

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Stanovení proteinových
markerů Alzheimerovy
nemoci metodou
tandemové hmotnostní
spektrometrie**

Diplomová práce

BC. JAROMÍR STRÁNÍK

Vedoucí práce: PharmDr. Zdeněk Spáčil, Ph.D.

Ústav biochemie
obor Analytická biochemie

Brno 2021



Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Jaromír Stráník Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Ústav biochemie
Název práce:	Stanovení proteinových markerů Alzheimerovy nemoci metodou tandemové hmotnostní spektrometrie
Studijní program:	Biochemie
Specializace:	Analytická biochemie
Vedoucí práce:	PharmDr. Zdeněk Spáčil, Ph.D.
Rok:	2021
Počet stran:	69
Klíčová slova:	Alzheimerova nemoc, Cerebrální organoidy, LC-MS/MS, Cílená proteomika, SRM metoda, biomarkery Alzheimerovy nemoci

Bibliographic record

Author: Bc. Jaromír Stráník
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of Thesis: Determination of protein markers relevant to
Alzheimer's disease by tandem mass
spectrometry

Degree Programme: Biochemistry

Field of Study: Analytical Biochemistry

Supervisor: PharmDr. Zdeněk Spáčil, Ph.D.

Year: 2021

Number of Pages: 69

Keywords: Alzheimer disease, Cerebral organoids, LC-
MS/MS, Targeted proteomics, SRM method,
biomarkers of Alzheimer disease

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo aplikovat moderní metody kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie na vzorky cerebrálních organoidů (3-D buněčného modelového systému) ke stanovení proteinových buněčných markerů a vybraných markerů souvisejících s AN. Hladiny proteinů v organoidech odvozených z buněk pacienta s dědičnou formou Alzheimerovy nemoci byly porovnány s hladinami proteinů v kontrolních organoidech odvozených z buněk zdravého jedince. Jednalo se o časoběrný experiment, s analýzou organoidů v různých časových bodech kultivace (48, 76, 95, 110, 135, 160 dní). Výsledky mé práce by mohly pomoci při charakterizaci cerebrálních organoidů, jakožto nového perspektivního modelu pro studium molekulární podstaty Alzheimerovy nemoci.

Abstract

This diploma thesis aimed to apply state-of-the-art liquid chromatography and tandem mass spectrometry techniques to cerebral organoids to determine selected protein cell markers and markers related to Alzheimer's disease. Protein levels in organoids derived from cells of a patient with a familial Alzheimer's disease were compared to protein levels in control organoids derived from cells of a healthy individual in a time-lapse experiment in which organoids were collected at different time points of the cultivation. (48, 76, 95, 110, 135, 160 days). My results could possibly help with characterization of cerebral organoids, as a new promising model for studying the molecular principles of Alzheimer's disease.

STANOVENÍ PROTEINOVÝCH MARKERŮ ALZHEIMEROVY NEMOCI METODOU TANDEMOVÉ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

MUNI
SCI

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KOTLARSKÁ 2., 611 37 BRNO
IČ: 00216224
DIČ: CZ00216224

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2019/2020

Ústav:	Ústav biochemie
Student:	Bc. Jaromír Stránilk
Program:	Biochemie
Obor:	Analytická biochemie

Ředitel Ústavu biochemie PFF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Stanovení proteinových markerů Alzheimerovy nemoci metodou tandemové hmotnostní spektrometrie
Název práce anglicky:	Determination of protein markers relevant to Alzheimer's disease by tandem mass spectrometry

Oficiální zadání:

Alzheimerova nemoc je nejběžnější příčinou demence (60-80% případů) u stárnoucí populace po celém světě. Tradiční výzkum se zabývá agregací membránových proteinů, především beta-amyloidu a tau-proteinