- Kyselina trifluoroctová (TFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Modifikovaný trypsin (Promega, Madison, WI, USA)
- Octan sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Surfaktant RapiGest SF (Waters, Milford, MA, USA)

2.3 Nosiče

- Kinetex EVO C18 resin, 2,6 µm (Phenomenex, USA)
- POROS Oligo R3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Částice oxidu titaničitého Titansphere, 5 µm a 10 µm (GL Sciences, Japan)

2.4 Vzorky

- α-kasein (ACAS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fosvitin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Celobuněčný lyzát Jurkat buněk (T-buněčný lymfom) naštěpený trypsinem

2.5 Proteolytické štěpení α -kaseinu pomocí trypsinu

Roztoky

- 50 mM ABC
- 200 mM DTT v 50 mM ABC
- 400 mM IAC v 50 mM ABC
- 20% TFA
- roztok modifikovaného trypsinu (20 μ g rozpuštěných ve 100 μ L 50 mM ABC)

Postup

Ke 100 μ g vzorku proteinu rozpuštěného v 55 μ L roztoku 50 mM ABC bylo přidáno 10 μ L 200 mM DTT. Roztok byl inkubován 30 min při teplotě 60 °C v termomixéru při 450–500 rpm. Po vychlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 10 μ L 400 mM IAC a roztok byl opět inkubován 30 min v temnu při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 10 μ L 200 mM DTT a proběhla inkubace 15 min při laboratorní teplotě k neutralizaci přebytečného IAC. Během neutralizace byl připraven roztok trypsinu v objemu potřebném ke štěpení, který byl 15 min zahříván při 30 °C v inkubátoru. 10 μ L aktivovaného trypsinu po inkubaci bylo přidáno k roztoku proteinu (hmotnostní poměr 1:50 trypsin:protein). Takto připravená směs byla inkubována přes noc při 37 °C v termomixéru. Po inkubaci byla reakce ukončena přidáním 5 μ L 20% TFA, aby výsledné pH roztoku bylo menší než 3.

2.6 Proteolytické štěpení hovězího sérového albuminu pomocí trypsinu

Roztoky

- Stejně jako v kapitole 2.5

Postup

Ke 480 μ g vzorku proteinu rozpuštěného v 55 μ L roztoku 50 mM ABC bylo přidáno 50 μ L 200 mM DTT. Roztok byl inkubován 30 min při teplotě 60 °C v termomixéru při 450–500 rpm. Po vychlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 50 μ L 400 mM IAC a roztok byl opět inkubován 30 min v temnu při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 50 μ L 200 mM DTT a proběhla inkubace 15 min při laboratorní teplotě k neutralizaci přebytečného IAC. Během neutralizace byl připraven roztok trypsinu v objemu potřebném ke štěpení, který byl 15 min zahříván při 30 °C v inkubátoru. 100 μ L aktivovaného trypsinu po inkubaci bylo přidáno k roztoku proteinu (hmotnostní poměr 1:50 trypsin:protein). Takto připravená směs

byla inkubována přes noc (maximálně však 20 hod) při 37 °C v termomixéru. Po inkubaci byla reakce ukončena přidáním 10 µL 20% TFA, aby výsledné pH roztoku bylo menší než 3.

2.7 Proteolytické štěpení fosvitinu pomocí trypsinu

Roztoky

- 0,175% surfaktant RapiGest SF
- Ostatní roztoky stejné jako v kapitole 2.5

Postup

K 200 µg vzorku proteinu rozpuštěného ve 40 µL roztoku 50 mM ABC bylo přidáno 70 µL 0,175% Rapigest SF v 50 mM ABC a 20 µL 200 mM DTT. Roztok byl inkubován 30 min při teplotě 60 °C v termomixéru při 450–500 rpm. Po vychlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 20 µL 400 mM IAC a roztok byl opět inkubován 30 min v temnu při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 20 µL 200 mM DTT a proběhla inkubace 15 min při laboratorní teplotě k neutralizaci přebytečného IAC. Během neutralizace byl připraven roztok trypsinu v objemu potřebném ke štěpení, který byl 15 min zahříván při 30 °C v inkubátoru. 20 µL aktivovaného trypsinu po inkubaci bylo přidáno k roztoku proteinu (hmotnostní poměr 1:50 trypsin:protein). Takto připravená směs byla inkubována přes noc (maximálně však 20 hod) při 37 °C v termomixéru. Po inkubaci byla reakce ukončena přidáním 10 µL 10% TFA, aby výsledné pH roztoku bylo menší než 2. Vzorek byl nakonec 5 min stočen v centrifuze při 13000×g. Supernatant byl odebrán a uchován k další analýze.

2.8 Obohacování standardních fosfopeptidů na částicích Titansphere ve vsádkovém upořádání

Roztoky

- 80% ACN/0,1% TFA
- LB: 80% ACN/5% TFA + 1M LA
- WB1: 80% ACN/1% TFA
- WB2: 20% ACN/0,5% TFA
- EB1: 1% NH₄OH
- 20% TFA
- Roztok nosiče Titansphere velikosti 10 µm (0,5 mg nosiče v 200 µL 80% ACN/0,1% TFA)

Vzorky

- 40 pmol trypticky naštěpeného α -kaseinu rozpuštěného v LB
- Směs trypticky naštěpeného 50 pmol α -kaseinu + 500 pmol BSA rozpuštěné v LB

Postup

0,5 mg nosiče Titansphere 10 μm bylo s pomocí centrifugy (60 s, 3000 \times g) promyto 1x 500 μL 80% ACN/0,1% TFA a 1x 500 μL LB. K promytému nosiči bylo přidáno 200 μL roztoku naštěpeného α -kaseinu. Následně byl nosič se vzorkem inkubován 30 min v temnu při laboratorní teplotě za mírného třepání v termomixéru. Po inkubaci byl roztok s nenavázanými složkami odstraněn z reakční směsi a uchován v jiné mikrozkuhavce. Poté byl nosič promyt opět s pomocí centrifugy (60 s, 3000 \times g) 2x 400 μL LB, 2x 400 μL WB1 a 1x 400 μL WB2. K takto promytému nosiči bylo přidáno 100 μL EL1. Následně byl vzorek inkubován 15 min při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$ na termomixéru při 1200 rpm. Během této inkubace probíhala eluce. Po proběhlé inkubaci byl roztok nad nosičem (90 μL) odebrán, vložen do jiné mikrozkuhavky a okyselen 10 μL 20% TFA.

2.9 Odsolení vzorků na mikrokolonkách plněných nosičem POROS Oligo R3

Roztoky

- Reverzní fáze POROS Oligo R3 v 80% ACN/0,1% TFA
- 80% ACN/0,1% TFA
- 0,1% TFA
- Matrice CHCA (5 mg/mL CHCA v 60% ACN/0,1% TFA + 2 mM DAHC)
- Matrice DHB (10 mg/mL DHB v 50% ACN/0,1% TFA + 1% H_3PO_4)

Vzorky

- Trypticky naštěpený α -kasein
- Trypticky naštěpený BSA
- Směs trypticky naštěpeného α -kaseinu + BSA
- Trypticky naštěpený fosvitin

Postup

Nejprve byl připraven zásobní roztok stacionární fáze POROS Oligo R3. K 1,35 mL (9/10) rozpouštědla 80% ACN/0,1% TFA bylo přidáno 150 μ L (1/10) fáze po sedimentaci. Konec špičky GeLoader byl opatrně stlačen tak, aby nedocházelo k uvolňování fáze ze špičky. Do připravené špičky bylo pipetováno cca 10 μ L homogenizované fáze. Fáze ve špičce byla tlačena insulinovou stříkačkou, která zajistila přetlak a tím byl umožněn průchod rozpouštědla s fází. Výsledná kolonka byla 1 cm dlouhá (maximálně 1,5 cm). Poté byla kolonka promyta 10 μ L 80% ACN/0,1% TFA a 15 μ L 0,1% TFA tak, aby 5 μ L zůstalo nad fází ve špičce. Do takto promyté kolonky byl nanesen vzorek po 20–30 μ L. Fáze s navázaným vzorkem byla promyta 1x 15 μ L 0,1% TFA tak, že nad fází nezůstal žádný objem rozpouštědla. Fáze byla vysušena protlačením zbytkového vzduchu, aby nedocházelo k ředění elučního roztoku. Následně byly do špičky pipetovány 4 μ L matrice pro eluci. Pro vzorky obsahující fosfopeptidy byla použita DHB matrice a pro vzorky bez fosfopeptidů matrice CHCA. Eluce byla provedena přímo na MALDI desku na jeden terčik tak, aby terčik byl z 1/2–3/4 zakryt roztokem (cca 1–1,5 μ L).

2.10 Příprava kapilárních kolonek

Roztoky

- 80% ACN/0,1% TFA
- LB: 80% ACN/5% TFA + 1M LA
- WB1: 80% ACN/1% TFA
- EB1: 1% NH₄OH
- EB2: 3% NH₄OH/45% ACN/50 mM Na₂HPO₄
- Roztok nosiče Titansphere velikosti 5 μ m (5 mg nosiče v 200 μ L 80% ACN/0,1% TFA)

Postup

K 5 mg Titansphere bylo přidáno 100 μ L 80% ACN/0,1% TFA. Nejprve byla vytvořena kolonka z FEP hadičky. Na jednom konci hadičky byla pomocí kleští vytažena úzká špička. Kolonka byla cca o 1–2 cm delší, než měla být délka kolonky naplněná nosičem. Následně byl do kolonky vložen kovovou kapilárou (i.d. přibližně 300 μ m) vyříznutý skleněný filtr, který sloužil jako frit. Poté byla kolonka naplněna nosičem Titansphere následujícím způsobem: do insulinové stříkačky BD bez jehly s nasazenou 10 μ L špičkou byl natažen 80% ACN/0,1% TFA, vzduch, následně roztok s nosičem a opět vzduch. Připravená kolonka

byla spojena se špičkou a stlačením pístu insulinové stříkačky byl generován tlak, který protlačil nosič ze špičky do kolonky. Nasátí nosiče do špičky a plnění kolonky bylo opakováno tolikrát, aby výsledná délka kolonky naplněná nosičem byla cca 5 cm, přičemž 1 mg nosiče odpovídá přibližně 1 cm kolonky. Nakonec se připravená kolonka adekvátně zkrátila podle délky naplněné fáze.

U připravené kolonky byla vždy provedena ekvilibrace nosiče. Kolonka byla promyta 20 μ L LB, 20 μ L 80% ACN/0,1% TFA, 30 μ L LB a 30 μ L WB1. Poté následovalo postupné promytí 20 μ L roztoků: 80% ACN/0,1% TFA, EB1, EB2, EB1 a nakonec opět 80% ACN/0,1% TFA. Jedna kolonka byla použita maximálně šestkrát.

2.11 Mikrogradientová separace vzorků na kolonce plněné Titansphere 5 μ m

Roztoky

- 80% ACN/0,1% TFA
- LB: 80% ACN/5% TFA + 1M LA
- WB1: 80% ACN/1% TFA
- 100 mM CH₃COONa
- 0,5% CH₃COOH
- 0,5% TFA
- 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 10
- 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 9
- 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 8
- 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 7
- EB1: 1% NH₄OH
- EB2: 3% NH₄OH/45% ACN/50 mM Na₂HPO₄
- 20% TFA

Vzorky

- Směs trypticky naštěpeného 30 pmol α -kaseinu + 300 pmol BSA rozpuštěné v LB
- 30 pmol trypticky naštěpeného fosvitinu rozpuštěného v LB
- Celobuněčný lyzát Jurkat buněk (T-buněčný lymfom) naštěpený trypsinem (500 μ g) rozpuštěný v LB

Postup

Pro promytí kolonky bylo do stříkačky nataženo 20 μL LB a 20 μL 80% ACN/0,1% TFA. Obsah stříkačky byl v opačném pořadí protlačen skrz kolonku. Následně byl dávkován vzorek tak, že do stříkačky bylo nasáto 10 μL LB a 50 μL vzorku. Rychlost průtoku vzorku byla 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ a vazba vzorku tedy probíhala 30 min. Poté následovalo promytí kolonky po vazbě 30 μL LB a 30 μL WB1. Po promytí kolonky byl proveden první gradient. Frakce pro přípravu prvního gradientu byly do stříkačky nataženy v pořadí uvedeném v tabulce 1 podle elučního schématu A. Obsah stříkačky byl protlačen skrz kolonku v opačném pořadí. Jímány byly dvě frakce po 30 μL do mikrozkušavek. Poté byly do stříkačky nataženy frakce pro druhý gradient v pořadí uvedeném v tabulce 2 podle elučního schématu A. Frakce byly opět protlačeny skrz kolonku a jímalo se šest frakcí po 15 μL do zkumavek. Tyto frakce byly dále okyseleny takovým objemem 20% TFA, aby výsledné pH bylo menší než 5. Nakonec byla kolonka regenerována 30 μL 1% NH_4OH a 30 μL 80% ACN/0,1% TFA. Všechny osm frakcí získaných ze dvou gradientů bylo následně odsoleno dle postupu popsaného v kapitole 2.9.

Tabulka 1: Složení frakcí pro přípravu prvního elučního gradientu

	Eluční roztok	Eluční schéma A	Eluční schéma B	Eluční schéma C	Eluční schéma D
První gradientová eluce	100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 7	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL
	100 mM CH_3COONa	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL
	0,5% CH_3COOH	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL
	0,5% TFA	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL

Tabulka 2: Složení frakcí pro přípravu druhého elučního gradientu

	Eluční roztok	Eluční schéma A	Eluční schéma B	Eluční schéma C	Eluční schéma D
Druhá gradientová eluce	EB2	15 µL	15 µL	25 µL	-
	EB1	15 µL	15 µL	15 µL	-
	100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 11	-	15 µL	15 µL	20 µL
	100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 10	15 µL	15 µL	15 µL	20 µL
	100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 9	15 µL	15 µL	15 µL	20 µL
	100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 8	15 µL	15 µL	5 µL	20 µL
	100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 7	15 µL	-	-	-
Samostatná eluce	EB1	-	-	-	20 µL

2.12 Modifikace mikrogradientové separace vzorků na kolonce plněné Titansphere 5 µm

Roztoky

- 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 11
- Ostatní roztoky stejné jako v kapitole 2.11

Vzorky

- 30 pmol trypticky naštěpeného fosvitinu rozpuštěného v LB
- Směs trypticky naštěpeného 30 pmol fosvitinu + 300 pmol BSA rozpuštěné v LB
- Celobuněčný lyzát Jurkat buněk (T-buněčný lymfom) naštěpený trypsinem (500 µg) rozpuštěný v LB

2.12.1 Mikrogradientová separace B

Postup je shodný s postupem v kapitole 2.11 s úpravou pH pufru Bis-Tris propan/HCl dle tabulky 3. Frakce pro druhý gradient byly do stříkačky nataženy v pořadí uvedeném v tabulce 2 dle elučního schématu B.

Tabulka 3: Úprava pH elučních roztoků Bis-Tris propan/HCl

Původní pH	Upravené pH
10	11
9	10
8	9
7	8

2.12.2 Mikrogradientová separace C

Postup je shodný s mikrogradientovou separací B v této kapitole s úpravou délky vazby vzorku, jímání frakcí prvního gradientu a úpravou objemů roztoků v druhém gradientu.

Rychlost průtoku vzorku byla 1 μL /min a vazba vzorku tedy probíhala 1 hod v případě fosvitinu a směsi fosvitinu s BSA a v případě lyzátu byla vazba 2 hod.

Po provedení prvního gradientu byly jímány dvě frakce – první frakce 50 μL a druhá frakce 10 μL .

Ve druhém gradientu došlo ke snížení objemu prvního elučního roztoku (konkrétně 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 8) z 15 μL na 5 μL a ke zvýšení objemu posledního elučního roztoku (konkrétně EB2) z 15 μL na 25 μL . Frakce pro druhý gradient byly do stříkačky nataženy v pořadí uvedeném v tabulce 2 dle elučního schématu C. Frakce byly jímány jako v kapitole 2.11. Kolonka byla nakonec regenerována 60 μL 1% NH_4OH a poté 60 μL 80% ACN/0,1% TFA. Všech osm frakcí získaných ze dvou gradientů bylo následně odsoleno dle postupu popsaného v kapitole 2.9, případně 2.14.

2.12.3 Mikrogradientová separace D

Postup je shodný s mikrogradientovou separací B s výjimkou druhého gradientu. Pro druhý gradient byly do stříkačky nataženy frakce v pořadí uvedeném v Tabulka 2 dle elučního schématu D. Byly sbírány čtyři frakce po 20 μL . Po provedení druhého gradientu se kolonkou protlačilo ještě zvlášť 20 μL EB1 a následně se celý objem jímá, jako poslední frakce. Eluce roztokem EB2 byla úplně vynechána.

2.13 Obohacování fosvitinu a buněčného lyzátu na částicích Titansphere 5 µm ve vsádkovém uspořádání

Roztoky

- 0,1% TFA
- EB2: 3% NH₄OH/45% ACN/50 mM Na₂HPO₄
- Roztok nosiče Titansphere velikosti 5 µm (3 mg nosiče v 200 µL 80% ACN/0,1% TFA)
- Ostatní roztoky stejné jako v kapitole 2.8

Vzorky

- Celobuněčný lyzát Jurkat buněk (T-buněčný lymfom) naštěpený trypsinem (500 µg) rozpuštěný v LB
- 30 pmol trypticky naštěpeného fosvitinu rozpuštěného v LB

Postup

3 mg nosiče Titansphere 5 µm bylo s pomocí centrifugy (60 s, 3000×g) promyto 1x 400 µL 80% ACN/0,1% TFA a 1x 400 µL LB. Následně byl nosič ekvilibrován 1x 500 µL 80% ACN/0,1% TFA, 500 µL LB, 200 µL EB1, 200 µL EB2, 200 µL EB1, 500 µL 80% ACN/0,1% TFA a 500 µL LB. K připravenému nosiči bylo přidáno 200 µL roztoku obsahující vzorek rozpuštěný v LB. Následně byl nosič se vzorkem inkubován 30 min v temnu při laboratorní teplotě za mírného třepání v termomixéru při 1200 rpm, aby nedocházelo k sedimentaci částic. Po inkubaci byl roztok s nenavázanými složkami odstraněn z reakční směsi a uchován v jiné mikrozkuhavce. Poté byl nosič promyt opět s pomocí centrifugy (60 s, 3000×g) 2x 400 µL LB, 2x 400 µL WB1 a 1x 400 µL WB2. Promývání probíhalo pomalu (alespoň 1 min) a byl použit vortex, aby byly všechny částice vždy resuspendovány. K takto promytému nosiči bylo přidáno 100 µL EB1. Pro první eluci byl vzorek inkubován 15 min při teplotě 25 °C na termomixéru při 1200 rpm. Po proběhlé inkubaci byl roztok nad nosičem (90 µL) odebrán, vložen do jiné mikrozkuhavky, okyselen 20% TFA a zakoncentrován na cca 20 µL. Zbylý roztok ve zkumavce byl odstraněn do odpadu. K nosiči bylo následně přidáno 100 µL EB2 a opět následovala inkubace 15 min při teplotě 25 °C na termomixéru při 1200 rpm. Po proběhlé inkubaci byl roztok nad nosičem (90 µL) odebrán, okyselen 20% TFA, zakoncentrován dosucha a rozpuštěn v 15 µL 0,1% TFA. Následně byl vzorek podle pH doplněn 5 µL buď 0,1% TFA při kyselém pH nebo 5% TFA při zásaditém pH vzorku. Dvě frakce získané z eluce byly následně odsoleny dle postupu popsáném v kapitole 2.14.

2.14 Odsolení vzorků na mikrokolonkách plněných nosičem C18

Roztoky

- čistý ACN
- 80% ACN/0,1% TFA
- Složení frakcí pro tvorbu elučního gradientu na reverzní fázi
 - 2% ACN/0,1% TFA
 - 8% ACN/0,1% TFA
 - 16% ACN/0,1% TFA
 - 24% ACN/0,1% TFA
 - 32% ACN/0,1% TFA
 - 40% ACN/0,1% TFA

Vzorky

- Frakce fosvitinu a lyzátu připravené v kapitole 2.12 a 2.13

Postup

Nejprve byla připravena mikrokolonka dle postupu popsaném v kapitole 2.10 s rozdílem v tom, že FEP hadička byla naplněna stacionární fází Kinetex EVO C18 resin, 2,6 μm a její délka byla cca 10 mm. Následně byla kolonka ekvilibrována promytím 15 μL čistého ACN, 15 μL 80% ACN/0,1% TFA a 10 μL 2% ACN/0,1% TFA. Po promytí byl na kolonku nanesen vzorek tak, že do mikrostříkačky bylo nejprve nataženo 5 μL 2% ACN/0,1% TFA a poté 20 μL vzorku. Obsah stříkačky byl protlačen skrz kolonku. Po nanesení vzorku byla samotná mikrostříkačka promyta 80% ACN/0,1% TFA a 40% ACN/0,1% TFA. Poté byly do stříkačky postupně nataženy 4 μL elučních roztoků v pořadí: 40% ACN/0,1% TFA, 32% ACN/0,1% TFA, 24% ACN/0,1% TFA, 16% ACN/0,1% TFA, 8% ACN/0,1% TFA, a 2% ACN/0,1% TFA. Obsah stříkačky byl protlačen skrz kolonku tak, že první 4 μL (obsahující nejnižší koncentraci ACN) se nechaly protéct do odpadu (proplach kolonky) a zbylých 20 μL elučního gradientu bylo sbíráno do mikrozkuřavky. Vzorek byl poté vysušen ve vakuové centrifuze a zamražen pro pozdější analýzu. Kolonka po eluci byla promyta 20 μL čistého ACN, 20 μL 80% ACN/0,1% TFA a 10 μL 2% ACN/0,1% TFA.

2.15 MS analýza vzorků standardních proteinů

MS analýza peptidových směsí byla provedena pomocí hybridního hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL s MALDI ionizací. Před samotnou analýzou byl každý vzorek odsolen dle postupu v kapitole 2.9. Měření bylo provedeno v pozitivním módu s rozlišením 60000 FWHM při 400 m/z a v rozsahu m/z od 700 do 4000.

Zpracování dat - kasein, hovězí sérový albumin

Naměřená hmotnostní spektra byla zpracována v softwaru Thermo Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, USA, v. 2.2.44) a poté byly píky extrahovány pomocí softwaru mMass (Strohalm M., v. 5.5.0). Metodou peptidového mapování byla získaná data analyzována pomocí prohledávacího nástroje MS-Fit (Protein Prospector, v. 5.22.1). Hledání bylo provedeno proti proteinové databázi SwissProt (2017.11.01) s následujícím nastavením: proteolytické štěpení proteinu pomocí trypsinu, maximálně jedno možné vynechání štěpného místa enzymu, hmotností tolerance pro peptidy 10 ppm, povolená konstantní modifikace karbamidomethylace cysteinu, variabilní modifikace Gln na kyselinu pyroglutamovou na N-konci peptidu, oxidace methioninu, acetylace na N-konci proteinu a fosforylace na serinu, threoninu nebo tyrozinu. Pro usnadnění porovnávání naměřených dat s daty v databázi byly zadány jedinečné identifikátory proteinů se kterými měly být získaná data srovnána: P02662 (α -S1-kasein), P02663 (α -S2-kasein), P02666 (β -kasein), P02769 (sérový albumin) a manuálně anotována. Podle získaných výsledků byla následně vyhodnocena naměřená hmotnostní spektra.

Zpracování dat – fosvitin

Naměřená hmotnostní spektra byla zpracována v softwaru Thermo Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, USA, v. 2.2.44) a poté byly píky extrahovány pomocí softwaru mMass (Strohalm M., v. 5.5.0). Následně byla manuálně připravena databáze fosforylací fosvitinu podle získaných výsledků vzorku fosvitinu z analýzy LS-MS a dle Czernik et al. v programu Microsoft Excel [112]. Naměřená data byla srovnána s daty v připravené databázi. Podle získaných výsledků byla následně vyhodnocena naměřená hmotnostní spektra.

2.16 LC-UV analýza vzorků fosvitinu a lyzátu

Roztoky

- mobilní fáze A: 2% ACN/0,1% TFA
- mobilní fáze B: 80% ACN/0,1% TFA

Vzorky

- Frakce fosvitinu a lyzátu připravené v kapitole 2.12 a 2.13

Postup

Tato analýza probíhala na Katedře molekulární patologie a biologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Hradci Králové.

Vybrané vzorky připravené v kapitole 2.12 a 2.13 byly po rozmražení rozpuštěny v 20 μ L mobilní fáze A a přepipetovány do vialek pro LC separaci. Poté následovala separace pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 HPLC system. Tento systém je tvořen dvěma kolonami a to μ -předkolonou (300 μ m \times 5 mm) naplněnou 5 μ m částicemi C18PepMap100 Å (Dionex, USA) a analytickou kolonou (100 μ m \times 150 mm) naplněnou částicemi Atlantis C18 3 μ m 100 Å (Waters, USA). Separace vzorků probíhala bilineárním gradientem 5–45% ACN/ 0,1% TFA po dobu nastavenou v použité metodě pro konkrétní vzorek. Po separaci následovala detekce pomocí UV detektoru s nastavenou vlnovou délkou 215 nm.

2.17 LC-MS analýza vzorků fosvitinu a lyzátu

Roztoky

- mobilní fáze A: 2% ACN/0,1% FA
- mobilní fáze B: 80% ACN/0,1% FA

Vzorky

- Frakce fosvitinu a lyzátu připravené v kapitole 2.12 a 2.13

Postup

Tato analýza probíhala opět na Katedře molekulární patologie a biologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Hradci Králové.

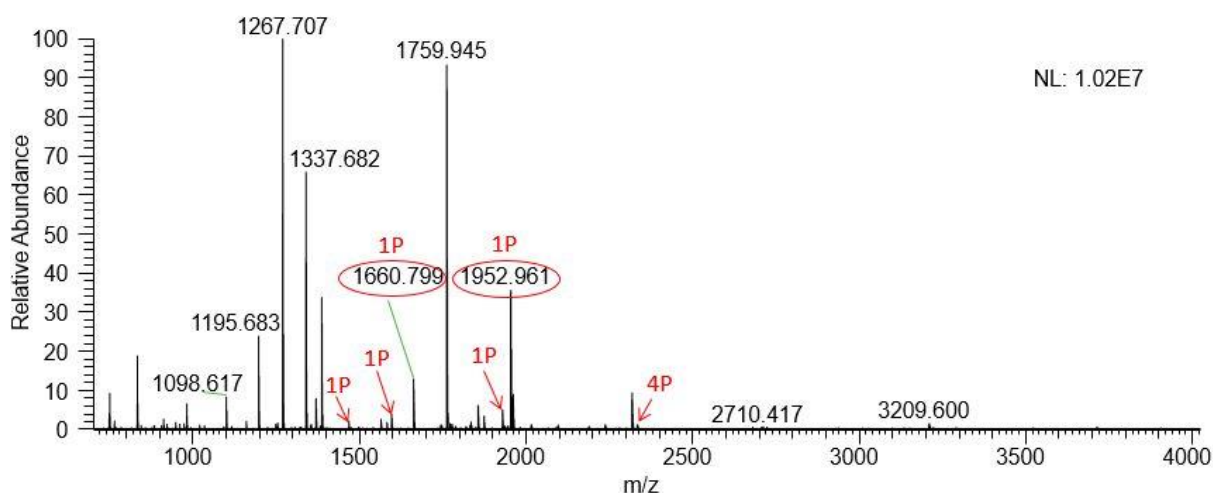
Vybrané vzorky připravené v kapitole 2.12 a 2.13 byly po provedené LC-UV analýze následně znovu separovány pomocí UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC system. Tento systém je tvořen předkolonou (75 μm \times 20 mm) naplněnou 3 μm částicemi Acclaim PepMap100 C18 a separační kolonou (75 μm \times 150 mm), která je naplněna částicemi 2 μm Acclaim PepMap RSLC C18. Všechny vzorky byly separovány dvojitým lineárním gradientem ACN (3–44%) přičemž separace vzorků probíhala po dobu nastavenou v použité metodě pro konkrétní vzorek. UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC system je spojen s Q Exactive hmotnostním spektrometrem pro detekci separovaných látek. Analýza separovaných analytů pomocí Q Exactive hmotnostního spektrometru byla provedena v pozitivním módu s rozlišením 70000 FWHM a s full MS skenem (350–1650 m/z). Top 12 prekurzorů bylo analyzováno pomocí MS/MS při 17500 FWHM.

Ke zpracování a vyhodnocení naměřených dat byl použit software Proteome Discover (Thermo Fisher Scientific, USA, v. 2.3.0.523) a vyhledávací nástroj Mascot (v. 2.4.1). Hledání peptidů z fosvitinu bylo provedeno proti proteinové databázi SwissProt (2017.10.25) nebo taxonomické podčásti „Chicken“ databáze UniProt (referenční proteom UP000000539, 2019.04.24). Hledání peptidů z lyzátu bylo provedeno proti proteinové databázi UniProt_Human (referenční proteom UP000005640, 2019.02.26) s následujícím nastavením: proteolytické štěpení proteinu pomocí trypsinu, maximálně dvě možné vynechání štěpného místa enzymu, hmotností tolerance prekurzorového iontu 10 ppm, hmotnostní tolerance fragmentovaného iontu 20 mmu, povolená konstantní modifikace karbamidomethylace cysteinu, variabilní modifikace Gln na kyselinu pyroglutamovou na N-konci peptidu, acetylace na N-konci proteinu, oxidace methioninu a fosforylace na serinu, threoninu nebo tyrozinu.

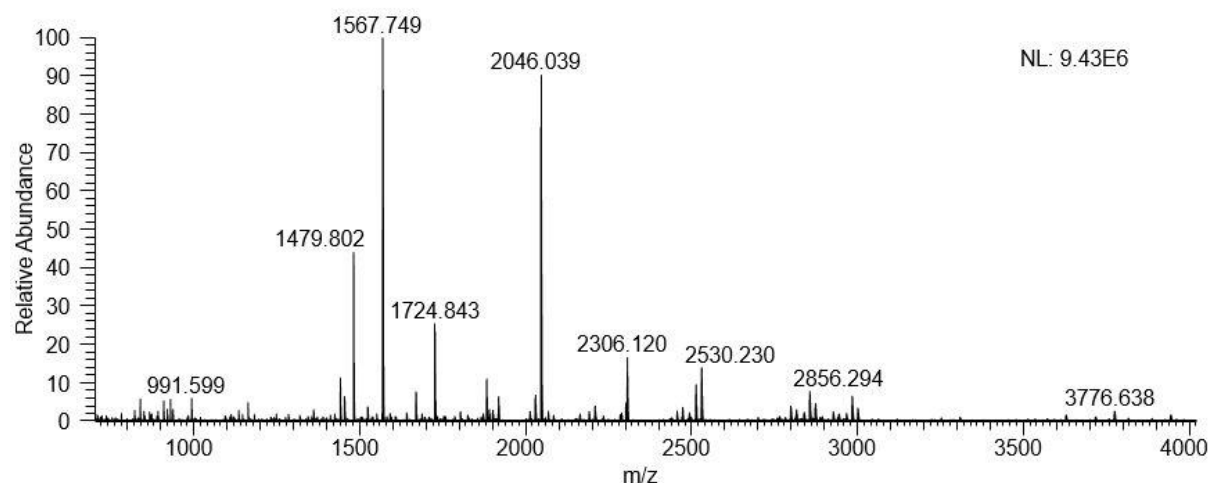
3 Výsledky a diskuze

3.1 Analýza proteolyticky štěpených standardních proteinů

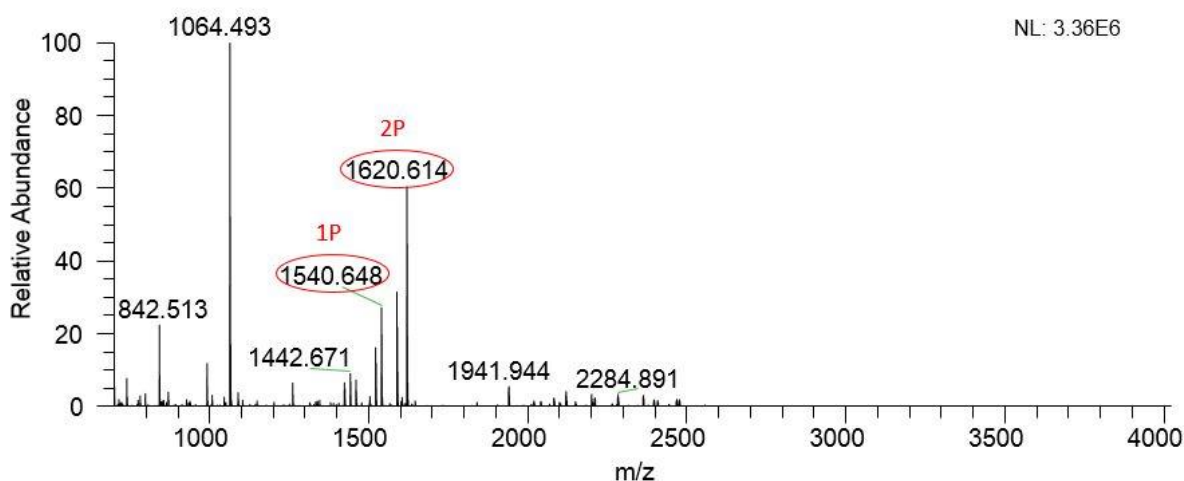
Pro práci a optimalizaci mikrogradientové separace na TiO_2 byly používány roztoky standardních proteinů α -kaseinu, hovězího sérové albuminu a fosvitinu. Tyto standardy byly nejprve proteolyticky naštěpeny trypsinem. Poté byla provedena MS analýza pro kontrolu správného naštěpení proteinů. Každý standard byl pro měření připraven v dubletu. Vyhodnocení získaných dat bylo provedeno dle postupu v kapitole 2.15. Pokrytí peptidové sekvence α -kaseinu podjednotky S1 bylo 67,3 % a podjednotky S2 58,8 % a sekvenční pokrytí BSA bylo 41,5 %. Po vyhodnocení dat jsme ověřili, že standardní proteiny α -kasein (obr. 16) BSA (obr. 17) a fosvitin (obr. 18) byly správně naštěpeny a mohly se dále využít v experimentech.



Obrázek 16: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum α -kaseinu štěpeného trypsinem. Hodnoty m/z fosopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB.



Obrázek 17: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum BSA štěpeného trypsinem. Použitá matrice: CHCA.



Obrázek 18: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum fosvitinu štěpeného trypsinem. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB.

3.2 Mikrogradientová separace fosfopeptidů α -kaseinu

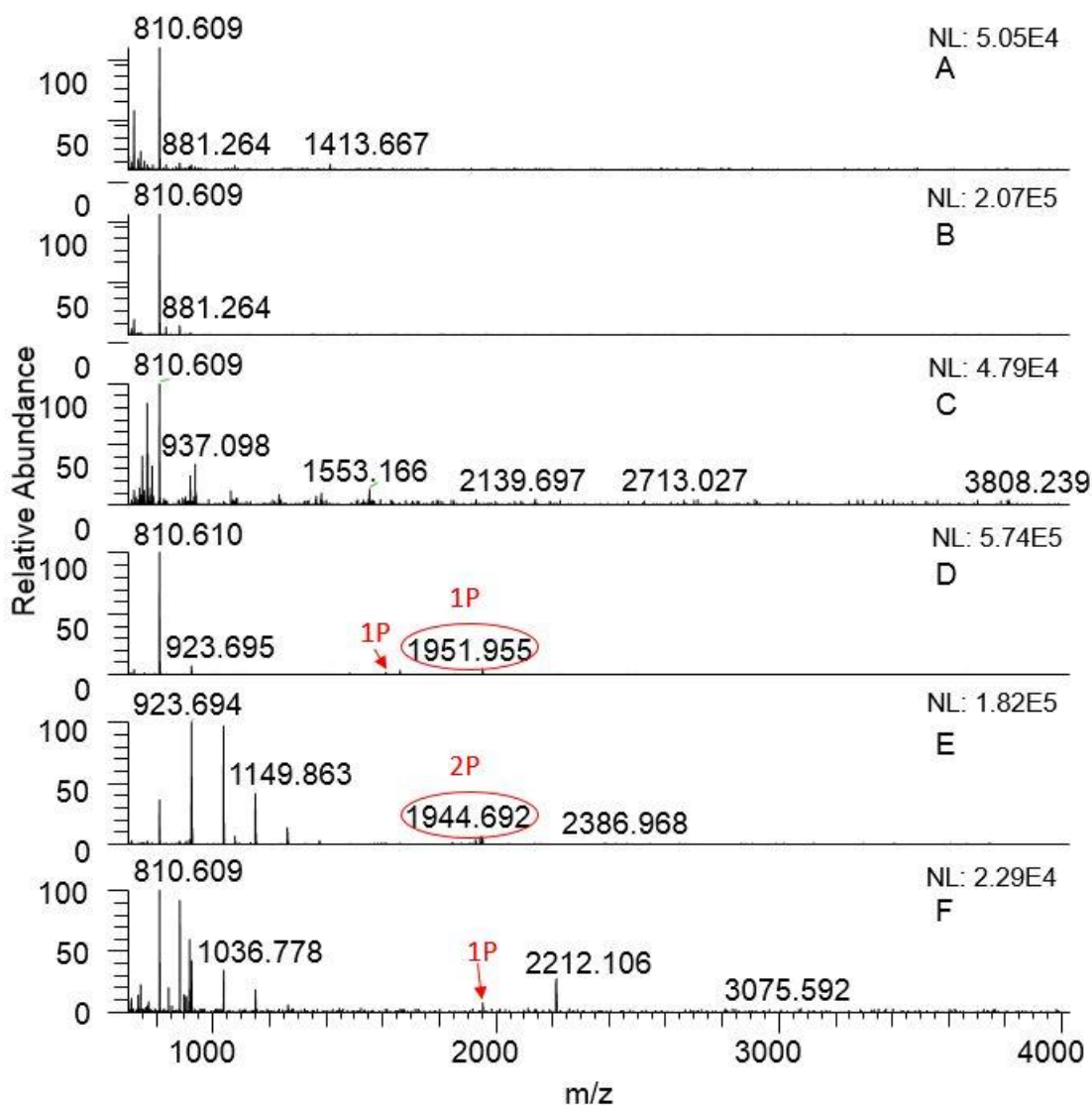
V této části práce bylo provedeno první testování a optimalizace protokolu (kapitola 2.11) mikrogradientové separace fosfopeptidů na jednoduché směsi peptidů získané tryptickým štěpením α -kaseinu a BSA. Nanášecí pufr kromě vyšší koncentrace TFA obsahoval také LA pro snížení vazby kyselých nefosforylovaných peptidů a tím i zlepšení obohacení fosfopeptidů na TiO_2 mikrokuličkách. Následné promývání bylo prováděno také za kyselých podmínek v přítomnosti buď 5% TFA a 80% ACN nebo 1% TFA a 80% ACN, kdy v různých pracích například Sugiyama et al. [113] bylo popsáno, že kyselé podmínky s 50–80% ACN a použití alifatických hydroxykyselin je účinné pro snížení vazby kyselých peptidů. Následně byl sestaven první gradient, který měl za úkol odmyt peptidy obsahující vysoké množství kyselých AMK (kyselina asparagová a glutamová) a zároveň nemělo docházet k eluci fosforylovaných peptidů. Na základě předchozích prací [114] byl poté sestaven druhý gradient, který sloužil k eluci fosfopeptidů s různou vazebnou afinitou. Tento gradient se skládal z Bis-Tris propan/HCl pufrů o různých pH a NH_4OH . NH_4OH je běžně využívané eluční činidlo pro fosfopeptidy navázané například na TiO_2 nosiče a má tendenci eluovat kratší fosfopeptidy, ale zároveň má problémy s elucí multifosforylovaných peptidů. Bis-Tris propan je vhodný pro eluci delších fosfopeptidů [114]. Do gradientu byl jako poslední eluční roztok zařazen také EB2 obsahující ACN, fosforečnan disodný a vyšší koncentraci NH_4OH , který sloužil pro eluci multifosforylovaných peptidů.

Pro snadnou identifikaci fosfopeptidů α -kaseinu byla sestavena tabulka (pPříloha 1), která se nachází v příloze. Tento přehled vychází jednak z práce Larsen et al. [26] a jednak z experimentálních dat naměřených během práce na této práci. Ve všech následujících kapitolách byly fosfopeptidy identifikovány dle této tabulky v příloze.

3.2.1 Úprava pH elučních roztoků

Nejprve byla provedena mikrogradientová separace fosfopeptidů α -kaseinu 30 pmol + BSA 300 pmol dle postupu v kapitole 2.11 (eluční schéma A). Pro separaci byla použita kolonka s vnitřním průměrem 250 μ m plněná částicemi Titansphere o průměru 5 μ m a délce 48 mm. Následně byla provedena MS analýza frakcí peptidových směsí pomocí hybridního hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL s MALDI ionizací (kapitola 2.15). Takto byly vyhodnoceny všechny frakce vzorků v této i následující kapitole 3.3.

Z důvodu nepřítomnosti fosfopeptidů v prvních třech frakcích a přítomnosti malého množství fosfopeptidů v dalších frakcích (obr. 19) jsme se rozhodli modifikovat postup mikrogradientové separace úpravou pH pufru Bis-Tris propan/HCl v druhém gradientu (eluční schéma B, kapitola 2.12.1). Konkrétně Bis-Tris propan/HCl pH 7 bylo zvýšeno na pH 8, následující Bis-Tris propan/HCl pH 8 byl zvýšen na pH 9, poté bylo pH zvýšeno z 9 na pH 10 a pH posledního roztoku Bis-Tris propan/HCl o pH 10 byl zvýšen na pH 11 což bylo pH čistého Bis-Tris propanu.



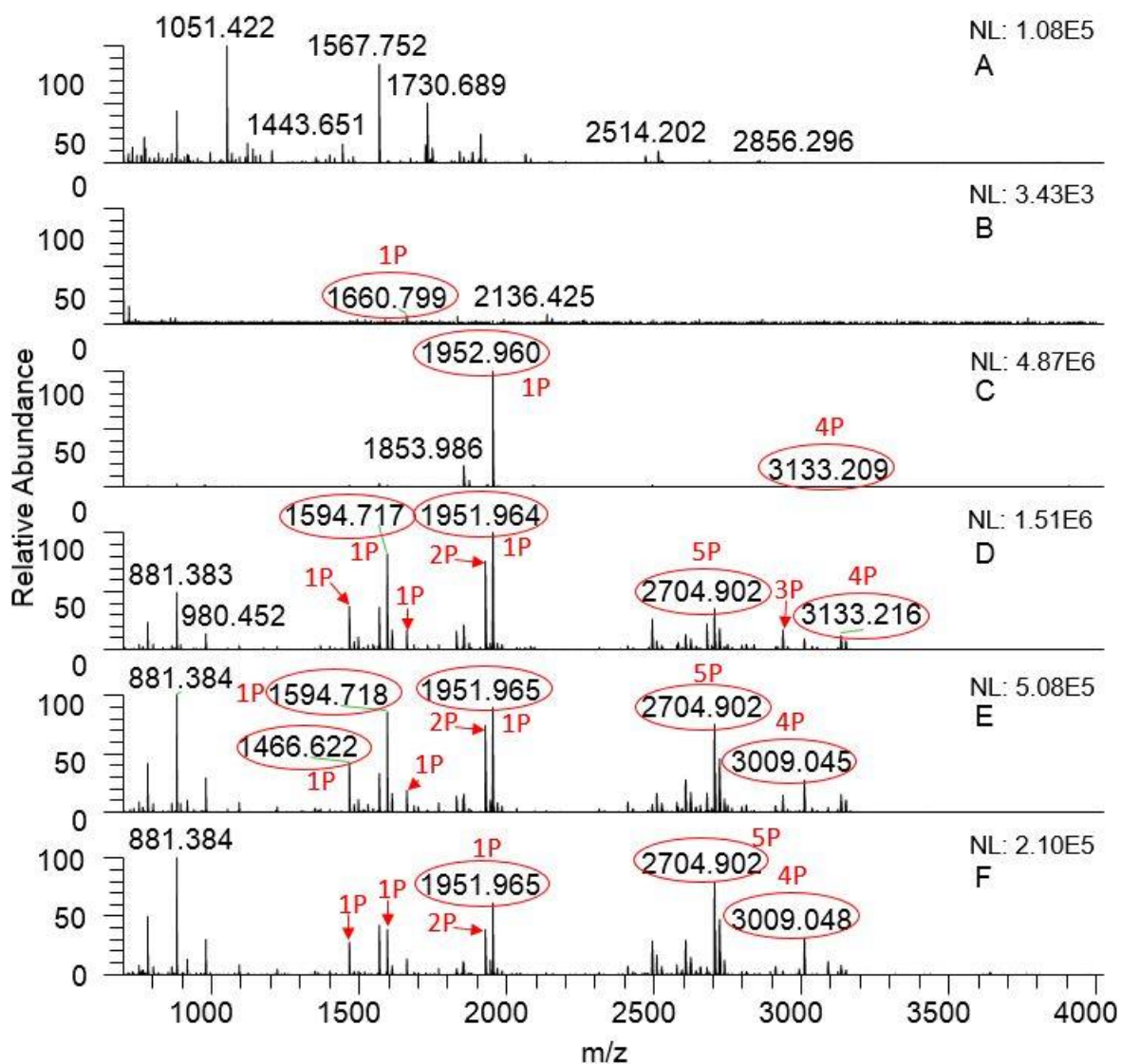
Obrázek 19: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z druhého gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma A). Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce.

Úpravou pH Bis-Tris propan/HCl vznikl modifikovaný gradient (eluční schéma B, kapitola 2.12.1). Touto mikrogradientovou separací byla provedena separace fosfopeptidů α -kaseinu 30 pmol + BSA 300 pmol. Pro separaci byla použita opět kolonka plněná částicemi Titansphere (délka 48 mm, i.d. 250 μ m, částice 5 μ m). Po vazbě vzorku byl nejprve aplikován první gradient pro odmytí peptidů s kyselými AMK. Gradient se skládal z následujících frakcí: 15 μ L 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 8, 15 μ L 100 mM CH_3COONa , 15 μ L 0,5% CH_3COOH a 15 μ L 0,5% TFA (

Tabulka 1). Jímány byly dvě frakce po 30 μ L. Poté byl proveden druhý gradient skládající se z již upravených Bis-Tris propan/HCl elučních roztoků: 15 μ L EB2, 15 μ L EB1,

15 μL 100 mM Bis-Tris propan pH 11, 15 μL 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 10, 15 μL 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 9, 15 μL 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 8 (Tabulka 2). Všechny osm frakcí bylo odsoleno na mikrokolonkách plněných nosičem POROS Oligo R3. Následně byla provedena MALDI-MS analýza frakcí (kapitola 2.15).

Z obrázku 20 je patrné, že se fosfopeptidy začaly eluovat mnohem dříve, konkrétně ve druhé frakci, v porovnání s aplikací elučních schématu A. Ve druhé a třetí frakci převažovaly monofosforylované peptidy, zatímco v dalších frakcích se objevovaly už i multifosforylované peptidy, což ukazuje na prvotní úspěšnou separaci. Poměrově nejvíce bylo multifosforylovaných peptidů v páté frakci. Po úpravě pH roztoků Bis-Tris propanu/HCl došlo k výraznému zlepšení separace fosfopeptidů, proto takto modifikovaný postup (eluční schéma B) byl používán v dalších optimalizacích separace.



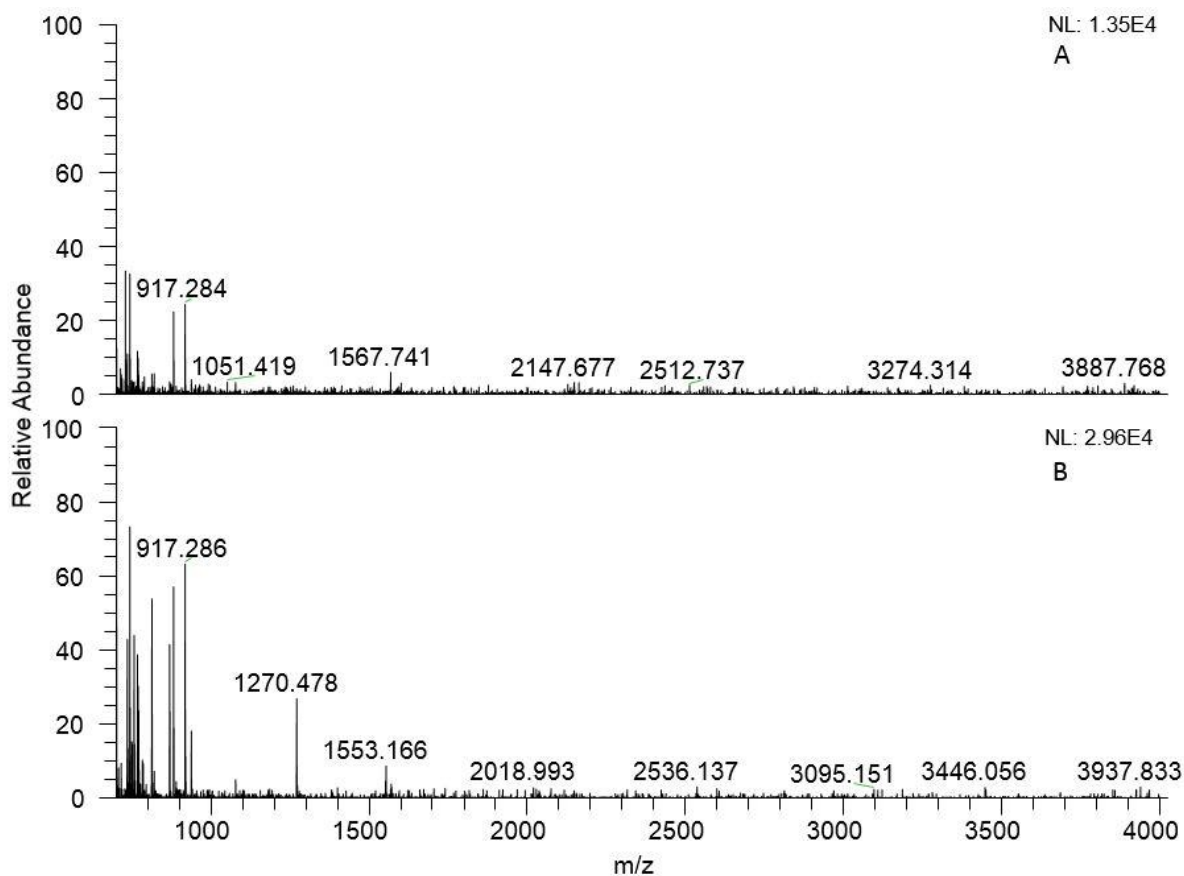
Obrázek 20: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z druhého gradientu po úpravě pH elučních roztoků (eluční schéma B). Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce.

3.2.2 Optimalizace délky kolonky

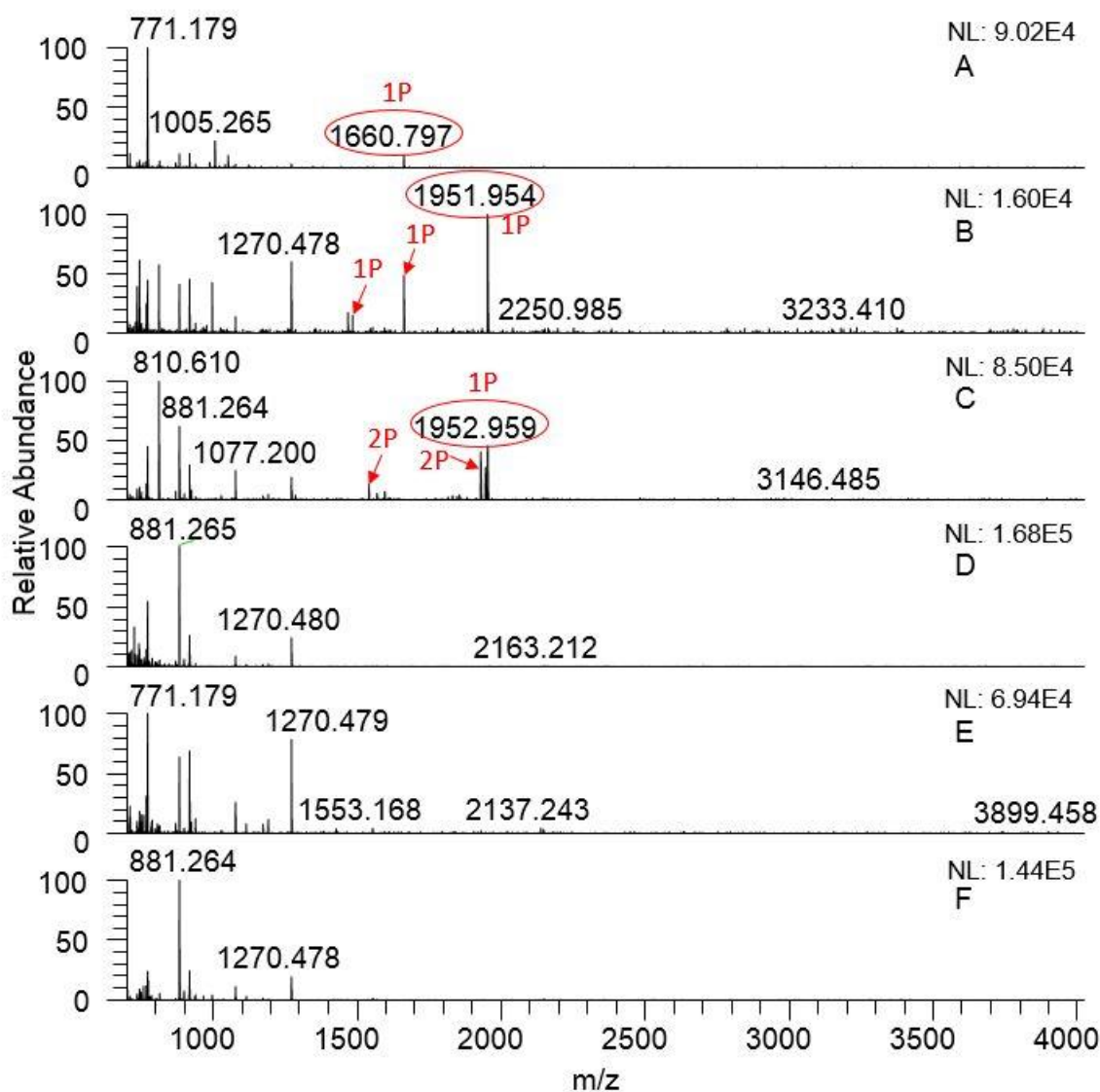
Pro separaci fosfopeptidů z naštěpeného standardního proteinu na kolonce dlouhé 48 mm bylo testováno, zda by bylo možné takto dlouhou kolonku zkrátit se stejnou separační účinností. Zkrácením délky kolonky by došlo k úspoře použitého nosiče a mohla by být ovlivněna i nespecifická sorpce. Proto byly testovány dvě délky kolon připravených dle postupu v kapitole 2.10.

Nejprve byla provedena mikrogradientová separace dle elučního schématu B fosfopeptidů vzorku α -kaseinu 30 pmol + BSA 300 pmol na kolonce dlouhé 21 mm (postup v kapitole 2.12.1). Všechny frakce byly opět analyzovány na hmotnostním spektrometru. V průběhu prvního gradientu nebyl eluován žádný fosfopeptid (obr. 21). Ve druhém gradientu

se fosfopeptidy objevily v prvních třech frakcích (obr. 22). Jeden monofosforylovaný peptid se eluoval v první frakci, přičemž ve druhé frakci se nacházelo už více monofosforylovaných peptidů. Ve třetí frakci se objevily i difosforylované peptidy. Další tři frakce neobsahovaly opět žádné fosfopeptidy.



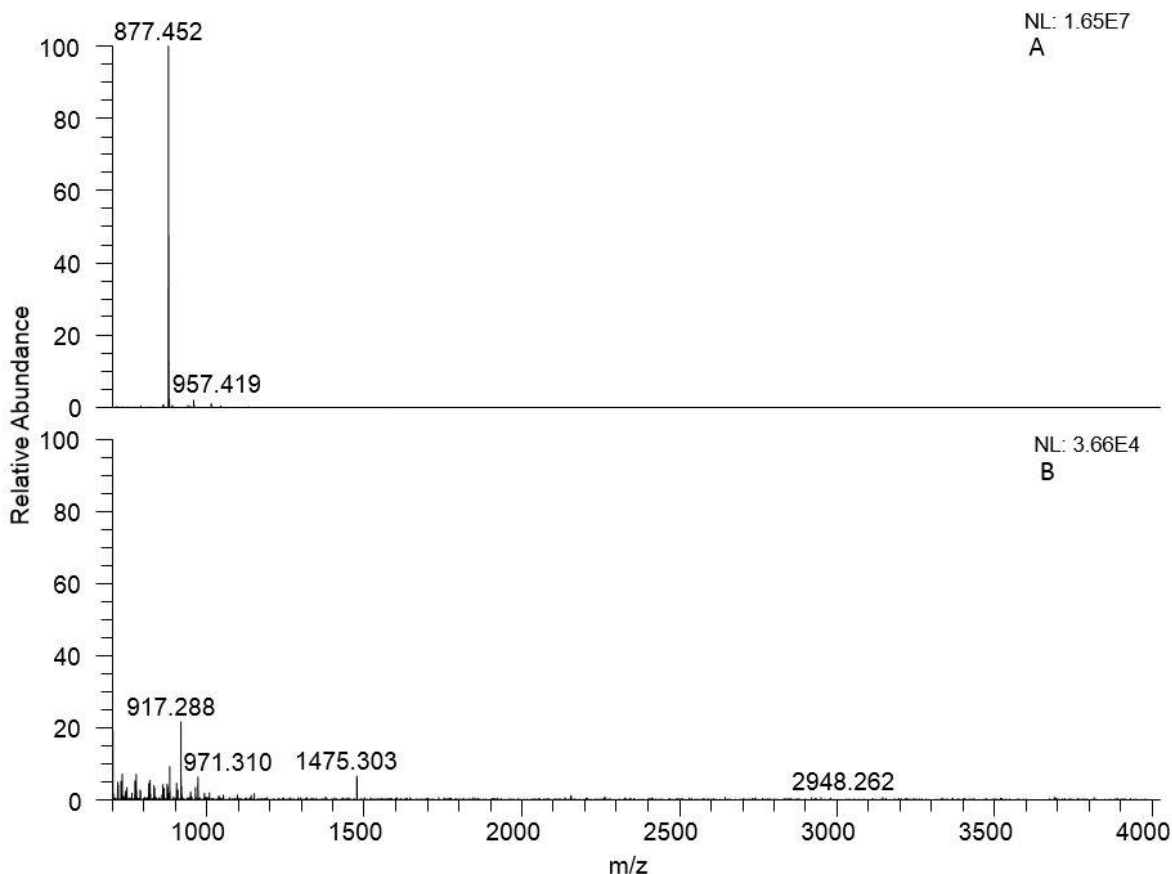
Obrázek 21: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z prvního gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B) na kolonce dlouhé 21 mm. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce.



Obrázek 22: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z druhého gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B) na kolonce dlouhé 21 mm. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce.

Poté byla provedena mikrogradientová separace dle elučního schématu B vzorku α -kaseinu 30 pmol + BSA 300 pmol na kolonce dlouhé 48 mm a po separaci byla provedena opět MS analýza frakcí. V prvním gradientu se opět neobjevily žádné fosfopeptidy (obr. 23), což bylo v souladu s očekávaným chováním podle návrhu složení prvního elučního gradientu. Ve druhém gradientu se fosfopeptidy začaly eluovat až ve druhé frakci (obr. 20) v porovnání s elucí na krátké kolonce, ale zároveň eluce na delší kolonce byla z hlediska detekce fosfopeptidů v dalších frakcích podstatně lepší. Rozdíl mezi separací na krátké a dlouhé kolonce nastal hlavně v posledních třech frakcích druhého gradientu, kdy se kromě velkého počtu mono a difosforylovaných peptidů začaly objevovat i multifosforylované peptidy.

Tím byla prokázána lepší separace fosfopeptidů na delší kolonce, proto pro další experimenty byly používány kolonky dlouhé 40–53 mm. Zároveň je patrné, že tento systém je částečně schopen separovat fosfopeptidy na základě počtu fosforylovaných skupin.



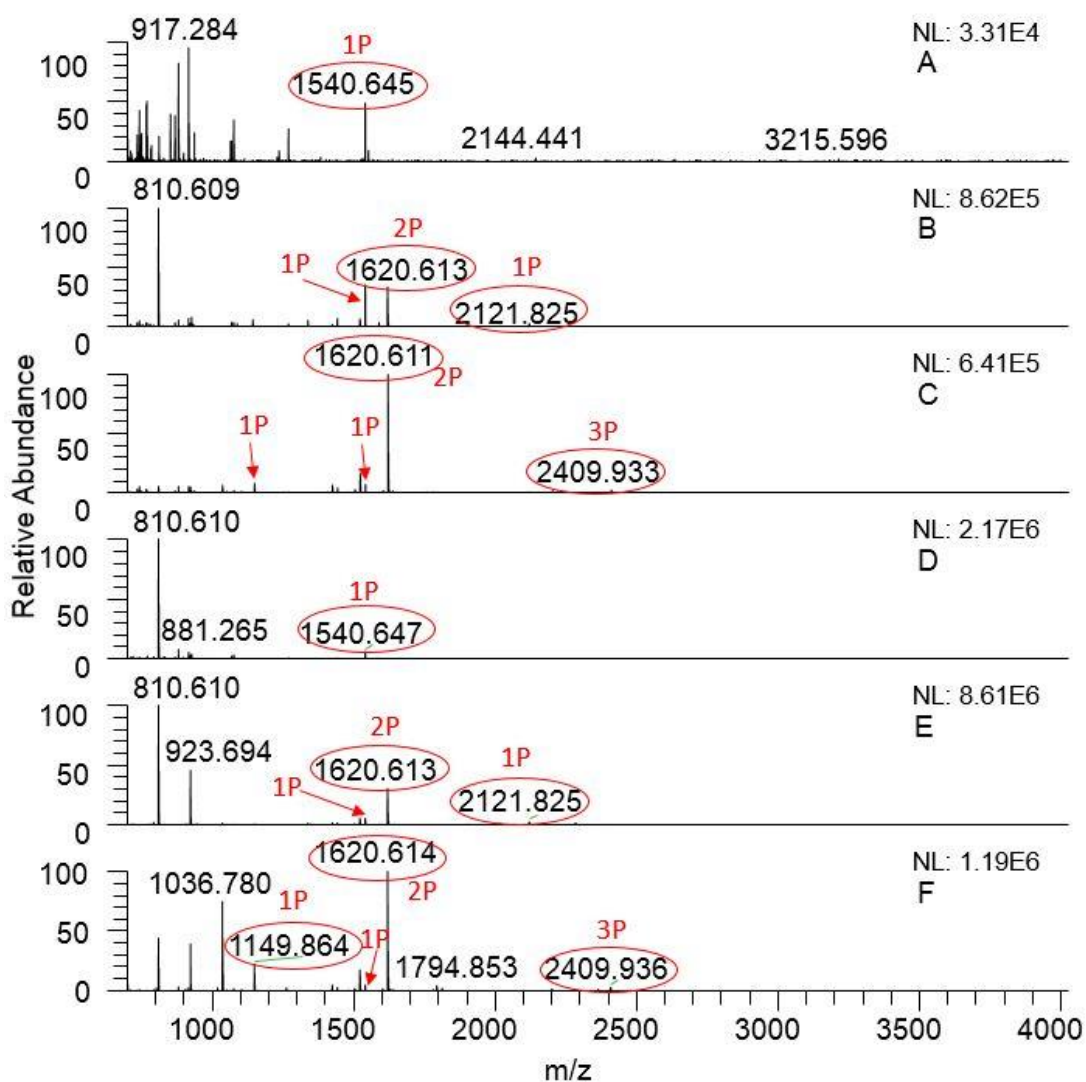
Obrázek 23: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum směsi α -kaseinu + BSA z prvního gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B) na kolonce dlouhé 48 mm. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce.

3.3 Optimalizace mikrogradientové separace fosfopeptidů fosvitinu

Pro další optimalizace postupu již modifikované mikrogradientové separace (kapitola 2.12.1, eluční schéma B) jsme rozhodli používat modelový vzorek fosvitinu, který má vysoké množství potenciálních fosforylovaných míst a po jeho naštěpení může být ve směsi přítomno vysoké množství i multifosforylovaných peptidů. Pro identifikaci fosfopeptidů fosvitinu byla také sestavena tabulka (Příloha 2), která se nachází v příloze. Tento přehled vychází zejména z experimentálních dat získaných z LC-MS/MS analýzy tohoto vzorku (kapitola 2.17) a je doplněn daty z Czernick et al. [112]. Fosfopeptidy z fosvitinu v dalších experimentech byly identifikovány dle této tabulky.

3.3.1 Opakované použití kolonky

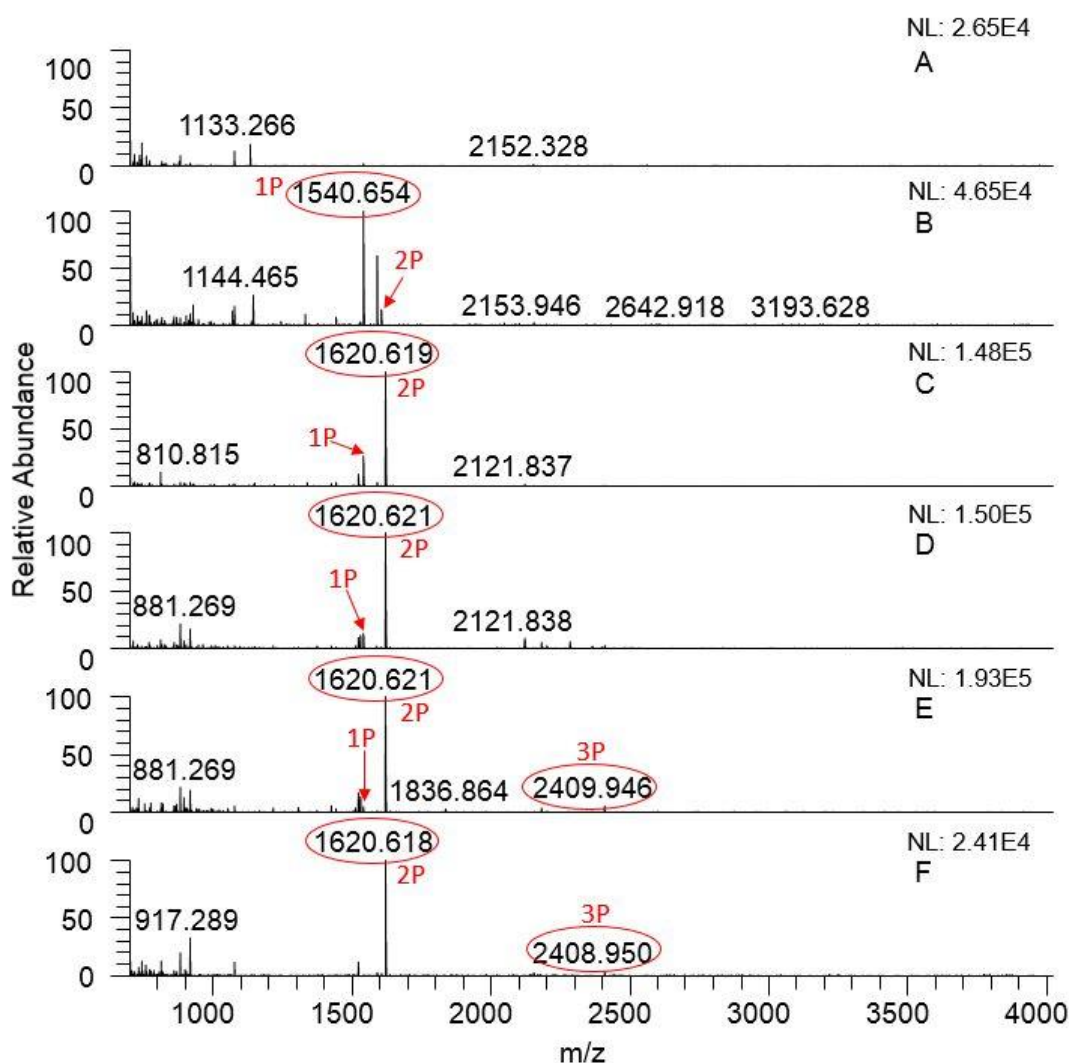
Pro ověření, že připravenou kolonku je možné používat opakovaně aniž by docházelo ke snižování účinnosti separace, případně ke snižování účinnosti záchytu fosfopeptidů byla připravena kolonka s částicemi Titansphere (42 mm, i.d. 250 μm , částice 5 μm). Na ní byla provedena mikrogradientová separace (eluční schéma B, kapitola 2.12.1) a MALDI-MS analýza (kapitola 2.15) celkem šestkrát se stejnými vzorky fosvitinu 30 pmol a poté jednou s LB místo vzorku (slepý vzorek). Všech šest provedení mikrogradientové separace fosfopeptidů z fosvitinu se téměř nelišilo. Na obrázku 24 jsou porovnány první, třetí a páté frakce prvního a šestého pokusu separace. Až na první frakci jsou poměrově intenzity fosfopeptidů velmi podobné, což svědčí o reprodukovatelnosti protokolu izolace a separace fosfopeptidů z fosvitinu.



Obrázek 24: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum fosvitinu z druhého gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B) prvního a šestého pokusu. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. První obohacení fosfopeptidů: A: první frakce, B: třetí frakce, C: pátá frakce. Šesté obohacení fosfopeptidů: D: první frakce, E: třetí frakce, F: pátá frakce.

I přes úspěšné testování opakovatelnosti kolonky nebyla účinnost separace fosfopeptidů optimální, protože se monofosforylované a difosforylované peptidy nacházely ve více elučních frakcích (obr. 25). Docházelo tím k částečnému ředění fosfopeptidů než k jejich účinné separaci a frakcionaci. Tento problém jsme se snažili adresovat jiným návrhem experimentů popsanych v následující kapitole.

Poslední pokus mikrogradientové separace na stejné kolonce s částicemi Titansphere (délka 42 mm, i.d. 250 μm , částice 5 μm) byl proveden s čistým LB (slepý vzorek). V tomto případě byl vidět také slabý signál fosfopeptidů, který byl způsobený retencí fosfopeptidů v kolonce z předchozích separací. Množství fosfopeptidů a jejich intenzita byla ale výrazně nižší oproti klasické separaci vzorku. Kolonka se tedy dá použít opakovaně, aniž by byla snižována účinnost separace.



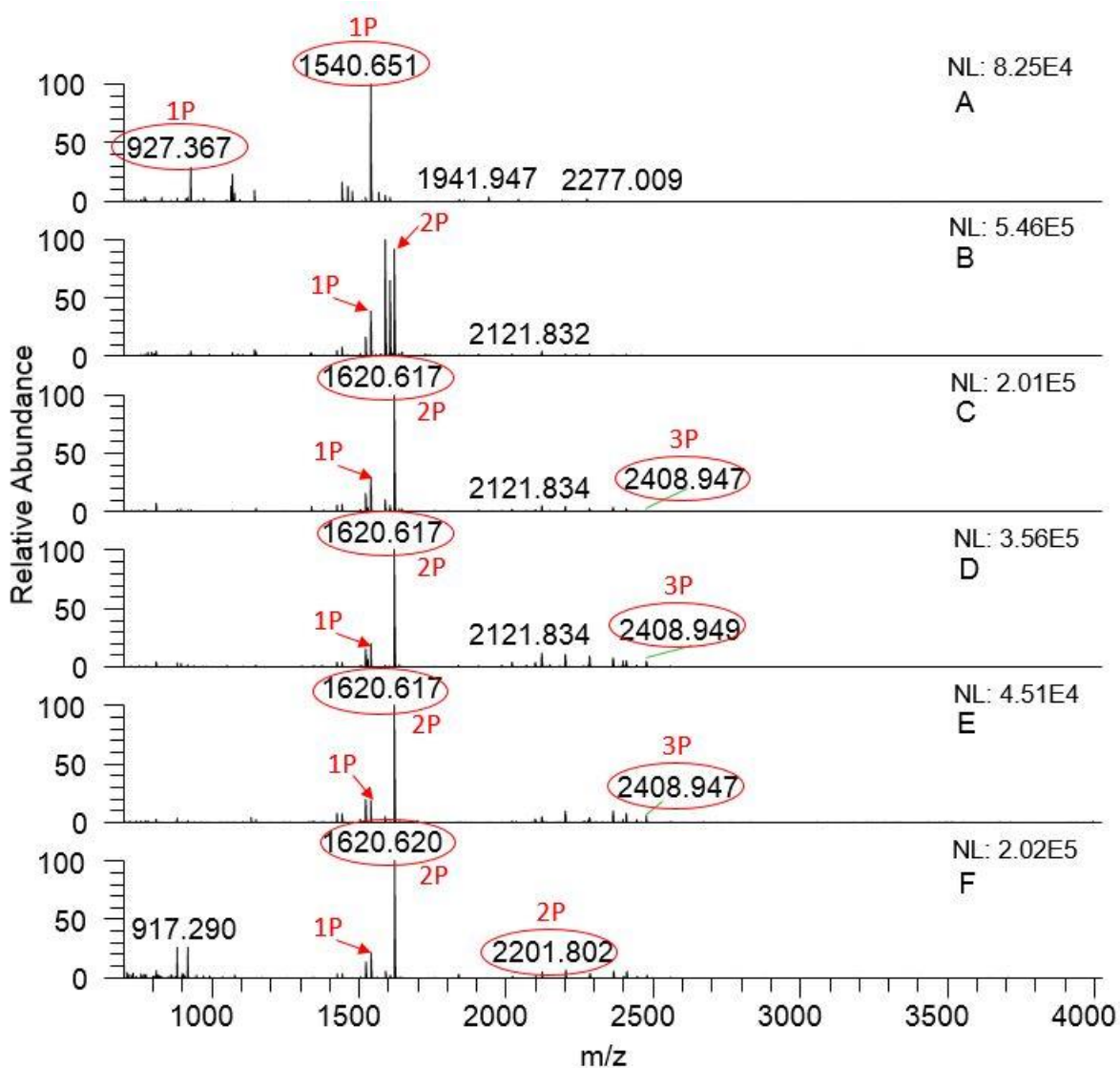
Obrázek 25: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum fosvitinu z druhého gradientu mikrogradientové separace (eluční schéma B). Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny červeně. Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce.

3.3.2 Úprava objemu elučních roztoků použitých při tvorbě gradientu

Nejprve byla provedena mikrogradientová separace (eluční schéma B, kapitola 2.12.1) fosfopeptidů fosvitinu 30 pmol, přičemž první gradient se skládal z frakcí: 15 μ L 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 8, 15 μ L 100 mM CH₃COONa, 15 μ L 0,5% CH₃COOH a 15 μ L 0,5% TFA. Poté byl proveden druhý gradient skládající se z frakcí: 15 μ L EB2, 15 μ L EB1, 15 L 100 mM Bis-Tris propan pH 11, 15 μ L 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 10, 15 μ L 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 9, 15 μ L 100 mM Bis-Tris propan/HCl pH 8. Následně byla provedena opět MALDI-MS analýza (kapitola 2.15), přičemž všech osm frakcí bylo před analýzou odsoleno na mikrokolonkách plněných nosičem POROS Oligo R3 (kapitola 2.9).

Z obrázku 25, ale i z experimentů opakovatelnosti v předchozí kapitole je patrné, že separace fosfopeptidů nebyla stále optimální a následující modifikací postupu mikrogradientové separace (eluční schéma C, kapitola 2.12.2) jsme se snažili o posun eluce více fosfopeptidů do první frakce druhého gradientu. Provedli jsme úpravu objemů prvního a posledního elučního roztoku ve druhém gradientu. Objem prvního elučního roztoku, tedy Bis-Tris propane/HCl pH 8, byl snížen z 15 μ L na 5 μ L, protože zde téměř nedocházelo k eluci a první frakce neobsahovaly fosfopeptidy, případně se jich zde objevovalo málo (obr. 25). Naopak objem posledního elučního roztoku EB2 byl zvýšen z 15 μ L na 25 μ L hlavně z důvodu efektivnější eluce multifosforylovaných peptidů (Tabulka 2, eluční schéma C).

Po modifikaci postupu byla provedena mikrogradientová separace fosfopeptidů (eluční schéma C, kapitola 2.12.2). Z obrázku 26 je patrné, že došlo k posunutí eluce fosfopeptidů. Monofosforylované peptidy se začaly objevovat již v první frakci a jejich majoritní zastoupení přetrvávalo jen do druhé frakce, kdy se naopak začaly eluovat difosforylované peptidy. Patrný je také posun eluce multifosforylovaných peptidů směrem k dřívějším elučním frakcím. Takto modifikovaný protokol byl následně použit pro separaci fosfopeptidů z reálného vzorku celobuněčného lyzátu Jurkat buněk.



Obrázek 26: MALDI LTQ Orbitrap - MS spektrum fosvitinu druhého gradientu separace s upravenými objemy elučních roztoků (eluční schéma C). Hodnoty m/z fosfopeptidů označeny oválným boxem. Použitá matrice: DHB. A: první frakce, B: druhá frakce, C: třetí frakce, D: čtvrtá frakce, E: pátá frakce, F: šestá frakce.

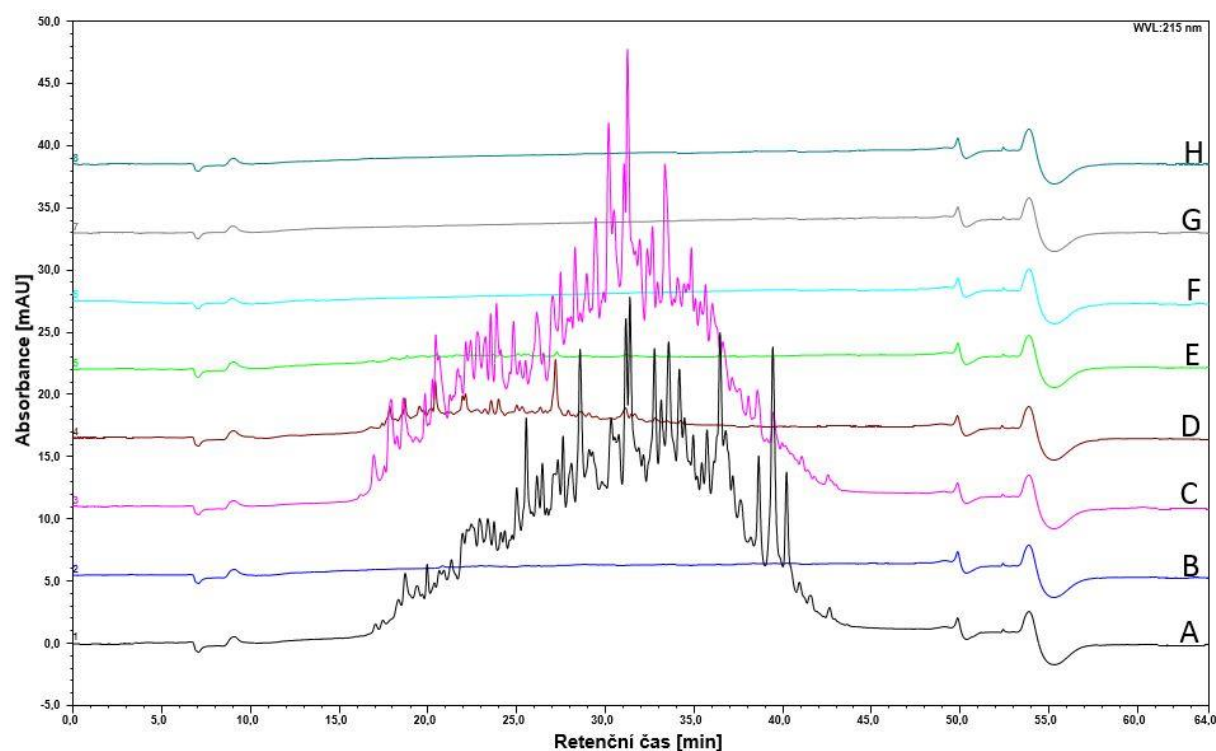
3.4 Analýza komplexního vzorku peptidů

3.4.1 LC-UV analýza

V této části práce byla provedena mikrogradientová separace fosfopeptidů reálného vzorku celobuněčného lyzátu Jurkat buněk naštěpeného trypsinem jako příklad komplexní směsi peptidů, které se vyskytují v biologických analýzách. Jako výchozí byl použit optimalizovaný protokol z kapitoly 3.3.2, tedy mikrogradientová separace dle elučního schématu C (kapitola 2.12.2). Pro separaci byla připravena nová kolonka s částicemi Titansphere (délka 55 mm, i.d. 250 μm , částice 5 μm) a pro separaci bylo použito 0,5 mg naštěpené směsi proteinů z buněčného lyzátu Jurkat buněk. Získané frakce byly poté odsoleny na krátkých 10 mm

kolonkách plněných stacionární fází Kinetex EVO C18, 2,6 μm (kapitola 2.14). Pro eluci vzorku z kolonky byl použit gradient ACN (2% – 40%). Poté byly všechny frakce vysušeny a zamrazeny. Těsně před analýzou pomocí LC-UV byly frakce rozmrazeny a rozpuštěny v 20 μL 2% ACN/0,1% TFA.

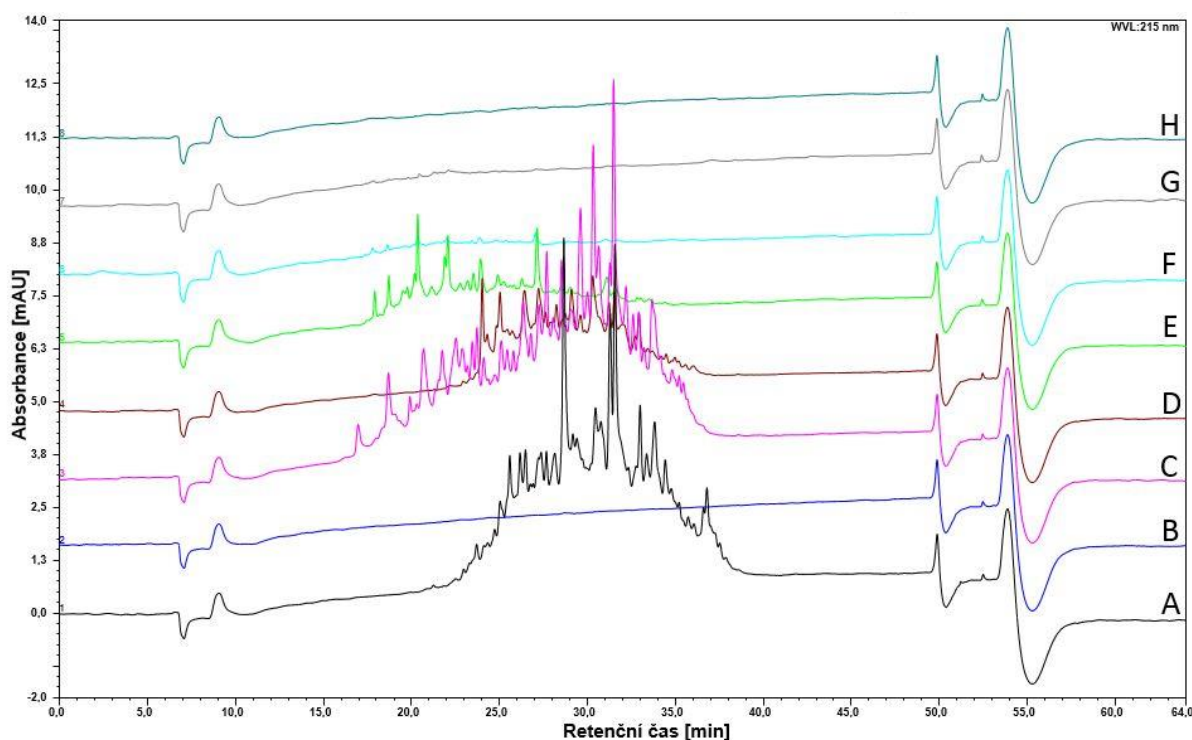
Na obrázku 27 je v první frakci prvního gradientu (chromatogram A) vidět poměrně silný signál na chromatogramu. V této frakci se dalo předpokládat, že se pravděpodobně jedná o nefosforylované peptidy, což bylo potvrzeno následnou LC-MS analýzou. Ve druhé frakci prvního gradientu nebyl zaznamenán téměř žádný signál. Nedošlo tak k eluci peptidů a dalo se zde očekávat, že většina fosfopeptidů by se měla následně nacházet ve frakcích druhého gradientu, což bylo naším cílem.



Obrázek 27: Chromatografický záznam získaných frakcí lyzátu z mikrogradientové separace (eluční schéma C). První gradient: A: první frakce, B: druhá frakce. Druhý gradient: C: první frakce, D druhá frakce, E: třetí frakce, F: čtvrtá frakce, G: pátá frakce, H: šestá frakce.

V první frakci druhého gradientu (obr. 27, chromatogram C) byl zaznamenán silný signál v širokém retenčním čase a pravděpodobně by se zde mělo jednat o fosfopeptidy. Ve druhé frakci je na chromatogramu vidět slabší signál, což svědčí o menším množství eluovaných (fosfo)peptidů. V dalších frakcích se nevyskytoval téměř žádný signál, což znamená, že většina peptidů byla eluována na začátku druhého elučního gradientu. Takováto separace nebyla optimální pro analyzovaný komplexní vzorek peptidů, jelikož se z kolony při této

mikrogradientové separaci (eluční schéma C) uvolňovalo vše najednou na začátku druhého gradientu a nedocházelo k efektivní frakcionaci. Ke zlepšení separace by mohlo dojít zvýšením objemu prvního elučního roztoku druhého gradientu (Bis-Tris propan/HCl pH 8). Z tohoto důvodu jsme se vrátili k postupu mikrogradientové separace č. 1 fosfopeptidů optimalizovaného v kapitole 3.2.1 (eluční schéma B, postup v kapitole 2.12.1). Z obrázku 28 je vidět, že v první frakci prvního gradientu byl zaznamenán opět poměrně silný signál s vyšším retenčním časem. Pravděpodobně zde docházelo opět k eluci nefosforylovaných peptidů, stejně jako v předchozím případě, neboť první eluční gradient je pro všechna eluční schémata shodný. Ve druhé frakci prvního gradientu nebyl také opět zaznamenán žádný signál.

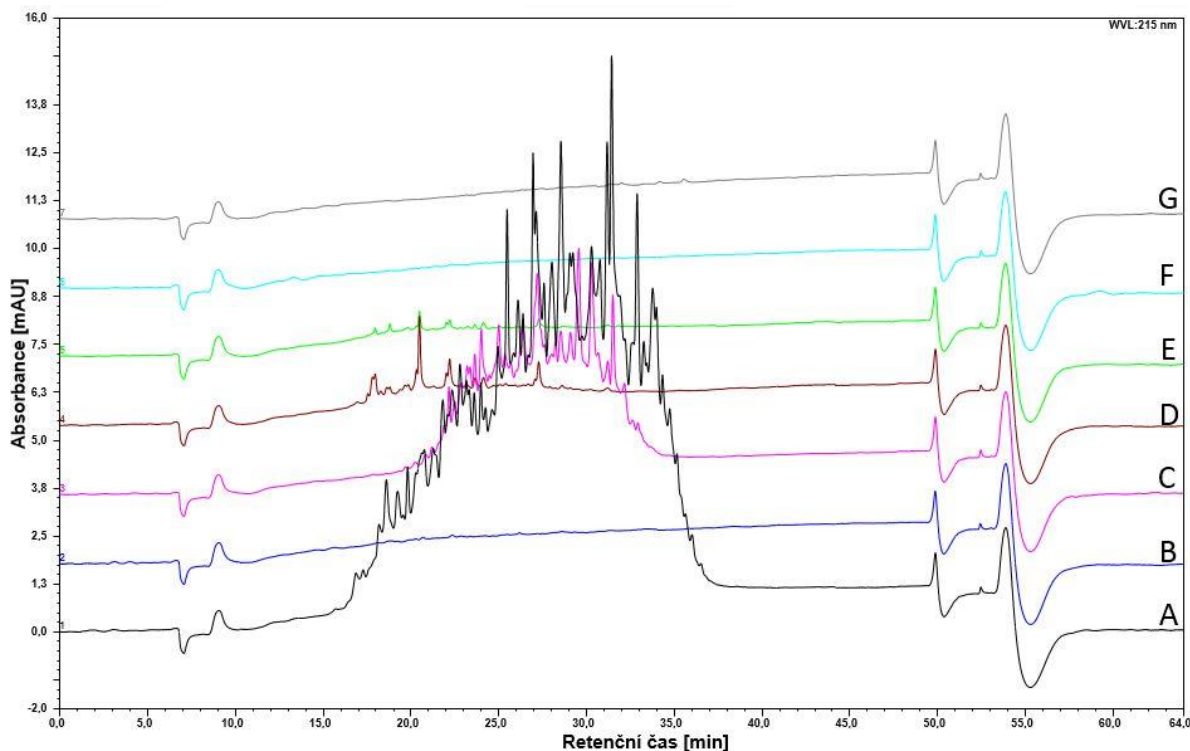


Obrázek 28: Chromatografický záznam získaných frakcí lyzátu z mikrogradientové separace (eluční schéma B). První gradient: A: první frakce, B: druhá frakce. Druhý gradient: C: první frakce, D druhá frakce, E: třetí frakce, F: čtvrtá frakce, G: pátá frakce, H: šestá frakce.

Na chromatografickém záznamu z LC-UV analýzy (obr. 28) je vidět opět intenzivní signál v první frakci druhého gradientu. Oproti předchozímu experimentu (obr. 27) byl zaznamenán vyšší signál i ve druhé a třetí frakci. Potvrzení identity peptidů bylo provedeno v následující kapitole pomocí LC-MS/MS analýzy a databázového vyhledávání. Ve čtvrté frakci je vidět velmi slabý signál, kdy pravděpodobně docházelo k eluci zbývajících (fosfo)peptidů. V dalších frakcích už nedocházelo k téměř žádné eluci peptidů.

Porovnáním obrázku 27 a 28 je vidět, že ve třetí a čtvrté frakci mikrogradientové separace druhé gradientové eluce v elučním schématu C není žádný signál, ale při mikrogradientové separaci podle elučního schématu B se signál v těchto frakcích objevuje. Je tedy patrné, že došlo k posunu eluce (fosfo)peptidů pomocí mikrogradientové separace elučního schématu B oproti separaci elučního schématu C. Proto se mikrogradientová separace elučního schématu B jeví lepší pro analýzu komplexních vzorků peptidů.

Zároveň jsme také pro separaci komplexního peptidového vzorku zařadili ještě jeden nový modifikovaný postup separace (eluční schéma D, kapitola 2.12.3). Došlo zde k úpravě frakcí druhého gradientu. Upravený druhý gradient se skládal pouze z pufrů Bis-Tris propan/HCl o různých pH (Tabulka 2, eluční schéma D). Poté byla provedena eluce roztokem EB1 samostatně. Navíc byly zvýšeny objemy všech frakcí z 15 μL na 20 μL . Na obrázku 29 je vidět, že v první frakci prvního gradientu byl zaznamenán opět poměrně silný signál. Ve druhé frakci prvního gradientu nebyl opět žádný signál. V první frakci druhého gradientu byl zaznamenán také silný signál, jako u předešlých separací. Ve druhé frakci druhého gradientu je vidět slabý signál a ve třetí frakci je patrný už jen velmi slabý signál. Pro lepší porozumění dosažených výsledků bylo nutné provést LC-MS analýzu, získaných frakcí. Jejich výsledky jsou rozebrány v následující kapitole.

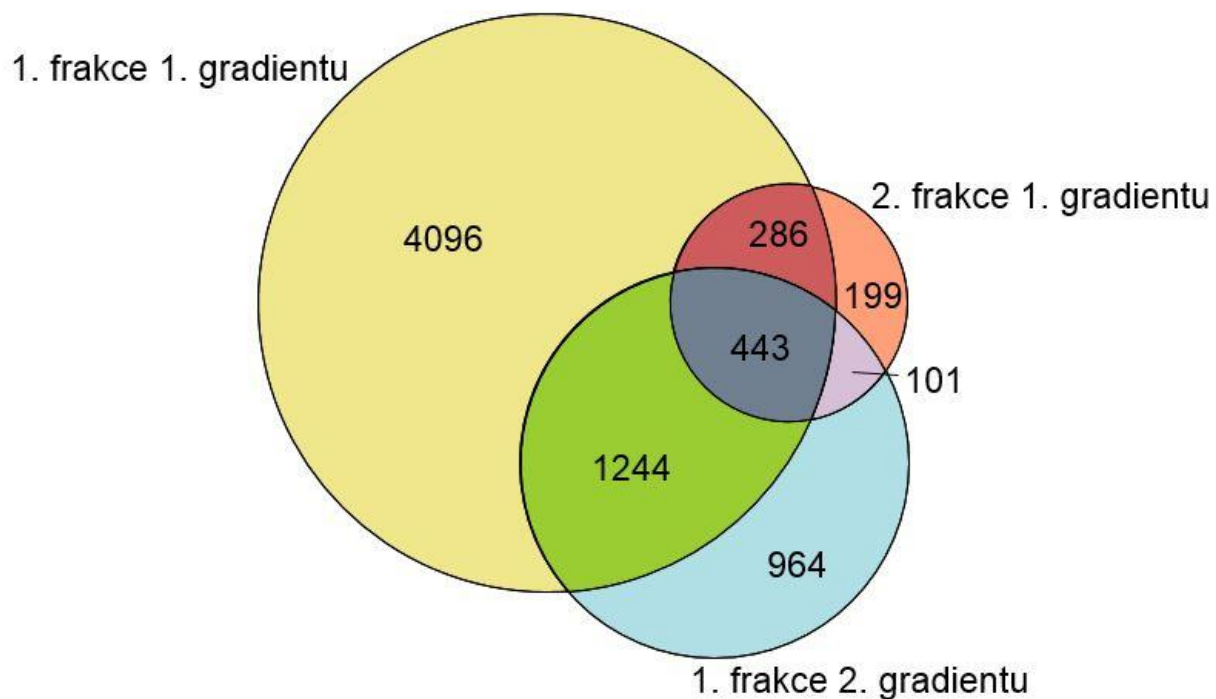


Obrázek 29: Chromatografický záznam získaných frakcí lyzátu z mikrogradientové separace (eluční schéma D). První gradient: A: první frakce, B: druhá frakce. Druhý gradient: C: první frakce, D: druhá frakce, E: třetí frakce, F: čtvrtá frakce. G: frakce ze samostatné eluce roztokem EB1.

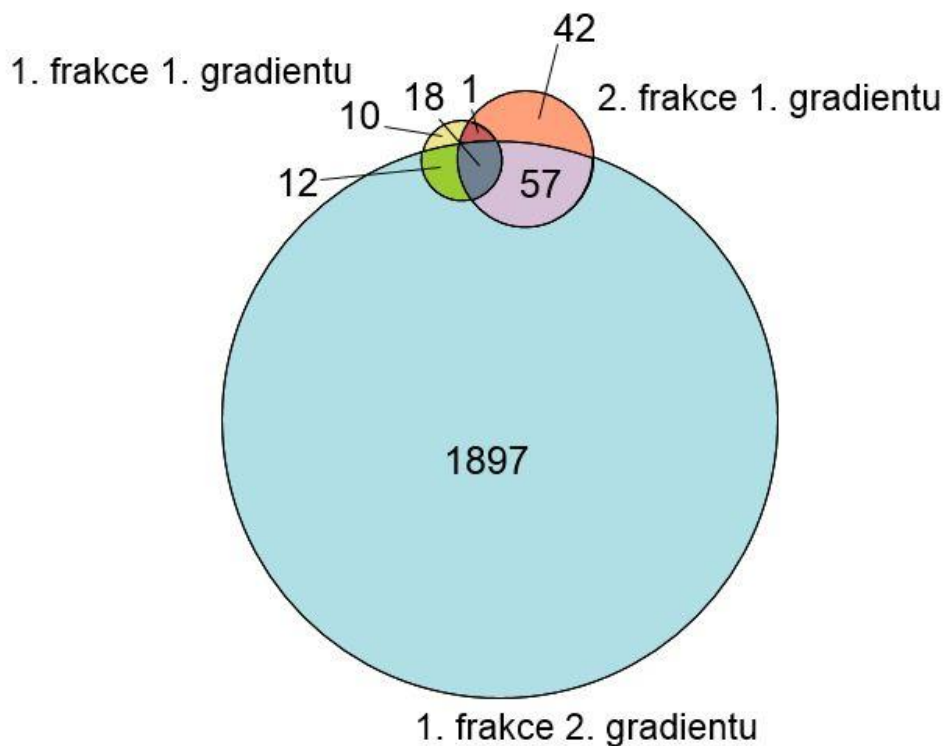
3.4.2 LC-MS analýza

Hlavním cílem této části práce bylo porovnat účinnost mikrogradientové separace fosfopeptidů s metodou vsádkové separace fosfopeptidů. LC-MS/MS analýze byly podrobeny frakce lyzátu Jurkat buněk z mikrogradientové separace dle elučního schématu B (kapitola 2.12.1) optimalizované v kapitole 3.2.1 a frakce z mikrogradientové separace dle elučního schématu D (kapitola 2.12.3). Ze získaných dat byly v Proteome Discoverer vytvořeny Vennovy diagramy pro porovnání množství fosforylovaných nebo nefosforylovaných peptidů ve vybraných frakcích pro lepší pochopení účinnosti mikrogradientové separace fosfopeptidů.

Nejprve bylo porovnáno množství nefosforylovaných peptidů přítomných v obou frakcích prvního gradientu a první frakci druhého gradientu mikrogradientové separace elučního schématu B. Na obrázku 30 je vidět, že v první frakci prvního gradientu je několikanásobně větší přítomnost nefosforylovaných peptidů (4096), které se nevyskytovaly ve druhé frakci prvního gradientu ani v první frakci druhého gradientu. Celkově se v první frakci prvního gradientu vyskytovalo 6069 nefosforylovaných peptidů, přičemž 1687 bylo detekováno i v první frakci druhého gradientu. Zároveň obrázek 31 ukazuje, že se v první i druhé frakci prvního gradientu mikrogradientové separace dle elučního schématu B vyskytovalo minimální množství fosfopeptidů v porovnání s první frakcí druhého gradientu. V první frakci druhého gradientu bylo celkově 1984 fosfopeptidů z toho 1897 bylo unikátních. Detekcí nejvyššího množství nefosforylovaných peptidů v prvním gradientu se potvrdilo ponechání tohoto prvního gradientu jako vhodného nástroje pro redukci nespecifické sorpce nefosforylovaných peptidů. Zároveň bylo v prvním gradientu detekováno minimální množství fosfopeptidů. Z toho vyplývá, že se podařilo přesně nastavit hranici mezi prvním gradientem a druhým gradientem tak, abychom minimalizovali nespecifickou sorpci a zároveň získali maximální množství fosfopeptidů.

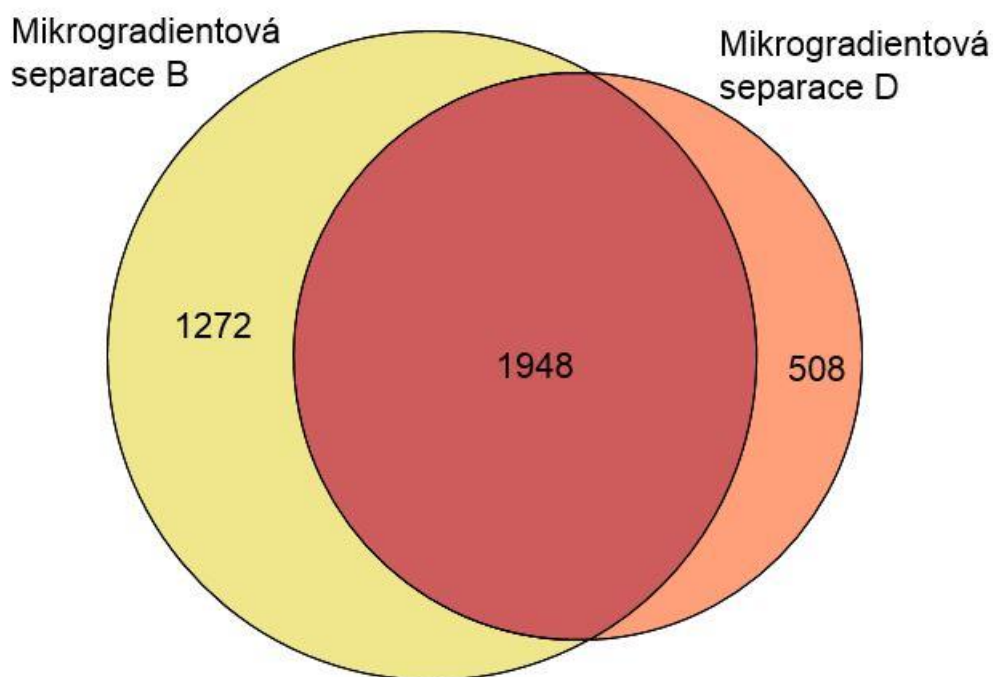


Obrázek 30: Vennův diagram zobrazující množství identifikovaných nefosforylovaných peptidů ve vybraných frakcích mikrogradientové elučního schématu B.



Obrázek 31: Vennův diagram zobrazující množství identifikovaných fosforylovaných peptidů ve vybraných frakcích mikrogradientové separace elučního schématu B.

Srovnáním mikrogradientové separace elučních schémat B a D byly potvrzeny výsledky LC-UV analýz těchto dvou protokolů. Z obrázku 32 je patrné, že v elučním schématu B se eluuje celkově více fosfopeptidů (3220) než v elučním schématu D (2456). Zároveň v elučním schématu B bylo eluováno 1272 unikátních fosfopeptidů, což je o 764 fosfopeptidů více oproti elučnímu schématu D. Proto lepší separaci fosfopeptidů poskytuje navržené eluční schéma B.

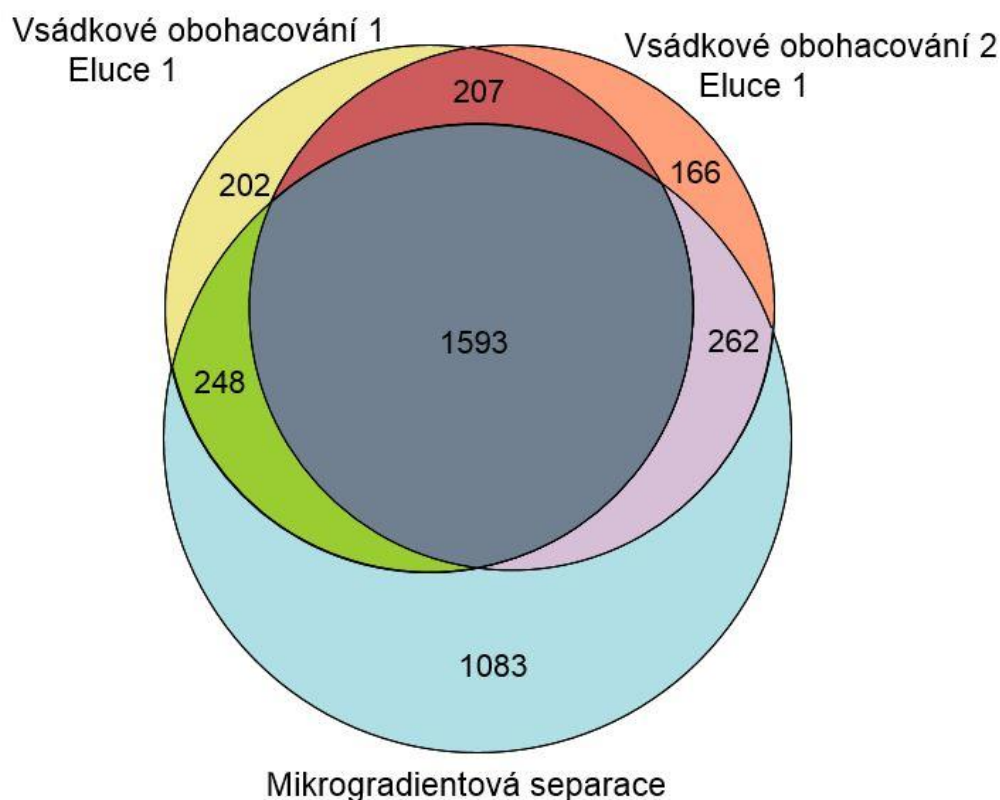


Obrázek 32: Vennův diagram zobrazující celkové množství identifikovaných fosfopeptidů ve všech frakcích v elučních schématech B a D.

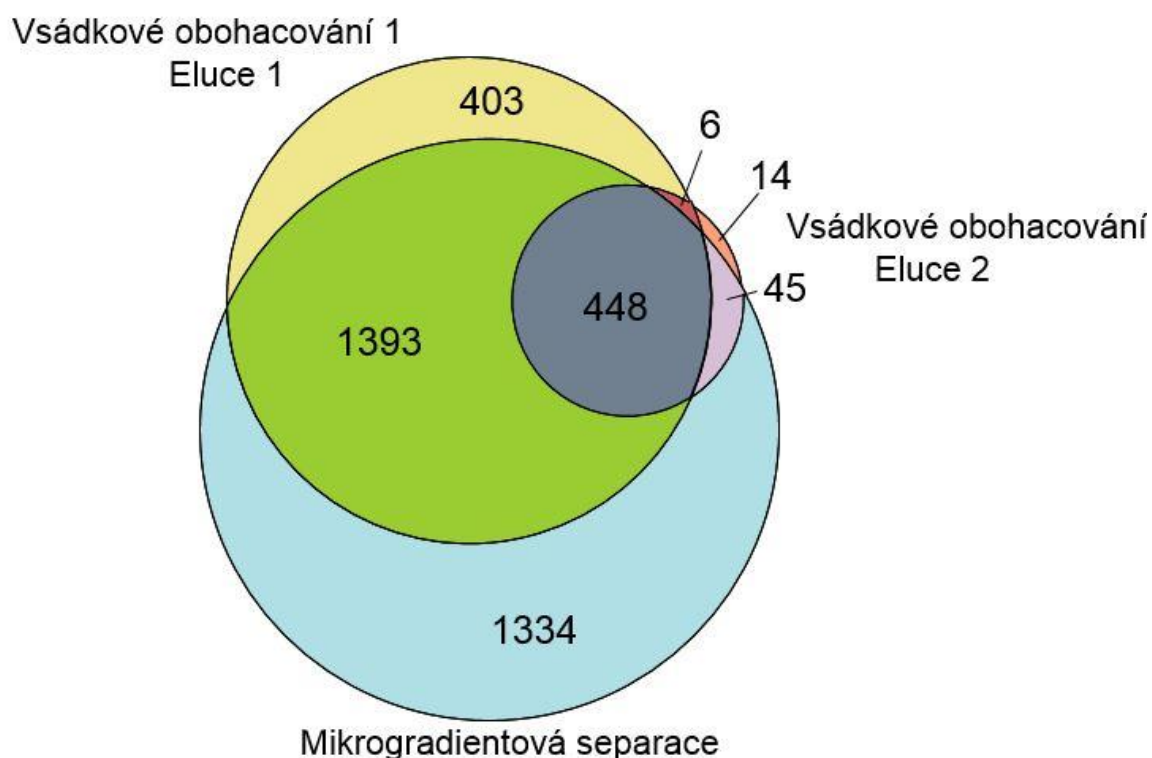
Následně bylo porovnáváno množství fosfopeptidů lyzátu Jurkat buněk obohacovaného na Titansphere vsádkovým provedením s množstvím fosfopeptidů eluovaných mikrogradientovou separací podle elučního schématu B. Pro vsádkové obohacení fosfopeptidů byly použity 3 mg nosiče Titansphere 5 μm a 0,5 mg naštěpené směsi proteinů z buněčného lyzátu Jurkat buněk. Vsádkové obohacení fosfopeptidů bylo pro kontrolu opakováno se stejným vzorkem dvakrát. Pro mikrogradientovou separaci byla připravena kolonka s částicemi Titansphere (délka 55 mm, i.d. 250 μm , částice 5 μm). Pro přípravu kolonky bylo použito cca 6 mg nosiče a pro separaci bylo vzato opět 0,5 mg naštěpené směsi proteinů z buněčného lyzátu Jurkat buněk.

Z obrázku 33 je patrné, že mikrogradientová separace fosfopeptidů je účinnější. Mikrogradientovou separací druhým gradientem dle elučního schématu B bylo eluováno o 1083 unikátních fosfopeptidů více než při vsádkovém provedení. Obě provedení vsádkového

obohacení měly téměř stejné množství eluovaných fosfopeptidů (obr. 33). V prvním vsádkovém obohacení bylo celkové množství fosfopeptidů 2250 (202 unikátních) a ve druhém vsádkovém obohacení bylo celkem 2228 fosfopeptidů (166 unikátních). Celkové množství identifikovaných fosfopeptidů z druhého gradientu mikrogradientové separace dle elučního schématu B bylo 3186. Obrázek 34 ukazuje situaci pro první vsádkové provedení porovnané s mikrogradientovou separací. Celkové množství detekovaných fosfopeptidů z mikrogradientové separace bylo 3220 a vsádkovým obohacením (součtem eluce 1 a eluce 2) bylo detekováno 2309 fosfopeptidů. Celkový počet detekovaných fosfopeptidů po provedení mikrogradientové separace vzrostl o 29 % oproti celkovému množství detekovaného po provedení vsádkového obohacování. Je také patrné, že mikrogradientovou separací bylo získáno více než tisíc (1334) unikátních fosfopeptidů, které nebyly získány v prvním provedení vsádkového provedení. Vsádkovým obohacením bylo eluováno pouze 417 jedinečných fosfopeptidů, které naopak nebyly získány mikrogradientovou elucí. Z výše popsaných důvodů je i přes vyšší časovou náročnost vhodnější pro separaci a izolaci fosfopeptidů mikrogradientová separace.

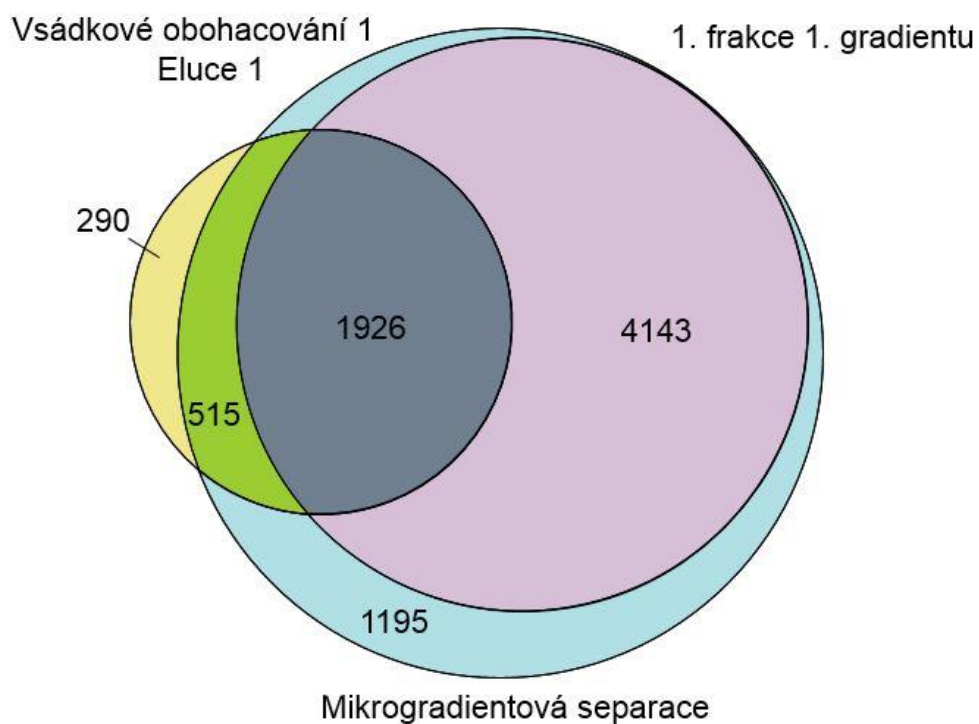


Obrázek 33: Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných fosfopeptidů ze druhého gradientu v mikrogradientové separaci dle elučního schématu B a v prvních elucích dvou pokusů vsádkového obohacování.

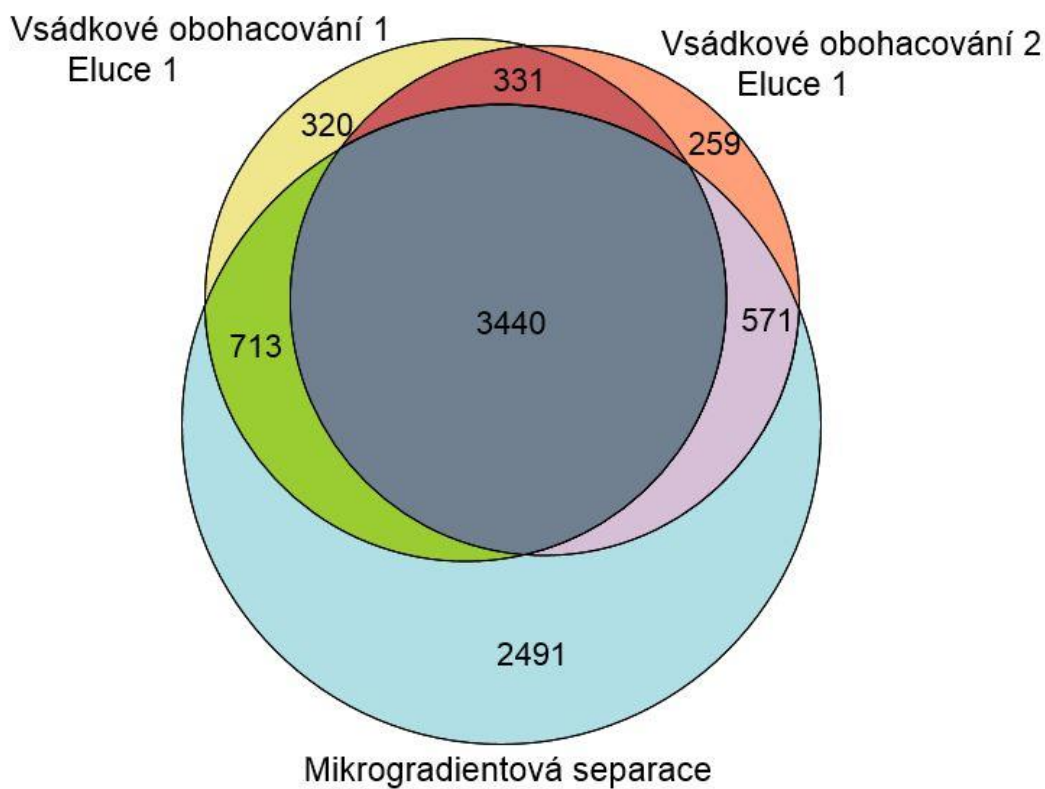


Obrázek 34: Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných fosfopeptidů v mikrogradientové separaci dle elučního schématu B a ve dvou elucích prvního pokusu vsádkového obohacování.

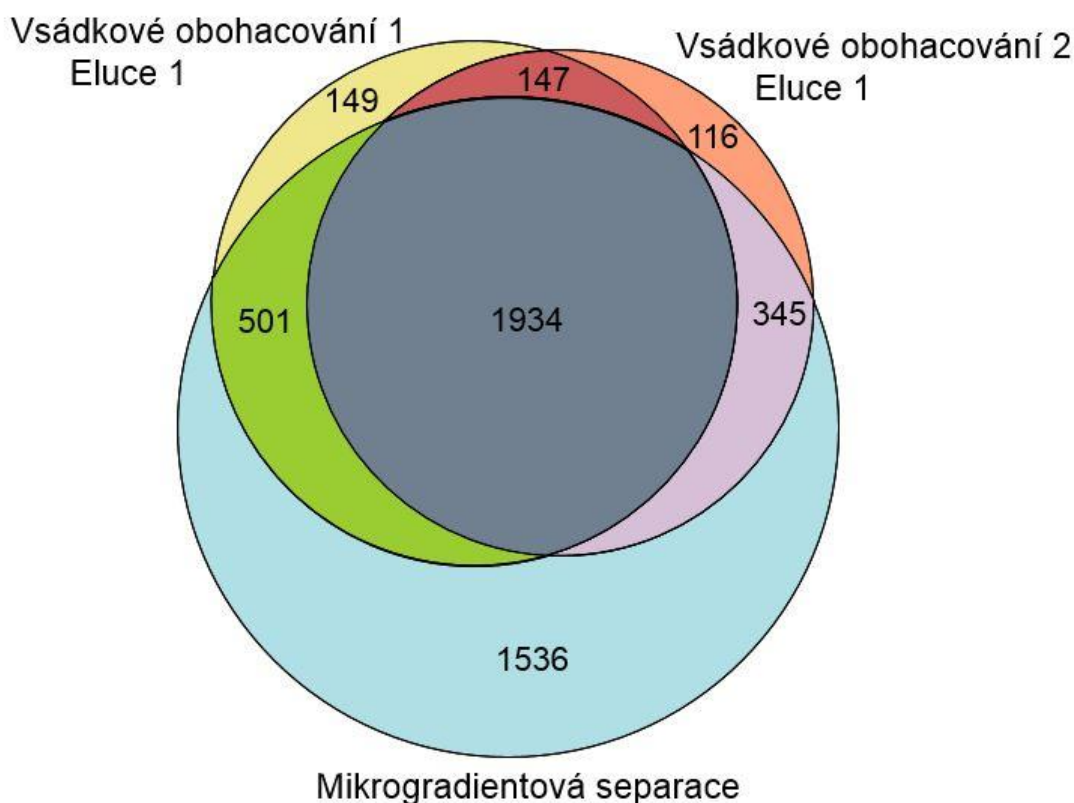
Z obr. 35 je patrné, že celkové množství nefosforylovaných peptidů z prvního i druhého gradientu bylo 7779 a většina nechtěných nefosforylovaných peptidů (6069) byla eluována v první frakci prvního gradientu dle elučního schématu B. Následně byly porovnávány pouze peptidy z druhého gradientu. Obrázek 36 ukazuje, že mikrogradientová separace a vsádkové obohacování se lišily i v celkovém množství eluovaných peptidů. Obě vsádkové provedení se porovnáním počtů identifikovaných peptidů mezi sebou opět téměř nelišily. Při prvním pokusu bylo eluováno celkem 4804 peptidů a při druhém pokusu 4601 peptidů. Pomocí mikrogradientové separace se eluovalo výrazně větší množství celkových peptidů (7215). Z tohoto celkového počtu peptidů bylo 2491 jedinečných pro mikrogradientovou separaci, což bylo mj. způsobeno vyšší nespecifickou sorpcí u mikrogradientové separace. Tato vyšší nespecifická sorpce je zobrazena i na obr. 37, kde bylo při mikrogradientové separaci druhým gradientem eluováno celkem 4316 nefosforylovaných peptidů, přičemž 1536 bylo jedinečných pro mikrogradientovou separaci. Vyšší nespecifická sorpce by mohla být způsobena větším množstvím použitého nosiče (přibližně 6 mg částic Titansphere) pro mikrogradientovou separaci oproti vsádkovému obohacování fosfopeptidů (3 mg částic Titansphere).



Obrázek 35: Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných nefosforylovaných peptidů ve všech frakcích mikrogradientové separace dle elučního schématu B, v první frakci prvního gradientu elučního schématu B a v první eluci prvního provedení vsádkového obohacování.

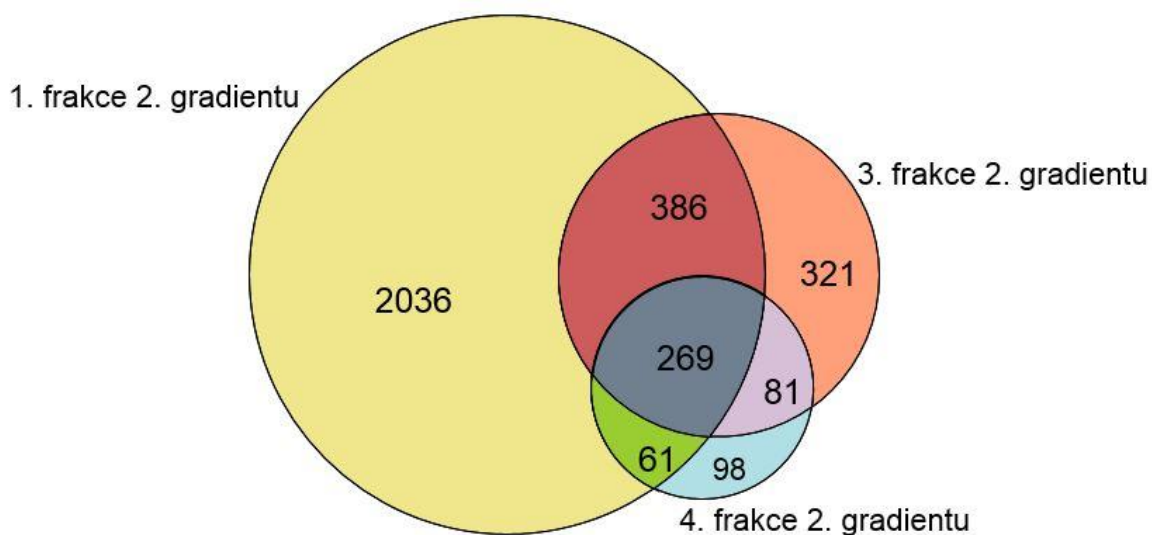


Obrázek 36: Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných peptidů z druhého gradientu v mikrogradientové separaci dle elučního schématu B a v prvních elucích dvou pokusů vsádkového.

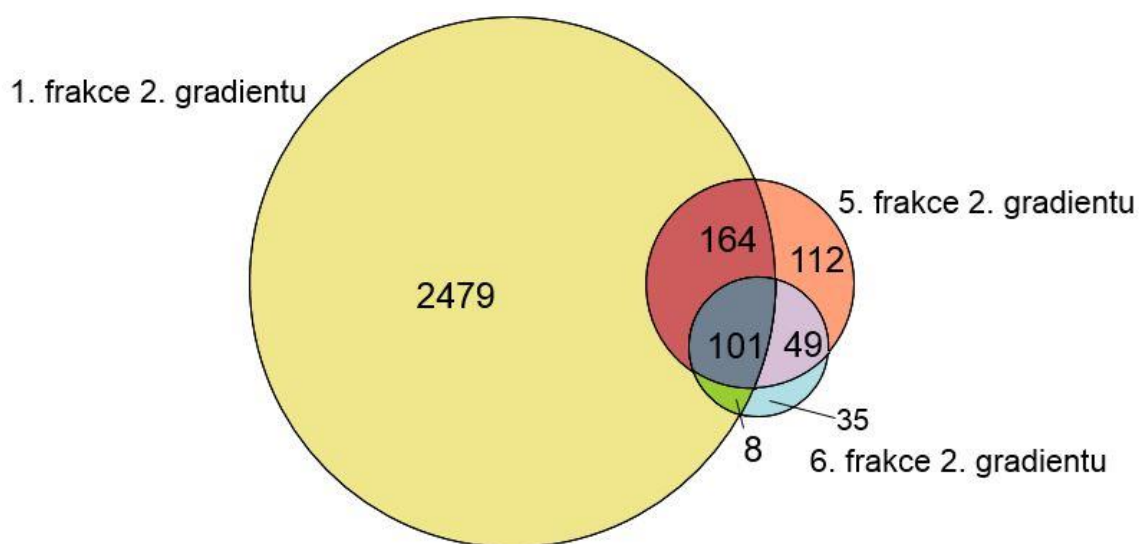


Obrázek 37: Vennův diagram srovnávající celkové množství identifikovaných nefosforylovaných peptidů z druhého gradientu v mikrogradientové separaci dle elučního schématu B a v prvních elucích dvou pokusů vsádkového obohacování.

Na závěr byly srovnány i některé frakce mikrogradientové separace elučního schématu B mezi sebou. Z obrázku 38 i 39 vyplývá, že nejvíce fosfopeptidů (celkem 2752) bylo eluováno v první frakci druhého gradientu. Zároveň obrázek 38 ukazuje, že v první frakci se vyskytovalo 2036 unikátních fosfopeptidů, což je několikanásobně větší počet unikátních fosfopeptidů než ve třetí a čtvrté frakci. Celkově bylo ve třetí frakci 1057 fosfopeptidů a z toho jich bylo pouze 321 unikátních. Ve čtvrté frakci se nacházelo velmi malé množství fosfopeptidů a pouze 98 jich bylo unikátních. Na obrázku 39 je vidět, že v první frakci se nachází velké množství unikátních fosfopeptidů (2479). V páté a šesté frakci druhého gradientu je ve srovnání s první frakcí přítomno ještě méně fosfopeptidů než ve čtvrté frakci. V páté frakci bylo 161 fosfopeptidů (112 unikátních) a v šesté frakci 84 fosfopeptidů (35 unikátních), které se nenacházely v první frakci. Proto by pro další analýzy bylo pravděpodobně výhodné poslední tři frakce po mikrogradientové separaci před vlastní LC-MS analýzou spojit za účelem zkrácení celkové doby analýzy.



Obrázek 38: Vennův diagram srovnávající množství identifikovaných fosfopeptidů v první, třetí a čtvrté frakci druhého gradientu mikrogradientové separace dle elučního schématu B.



Obrázek 39: Vennův diagram srovnávající množství identifikovaných fosfopeptidů v první, páté a šesté frakci druhého gradientu mikrogradientové separace dle elučního schématu B.

V mnoha případech, je u pracovního postupu separace a izolace fosfopeptidů z komplexních směsí zahrnuta nejprve separace a frakcionace vzorku pomocí například SCX chromatografie. Následně jsou všechny frakce podrobeny také obohacení fosfopeptidů na TiO_2 mikrokuličkách a následovány LC-MS analýzou [115]. Tento postup je ale velice pracný. Při mikrogradientové separaci na kolonce se stacionární fázi na bázi TiO_2 dochází zároveň k obohacení i separaci s následnou elucí fosfopeptidů do více frakcí. Výhodou takovéto mikrogradientové separace je možnost vynechání dalšího separačního kroku (SCX, HILIC), čímž dochází k celkovému zjednodušení i urychlení separace a identifikace fosfopeptidů.

Závěr

Fosfopeptidy ze směsi lze obohatit a separovat různými metodami. Tato práce se zabývala zejména separací fosfopeptidů na stacionární fázi na bázi oxidu titaničitého s následnou MS analýzou.

Hlavním cílem této práce byla optimalizace postupu mikrogradientové separace fosfopeptidů na TiO₂ nosiči a následné porovnání účinnosti této separace s již zavedeným postupem vsádkového obohacení a separace fosfopeptidů.

V první části práce byla optimalizovaná mikrogradientová separace fosfopeptidů na jednoduché směsi peptidů standardních proteinů. Optimalizovaný pracovní postup mikrogradientové separace byl následně ověřen a vyzkoušen pomocí reálného vzorku celobuněčného lyzátu Jurkat buněk naštěpeného trypsinem. Ukázalo se však, že protokol optimalizovaný s peptidy standardních proteinů není úplně vhodný pro separaci fosfopeptidů z komplexnější směsi. Z toho důvodu byly následně provedeny další dva postupy mikrogradientové separace fosfopeptidů z buněčného lyzátu Jurkat buněk, z nichž byl vybrán ten nejvhodnější.

Na základě minimálního množství identifikovaných fosfopeptidů a velkého množství nefosforylovaných peptidů v prvním gradientu bylo potvrzeno, že tento první gradient separace slouží jako účinný promývací krok pro redukci nespecifické sorpce. Z toho vyplývá, že se podařilo vhodně nastavit první a druhý eluční gradient tak, abychom minimalizovali nespecifickou sorpci a zároveň získali maximální množství fosfopeptidů.

V další části práce byla porovnávána účinnost mikrogradientové separace a vsádkového obohacování fosfopeptidů z buněčného lyzátu Jurkat buněk. Celkové množství detekovaných fosfopeptidů po provedení mikrogradientové separace bylo o 29 % vyšší, přičemž bylo také detekováno o více než tisíc unikátních fosfopeptidů oproti vsádkovému uspořádání.

V neposlední řadě bylo také porovnáno množství separovaných fosforylovaných peptidů z reálného vzorku v jednotlivých frakcích druhého gradientu mikrogradientové separace. Kvůli nízkému množství fosfopeptidů v posledních třech frakcích by bylo praktické tyto frakce spojit před vlastní LC-MS analýzou za účelem urychlení prováděné analýzy.

Celkově je tedy mikrogradientová separace a frakcionace fosfopeptidů na koloně plněné TiO₂ nosičem přínosná zejména vzhledem k vyššímu počtu detekovaných fosfopeptidů a tím k hlubšímu pokrytí fosfoproteomu analyzovaného vzorku.

4 Seznam použité literatury

- [1] ELLEY, Andrea Renee, Stephan B. H. BACH a George PERRY. Analysis of post-translational modifications in Alzheimer's disease by mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2018. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2018.11.002
- [2] JUNQUEIRA, Stella C., Eduarda G. Z. CENTENO, Kevin A. WILKINSON a Helena CIMAROSTI. Post-translational modifications of Parkinson's disease-related proteins: Phosphorylation, SUMOylation and Ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2018. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2018.10.025
- [3] OO, Htoo Zarni, Roland SEILER, Peter C. BLACK a Mads DAUGAARD. Post-translational modifications in bladder cancer: Expanding the tumor target repertoire. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* [online]. 2018. ISSN 1078-1439. Dostupné z: doi:10.1016/j.urolonc.2018.09.001
- [4] LÓPEZ, Elena, Isabel LÓPEZ, Antonio FERREIRA a Julia SEQUÍ. Retracted: Clinical and Technical Phosphoproteomic Research. *Proteome Science* [online]. 2011, **9**(1), 27. ISSN 1477-5956. Dostupné z: doi:10.1186/1477-5956-9-27
- [5] SHAH, Tapan R. a Ambikanandan MISRA. Chapter 8 - Proteomics. In: Ambikanandan MISRA, ed. *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* [online]. London: Elsevier, 2011, 387–427. ISBN 978-0-12-384964-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384964-9.00008-6
- [6] KOSTERIA, Ioanna, Christina KANAKA-GANTENBEIN, Athanasios K. ANAGNOSTOPOULOS, George P. CHROUSOS a George Th. TSANGARIS. Pediatric endocrine and metabolic diseases and proteomics. *Journal of Proteomics* [online]. 2018, **188**, 46–58. ISSN 1874-3919. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2018.03.011
- [7] CHMELÍK, Josef. Proteomický průvodce. *Chemické listy* [online]. 2005, **99**, 883–885. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_883-885.pdf.
- [8] SARASWATHY, Nachimuthu a Ponnusamy RAMALINGAM. Chapter 10 - Introduction to proteomics. In: Nachimuthu SARASWATHY a Ponnusamy RAMALINGAM, ed. *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics* [online]. Woodhead Publishing, 2011, 147–158. ISBN 978-1-907568-10-7. Dostupné z: doi:10.1533/9781908818058.147
- [9] SHI, Yang, Rong XIANG, Csaba HORVÁTH a James A. WILKINS. The role of liquid chromatography in proteomics. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1053**(1), 27–36. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.07.044
- [10] YU, Li-Rong, Nicolas A. STEWART a Timothy D. VEENSTRA. Chapter 8 - Proteomics: The Deciphering of the Functional Genome. In: Geoffrey S. GINSBURG a Huntington F. WILLARD, ed. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* [online]. San Diego: Academic Press, 2010, 89–96. ISBN 978-0-12-374934-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374934-5.00008-8
- [11] ČEŠKOVÁ, Pavla, Kristýna BROŽKOVÁ, Lenka HERNYCHOVÁ, Jaroslav ŠTĚRBA, Dalibor VALÍK a Bořivoj VOJTĚŠEK. Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a

- diagnostické proteomice: možnosti a limitace. *Chemické listy* [online]. 2006, 100, 974-979. Dostupné z: http://ww.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_11_974-979.pdf.
- [12] AEBERSOLD, Ruedi a Matthias MANN. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003, **422**, 198.
- [13] WALTHER, Tobias C. a Matthias MANN. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2010, **190**(4), 491–500. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201004052
- [14] ROLLAND, Delphine C. M., Megan S. LIM a Kojo S. J. ELENITOBA-JOHNSON. Mass spectrometry and proteomics in hematology. *Seminars in Hematology* [online]. 2018. ISSN 0037-1963. Dostupné z: doi:10.1053/j.seminhematol.2018.05.009
- [15] WILKINS, Marc R., Jean-Charles SANCHEZ, Andrew A. GOOLEY, Ron D. APPEL, Ian HUMPHERY-SMITH, Denis F. HOCHSTRASSER a Keith L. WILLIAMS. Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* [online]. 1996, **13**(1), 19–50. ISSN 0264-8725. Dostupné z: doi:10.1080/02648725.1996.10647923
- [16] KOVÁŘOVÁ, Hana. Proteomika v postgenomové době. *Chemické listy* [online]. 2005, 99, 886–889. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_886-889.pdf.
- [17] BUXBAUM, Engelbert. Part I Protein structure. In: *Fundamentals of protein structure and function*. New York, NY: Springer, 2007, 3-31. ISBN 978-0-387-26352-6.
- [18] WHITFORD, David. Chapter 3 The three-dimensional structure of proteins. In: *Proteins: structure and function*. Hoboken, NJ: J. Wiley & Sons, 2005, 39-83. ISBN 978-0-471-49893-3.
- [19] Chemistry of amino acids and protein structure (obrázek). *Khan Academy* [online]. [cit. 2018-10-14] Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biomolecules/amino-acids-and-proteins/1/a/chemistry-of-amino-acids-and-protein-structure>
- [20] TAYLOR, William R, Alex C W MAY, Nigel P BROWN a András ASZÓDI. Protein structure: geometry, topology and classification. *Reports on Progress in Physics* [online]. 2001, **64**(4), 517–590. ISSN 0034-4885, 1361-6633. Dostupné z: doi:10.1088/0034-4885/64/4/203
- [21] SEO, Ja-Won a Kong-Joo LEE. Post-translational Modifications and Their Biological Functions: Proteomic Analysis and Systematic Approaches. *BMB Reports* [online]. 2004, **37**(1), 35–44. ISSN 1976-6696. Dostupné z: doi:10.5483/BMBRep.2004.37.1.035
- [22] MANN, Matthias a Ole N. JENSEN. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* [online]. 2003, **21**(3), 255–261. ISSN 1087-0156, 1546-1696. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0303-255
- [23] CZUBA, Lindsay C., Kathleen M. HILLGREN a Peter W. SWAAN. Post-translational modifications of transporters. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2018. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2018.06.013

- [24] TSUR, D., S. TANNER, E. ZANDI, V. BAFNA a P.A. PEVZNER. Identification of post-translational modifications via blind search of mass-spectra. In: *2005 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05)* [online]. Stanford, CA, USA: IEEE, 2005, 157–166. ISBN 978-0-7695-2344-6. Dostupné z: doi:10.1109/CSB.2005.34
- [25] YATES, John R., Jimmy K. ENG a Ashley L. MCCORMACK. Mining Genomes: Correlating Tandem Mass Spectra of Modified and Unmodified Peptides to Sequences in Nucleotide Databases. *Analytical Chemistry* [online]. 1995, **67**(18), 3202–3210. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00114a016
- [26] LARSEN, Martin R., Tine E. THINGHOLM, Ole N. JENSEN, Peter ROEPSTORFF a Thomas JD JØRGENSEN. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005, **4**(7), 873–886. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.T500007-MCP200
- [27] WITZE, Eric S., William M. OLD, Katheryn A. RESING a Natalie G. AHN. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods* [online]. 2007, **4**(10), 798. ISSN: 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth1100
- [28] JENSEN, Ole Nørregaard. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology* [online]. 2004, **8**(1), 33-41. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2003.12.009
- [29] BLOM, Nikolaj, Steen GAMMELTOFT a Søren BRUNAK. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1999, **294**(5), 1351–1362. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1999.3310
- [30] LEITNER, Alexander. Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2010, **29**(2), 177–185. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2009.08.007
- [31] HUMPHREY, Sean J., David E. JAMES a Matthias MANN. Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [online]. 2015, **26**(12), 676–687. ISSN 1043-2760. Dostupné z: doi:10.1016/j.tem.2015.09.013
- [32] THINGHOLM, Tine E., Ole N. JENSEN a Martin R. LARSEN. Analytical strategies for phosphoproteomics. *PROTEOMICS* [online]. 2009, **9**(6), 1451–1468. ISSN 16159853, 16159861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200800454
- [33] Phosphorylation (obrázek) [online]. [cit. 2018-11-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html>
- [34] DAUB, Henrik, Jesper V. OLSEN, Michaela BAIRLEIN, Florian GNAD, Felix S. OPPERMANN, Roman KÖRNER, Zoltán GREFF, György KÉRI, Olaf STEMMANN a Matthias MANN. Kinase-Selective Enrichment Enables Quantitative Phosphoproteomics of the Kinome across the Cell Cycle. *Molecular Cell* [online]. 2008, **31**(3), 438–448. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2008.07.007

- [35] MACEK, Boris, Matthias MANN a Jesper V. OLSEN. Global and Site-Specific Quantitative Phosphoproteomics: Principles and Applications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2009, **49**(1), 199–221. ISSN 0362-1642, 1545-4304. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145606
- [36] REINDERS, Joerg a Albert SICKMANN. State-of-the-art in phosphoproteomics. *PROTEOMICS* [online]. 2005, **5**(16), 4052–4061. ISSN 1615-9853, 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200401289
- [37] ENGHOLM-KELLER, Kasper, Thomas Aarup HANSEN, Giuseppe PALMISANO a Martin R. LARSEN. Multidimensional Strategy for Sensitive Phosphoproteomics Incorporating Protein Prefractionation Combined with SIMAC, HILIC, and TiO₂ Chromatography Applied to Proximal EGF Signaling. *Journal of Proteome Research* [online]. 2011, **10**(12), 5383–5397. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr200641x
- [38] ENGHOLM-KELLER, Kasper a Martin R. LARSEN. Titanium dioxide as chemo-affinity chromatographic sorbent of biomolecular compounds — Applications in acidic modification-specific proteomics. *Journal of Proteomics* [online]. 2011, **75**(2), 317–328. ISSN 1874-3919. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2011.07.024
- [39] KIM, Yong-In a Je-Yoel CHO. Gel-based proteomics in disease research: Is it still valuable? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. 2019, **1867**(1), 9–16. ISSN 1570-9639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2018.08.001
- [40] GWOZDZ, Tomasz a Karel DOREY. Chapter 6 - Western Blot. In: Morteza JALALI, Francesca Y. L. SALDANHA a Mehdi JALALI, ed. *Basic Science Methods for Clinical Researchers* [online]. Boston: Academic Press, 2017, 99–117. ISBN 978-0-12-803077-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00006-0
- [41] JIN, Shi a Robert T. KENNEDY. New developments in Western blot technology. *Chinese Chemical Letters* [online]. 2015, **26**(4), 416–418. ISSN 1001-8417. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccllet.2015.01.021
- [42] CAPRIOTTI, Anna Laura, Chiara CAVALIERE, Francesca FERRARIS, Valentina GIANOTTI, Michele LAUS, Susy PIOVESANA, Katia SPARNACCI, Riccardo ZENEZINI CHIOZZI a Aldo LAGANÀ. New Ti-IMAC magnetic polymeric nanoparticles for phosphopeptide enrichment from complex real samples. *Talanta* [online]. 2018, **178**, 274–281. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.09.010
- [43] SUI, Shao-Hui, Jun-Jun DONG, Jing-Lan WANG, Yun CAI a Xiao-Hong QIAN. Comparison of Phosphoproteomic Separation Strategies Based on Strong Cation Exchange Chromatography and Isoelectric Focusing Techniques. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, **40**(2), 177–183. ISSN 18722040. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2040(11)60526-4
- [44] LEE, Wen-Chien a Kelvin H LEE. Applications of affinity chromatography in proteomics. *Analytical Biochemistry* [online]. 2004, **324**(1), 1–10. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2003.08.031
- [45] HAGE, David S., Jeanethe A. ANGUIZOLA, Cong BI, Rong LI, Ryan MATSUDA, Efthimia PAPASTAVROS, Erika PFAUNMILLER, John VARGAS a Xiwei ZHENG.

- Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2012, **69**, 93–105. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jpba.2012.01.004
- [46] CUTLER, Paul (ed.). *Methods in Molecular Biology, vol. 244: Protein Purification Protocols*. 2. ed. Totowa, N.J: Humana Press, 2004.
- [47] AZARKAN, Mohamed, Joëlle HUET, Danielle BAEYENS-VOLANT, Yvan LOOZE a Guy VANDENBUSSCHE. Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **849**(1), Analytical Tools for Proteomics, 81–90. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.056
- [48] HUNTER, Tony. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* [online]. 1995, **80**(2), 225–236. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(95)90405-0
- [49] GRØNBORG, Mads, Troels Zakarias KRISTIANSEN, Allan STENSBALLE, Jens S. ANDERSEN, Osamu OHARA, Matthias MANN, Ole Nørregaard JENSEN a Akhilesh PANDEY. A Mass Spectrometry-based Proteomic Approach for Identification of Serine/Threonine-phosphorylated Proteins by Enrichment with Phospho-specific Antibodies: Identification of a Novel Protein, Frigg, as a Protein Kinase A Substrate. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2002, **1**(7), 517–527. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M200010-MCP200
- [50] COLLINS, Mark O., Lu YU a Jyoti S. CHOUDHARY. Analysis of protein phosphorylation on a proteome-scale. *PROTEOMICS* [online]. 2007, **7**(16), 2751–2768. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200700145
- [51] BRILL, Laurence M., Arthur R. SALOMON, Scott B. FICARRO, Mridul MUKHERJI, Michelle STETTLER-GILL a Eric C. PETERS. Robust Phosphoproteomic Profiling of Tyrosine Phosphorylation Sites from Human T Cells Using Immobilized Metal Affinity Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2004, **76**(10), 2763–2772. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac035352d
- [52] LANSDELL, Theresa A. a Jetze J. TEPE. Isolation of phosphopeptides using solid phase enrichment. *Tetrahedron Letters* [online]. 2004, **45**(1), 91–93. ISSN 0040-4039. Dostupné z: doi:10.1016/j.tetlet.2003.10.111
- [53] SCHMIDT, Stefan R., Fritz SCHWEIKART a Martin E. ANDERSSON. Current methods for phosphoprotein isolation and enrichment. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **849**(1), 154–162. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.016
- [54] HARCUM, Sarah Waterman. Chapter 2 - Purification of protein solutions. In: A. ABBOTT a M. ELLISON, ed. *Biologically Inspired Textiles* [online]. B.m.: Woodhead Publishing, 2008, , 26–43. ISBN 978-1-84569-247-6. Dostupné z: doi:10.1533/9781845695088.1.26
- [55] FEKETE, Szabolcs, Alain BECK, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, **113**, 43–55. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.02.037

- [56] CLARKE MILLER, M. Ion Exchange | Isolation of Biopolymers. In: Paul WORSFOLD, Colin POOLE, Alan TOWNSHEND a Manuel MIRÓ, ed. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)* [online]. Oxford: Academic Press, 2019, 190–194. ISBN 978-0-08-101984-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14241-6
- [57] HADDAD, P. R. CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Mechanisms: Ion Chromatography. In: Ian D. WILSON, ed. *Encyclopedia of Separation Science* [online]. Oxford: Academic Press, 2000, 696–705. ISBN 978-0-12-226770-3. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-226770-2/00321-5
- [58] BAUER, M. M. T. a G. SCHNAPP. 3.19 - Protein Production for Three-Dimensional Structural Analysis. In: John B. TAYLOR a David J. TRIGGLE, ed. *Comprehensive Medicinal Chemistry II* [online]. Oxford: Elsevier, 2007, 411–432. ISBN 978-0-08-045044-5. Dostupné z: doi:10.1016/B0-08-045044-X/00092-4
- [59] AHAMED, Tangir, Beckley K. NFOR, Peter D. E. M. VERHAERT, Gijs W. K. VAN DEDEM, Luuk A. M. VAN DER WIELEN, Michel H. M. EPPINK, Emile J. A. X. VAN DE SANDT a Marcel OTTENS. pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1164**(1), 181–188. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.07.010
- [60] BEAUSOLEIL, Sean A., Mark JEDRYCHOWSKI, Daniel SCHWARTZ, Joshua E. ELIAS, Judit VILLÉN, Jiaxu LI, Martin A. COHN, Lewis C. CANTLEY a Steven P. GYGI. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, **101**(33), 12130–12135. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0404720101
- [61] CHEN, Xi, Di WU, Yong ZHAO, Barry H.C. WONG a Lin GUO. Increasing phosphoproteome coverage and identification of phosphorylation motifs through combination of different HPLC fractionation methods. *Journal of Chromatography B* [online]. 2011, **879**(1), 25–34. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2010.11.004
- [62] HENNRICH, Marco L., Henk W. P. VAN DEN TOORN, Vincent GROENEWOLD, Albert J. R. HECK a Shabaz MOHAMMED. Ultra Acidic Strong Cation Exchange Enabling the Efficient Enrichment of Basic Phosphopeptides. *Analytical Chemistry* [online]. 2012, **84**(4), 1804–1808. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac203303t
- [63] LI, Xiao-Shui, Bi-Feng YUAN a Yu-Qi FENG. Recent advances in phosphopeptide enrichment: Strategies and techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **78**, 70–83. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.11.001
- [64] HAN, Guanghui, Mingliang YE, Houjiang ZHOU, Xinning JIANG, Shun FENG, Xiaogang JIANG, Ruijun TIAN, Dafang WAN, Hanfa ZOU a Jianren GU. Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography. *PROTEOMICS* [online]. 2008, **8**(7), 1346–1361. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200700884
- [65] NÚÑEZ, Cristina, Maria del Pilar CHANTADA-VÁZQUEZ, Susana B. BRAVO a Sergio VÁZQUEZ-ESTÉVEZ. Novel functionalized nanomaterials for the effective enrichment

- of proteins and peptides with post-translational modifications. *Journal of Proteomics* [online]. 2018, **181**, 170–189. ISSN 1874-3919. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2018.04.017
- [66] NÜHSE, Thomas S., Allan STENSBALLE, Ole N. JENSEN a Scott C. PECK. Large-scale Analysis of *in Vivo* Phosphorylated Membrane Proteins by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography and Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2003, **2**(11), 1234–1243. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.T300006-MCP200
- [67] BATALHA, Iris L., Christopher R. LOWE a Ana C. A. ROQUE. Platforms for enrichment of phosphorylated proteins and peptides in proteomics. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, **30**(2), 100–110. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2011.07.004
- [68] XIE, Fang, Richard D. SMITH a Yufeng SHEN. Advanced proteomic liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1261**, 78–90. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.06.098
- [69] MOTOYAMA, Akira a John R. YATES. Multidimensional LC Separations in Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, **80**(19), 7187–7193. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac8013669
- [70] SANDRA, Koen, Mahan MOSHIR, Filip D'HONDT, Katleen VERLEYSSEN, Koen KAS a Pat SANDRA. Highly efficient peptide separations in proteomics: Part 1. Unidimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* [online]. 2008, **866**(1), 48–63. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.10.034
- [71] ALBUQUERQUE, Claudio P., Marcus B. SMOLKA, Samuel H. PAYNE, Vineet BAFNA, Jimmy ENG a Huilin ZHOU. A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2008, **7**(7), 1389–1396. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M700468-MCP200
- [72] BOERSEMA, Paul J., Shabaz MOHAMMED a Albert J. R. HECK. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, **391**(1), 151–159. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-008-1865-7
- [73] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(1), 231–247. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-5308-5
- [74] MCNULTY, Dean E. a Roland S. ANNAN. Hydrophilic Interaction Chromatography Reduces the Complexity of the Phosphoproteome and Improves Global Phosphopeptide Isolation and Detection. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2008, **7**(5), 971–980. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M700543-MCP200
- [75] ALPERT, Andrew J. Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides.

- Analytical Chemistry* [online]. 2008, **80**(1), 62–76. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac070997p
- [76] ZHANG, Xiang, Ai Qin FANG, Catherine P. RILEY, Mu WANG, Fred E. REGNIER a Charles BUCK. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics—A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2010, **664**(2), 101–113. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2010.02.001
- [77] FRANÇOIS, Isabelle, Koen SANDRA a Pat SANDRA. Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations—A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **641**(1), 14–31. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.03.041
- [78] WU, Qi, Huiming YUAN, Lihua ZHANG a Yukui ZHANG. Recent advances on multidimensional liquid chromatography–mass spectrometry for proteomics: From qualitative to quantitative analysis—A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2012, **731**, 1–10. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2012.04.010
- [79] ROY, Ipsita, Kalyani MONDAL a Munishwar N. GUPTA. Leveraging protein purification strategies in proteomics. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **849**(1), 32–42. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.016
- [80] KRENKOVA, Jana, Jaroslava MORAVKOVA, Jan BUK a Frantisek FORET. Phosphopeptide enrichment with inorganic nanofibers prepared by forcespinning technology. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, **1427**, 8–15. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.12.022
- [81] KRENKOVA, Jana, Jaroslava MORAVKOVA, Jan BUK a Frantisek FORET. Phosphopeptide enrichment with inorganic nanofibers prepared by forcespinning technology. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, **1427**, 8–15. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.12.022
- [82] KRENKOVA, Jana a Frantisek FORET. Iron oxide nanoparticle coating of organic polymer-based monolithic columns for phosphopeptide enrichment. *Journal of Separation Science* [online]. 2011, **34**, 2106–2112. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201100256
- [83] WU, Yonglei, Qianjing LIU a Chunhui DENG. l-cysteine-modified metal-organic frameworks as multifunctional probes for efficient identification of N-linked glycopeptides and phosphopeptides in human crystalline lens. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2019. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.01.052
- [84] SUN, Nianrong, Zidan WANG, Jiawen WANG, Hemei CHEN, Hao WU, Shun SHEN a Chunhui DENG. Hydrophilic tripeptide combined with magnetic titania as a multipurpose platform for universal enrichment of phospho- and glycopeptides. *Journal of Chromatography A* [online]. 2019. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.02.039
- [85] XU, Dongpo, Guoquan YAN, Mingxia GAO, Chunhui DENG a Xiangmin ZHANG. Highly selective SiO₂–NH₂@TiO₂ hollow microspheres for simultaneous enrichment of phosphopeptides and glycopeptides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online].

- 2017, **409**(6), 1607–1614. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-016-0101-0
- [86] HONG, Yayun, Qiliang ZHAN, Yu ZHENG, Chenlu PU, Hongli ZHAO a Minbo LAN. Hydrophilic phytic acid-functionalized magnetic dendritic mesoporous silica nanospheres with immobilized Ti⁴⁺: A dual-purpose affinity material for highly efficient enrichment of glycopeptides/phosphopeptides. *Talanta* [online]. 2019, **197**, 77–85. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.01.005
- [87] HONG, Yayun, Hongli ZHAO, Chenlu PU, Qiliang ZHAN, Qianying SHENG a Minbo LAN. Hydrophilic Phytic Acid-Coated Magnetic Graphene for Titanium(IV) Immobilization as a Novel Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Immobilized Metal Affinity Chromatography Platform for Glyco- and Phosphopeptide Enrichment with Controllable Selectivity. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, **90**(18), 11008–11015. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b02614
- [88] ZHU, Baode, Qian ZHOU, Deshuai ZHEN, Ying WANG, Qingyun CAI a Ping CHEN. Preparation of TiO₂/Bi/Fe/Zr nanocomposite for the highly selective enrichment of phosphopeptides. *Talanta* [online]. 2019, **194**, 870–875. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2018.10.073
- [89] WEI, Xiao-Na a Hui-Long WANG. Facile fabrication of hydrophilic PAA-Ti/TiO₂ nanocomposite for selective enrichment and detection of phosphopeptides from complex biological samples. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, **949**, 67–75. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.10.036
- [90] JIANG, Dandan, Xiqian LI, Jiutong MA a Qiong JIA. Development of Gd³⁺-immobilized glutathione-coated magnetic nanoparticles for highly selective enrichment of phosphopeptides. *Talanta* [online]. 2018, **180**, 368–375. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2017.12.048
- [91] ZHU, Gang-Tian, Xiao-Mei HE, Xi CHEN, Dilshad HUSSAIN, Jun DING a Yu-Qi FENG. Magnetic graphitic carbon nitride anion exchanger for specific enrichment of phosphopeptides. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, **1437**, 137–144. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.01.080
- [92] SOMOGYI, ÁRPÁD. Chapter 6 - Mass spectrometry instrumentation and techniques. In: Károly VÉKEY, András TELEKES a Akos VERTES, ed. *Medical Applications of Mass Spectrometry* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2008, 93–140. ISBN 978-0-444-51980-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044451980-1.50008-2
- [93] FRIEDECKÝ, David a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* [online]. 2012, 20(41), 152-157. ISSN: 1210-7921
- [94] CAÑAS, Benito, Daniel LÓPEZ-FERRER, Antonio RAMOS-FERNÁNDEZ, Emilio CAMAFEITA a Enrique CALVO. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Briefings in Functional Genomics* [online]. 2006, **4**(4), 295–320. ISSN 2041-2649. Dostupné z: doi:10.1093/bfgp/eli002
- [95] KARAS, Michael a Ralf KRÜGER. Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism. *Chemical Reviews* [online]. 2003, **103**(2), 427–440. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr010376a

- [96] YATES, John R. Mass spectrometry: from genomics to proteomics. *Trends in Genetics* [online]. 2000, **16**(1), 5–8. ISSN 0168-9525. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-9525(99)01879-X
- [97] HAN, Xuemei, Aaron ASLANIAN a John R YATES. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2008, **12**(5), 483–490. ISSN 1367-5931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.024
- [98] GYGI, Steven P a Ruedi AEBERSOLD. Mass spectrometry and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2000, **4**(5), 489–494. ISSN 1367-5931. Dostupné z: doi:10.1016/S1367-5931(00)00121-6
- [99] GROSS, Jürgen H. *Mass spectrometry: a textbook*. 2. ed. Berlin: Springer, 2011. ISBN 978-3-642-10709-2.
- [100] EKMAN, Rolf, Jerzy SILBERRING, Ann WESTMAN-BRINKMALM a Agnieszka KRAJ (ed.). *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, 2009. ISBN 978-0-471-71395-1
- [101] Quadrupole mass analyzer schematic (obrázek). *ResearchGate* [online]. [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Quadrupole-mass-analyzer-schematic_fig2_45062331
- [102] DOUGLAS, Donald J., Aaron J. FRANK a Dunmin MAO. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2005, **24**(1), 1–29. ISSN 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.20004
- [103] SCHWARTZ, Jae C, Michael W SENKO a John E. P SYKA. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2002, **13**(6), 659–669. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:10.1016/S1044-0305(02)00384-7
- [104] HU, Qizhi, Robert J. NOLL, Hongyan LI, Alexander MAKAROV, Mark HARDMAN a R. Graham COOKS. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2005, **40**(4), 430–443. ISSN 1096-9888. Dostupné z: doi:10.1002/jms.856
- [105] PERRY, Richard H., R. Graham COOKS a Robert J. NOLL. Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2008, **27**(6), 661–699. ISSN 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.20186
- [106] SCIGELOVA, Michaela a Alexander MAKAROV. Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *PROTEOMICS* [online]. 2006, **6**(S2), 16–21. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200600528
- [107] WILKINS, Marc R., Ron D. APPEL, Jennifer E. Van EYK, Maxey C. M. CHUNG, Angelika GÖRG, Michael HECKER, Lukas A. HUBER, Hanno LANGEN, Andrew J. LINK, Young-Ki PAIK, Scott D. PATTERSON, Stephen R. PENNINGTON, Thierry RABILLOUD, Richard J. SIMPSON, Walter WEISS a Michael J. DUNN. Guidelines for the next 10 years of proteomics. *PROTEOMICS* [online]. 2006, **6**(1), 4–8. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200500856

- [108] JENSEN, Ole Nørregaard. Interpreting the protein language using proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2006, **7**(6), 391–403. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm1939
- [109] POTEL, Clement M., Simone LEMEER a Albert J. R. HECK. Phosphopeptide Fragmentation and Site Localization by Mass Spectrometry: An Update. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, **91**(1), 126–141. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b04746
- [110] JOHNSON, Richard S., Michael T. DAVIS, J. Alex TAYLOR a Scott D. PATTERSON. Informatics for protein identification by mass spectrometry. *Methods* [online]. 2005, **35**(3), 223–236. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2004.08.014
- [111] DIAMENT, Benjamin J. a William Stafford NOBLE. Faster SEQUEST Searching for Peptide Identification from Tandem Mass Spectra. *Journal of Proteome Research* [online]. 2011, **10**(9), 3871–3879. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr101196n
- [112] CZERNICK, Drew, Jess LIU, Dibart SERGE a Erdjan SALIH. Topographical distribution of phosphorylation sites of phosphotyrosines by mass spectrometry. *Journal of Proteomics* [online]. 2013, **83**, 76–98. ISSN 18743919. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2013.02.016
- [113] SUGIYAMA, Naoyuki, Takeshi MASUDA, Kosaku SHINODA, Akihiro NAKAMURA, Masaru TOMITA a Yasushi ISHIHAMA. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007, **6**(6), 1103–1109. Dostupné z: doi: 10.1074/mcp.T600060-MCP200
- [114] YANG, Chenxi, Xuefei ZHONG a Lingjun LI. Recent advances in enrichment and separation strategies for mass spectrometry-based phosphoproteomics: Proteomics and 2DE. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2014, **35**(24), 3418–3429. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201400017
- [115] KETTENBACH, Arminja N. a Scott A. GERBER. Rapid and reproducible single-stage phosphopeptide enrichment of complex peptide mixtures: Application to general and phosphotyrosine-specific phosphoproteomics experiments. *Analytical chemistry* [online]. 2011, **83**(20), 7635. Dostupné z: doi:10.1021/ac201894j

Přílohy

Příloha 1: Přehled fosfopeptidů odvozených po tryptickém štěpením α S1 kaseinu, α S2 kaseinu a β kaseinu [26].

Protein	Peptidová sekvence (od–do)	Modifikace	Larsen et al.	[M+H] ⁺ *
α -S2-kasein	EQLSTSEENSK (141–151)	1P	1331,53	
α -S2-kasein	EQLSTSEENSK (141–151)	2P	1411,50	
α -S2-kasein	TVDMESTEVFTK (153–164)	1P	1466,61	1466,6121
α -S2-kasein	TVDMESTEVFTK (153–164)	1O 1P		1482,6070
α -S2-kasein	EQLSTSEENSKK (141–152)	2P		1539,5975
α -S2-kasein	TVDMESTEVFTKK (152–164)	1P	1594,70	1594,7070
α -S2-kasein	KTVDMESTEVFTK (152–164)	1O 1P		1610,7019
α -S1-kasein	VPQLEIVPNSAEER (121–134)	1P	1660,79	1660,7942
α -S1-kasein	YLGEYLIVPNSAEER	1P	1832,83	
α -S1-kasein	DIGSESTEDQAMEDIK (58–73)	1P	1847,69	1847,7252
α -S1-kasein	DIGSESTEDQAMEDIK (58–73)	1O 1P		1863,7202
α -S1-kasein	DIGSESTEDQAMEDIK (58–73)	2P	1927,69	1927,6916
α -S1-kasein	DIGSESTEDQAMEDIK (58–73)	1O 2P		1943,6865
α -S1-kasein	YKVPQLEIVPNSAEER (119–134)	1P	1951,95	1951,9525
α -S2-kasein	NTMEHVSSEESIISQETYK (17–36)	4P	2619,04	
α -S1-kasein	QMEAESISSSEEIVPNSVEQK (74–94)	1Q→pyro-E 4P		2623,9201
α -S1-kasein	VNELSKDIGSESTEDQAMED IK (52–73)	3P	2678,01	2678,0229
α -S1-kasein	VNELSKDIGSESTEDQAMED IK (52–73)	1O 3P		2694,0178

α -S1-kasein	QMEAESISSSEEIVPNSVEQK (74–94)	1P→pyro-Q 5P		2703,8864
α -S1-kasein	QMEAESISSSEEIVPNSVEAQ K (74–94)	5P	2720,91	2720,9130
α -S1-kasein	QMEAESISSSEEIVPNSVEQK (74–94)	1O 5P		2736,9079
α -S2-kasein	NTMEHVSSEESIISQETYKQ (17–37)	4P	2747,10	
α -S1-kasein	EKVNELSKDIGSESTEDQAM EDIK (50–73)	3P	2935,15	
α -S2-kasein	NANEEYYSIGSSSEESAEVAT EEVK (61–85)	4P	3008,01	3008,0296
α -S2-kasein	NANEEYYSIGSSSEESAEVAT EEVK (61–85)	5P	3087,99	3084,9959
α -S2-kasein	KNTMEHVSSEESIISQETYK QEK (16–39)	4P	3132,20	

* experimentálně identifikované fosfopeptidy

Příloha 2: Přehled experimentálně identifikovaných fosfopeptidů odvozených po tryptickém štěpením fosfvitinu doplněných fosfopeptidy z Czernick et al. [112].

Peptidová sekvence (od–do)	Modifikace	Czernik et al.	[M+H] ⁺
TTSFPHAS (1249–1256)	1P		927,367
TTSFPHASA (1249–1257)	1P		998,404
TTSFPHASAA (1249–1258)	1P	1069,435	1069,443
TTSFPHASAA (1249–1258)	2P	1149,401	1149,411
DSSEKFLR (1–9)	1P		1190,509
ASQGDQPINLK (1123–1133)	1P		1250,578
DSSEKFLR (1–9)	2P		1270,475
SFPHASAAEGER (1251–1262)	1P	1338,547	1338,555
KILDDTDNQATR (1080–1091)	1P		1469,663
TTSFPHASAAEGER (1249–1262)	1P	1540,643	1540,643

ESVLSDSGVSEYEK (1721–1734)	1P		1608,668
TTSFPHASAAEGER (1249–1262)	2P	1620,609	1620,609
GNTVLAIEFGTEPDAK (1107–1121)	1P	1628,720	1628,720
AEFGTEPDAKTSSS (1112–1125)	3P	1666,532	
TTSFPHASAAEGER (1249–1262)	3P		1700,575
KGNTVLAIEFGTEPDAK (1106–1121)	1P	1756,815	1756,815
AEFGTEPDAKTSSSS (1112–1126)	4P	1833,531	
SQFNHSSYDIPNEWET	1P	2120,823	
SQFNHSSYDIPNEWET	2P	2200,795	
--	3P		2408,935
AEFGTEPDAKTSSSSSSASSTATSSASS (1112–1139)	5P	3024,960	
AEFGTEPDAKTSSSSSSASSTATSSASSS (1112–1139)	5P	3111,992	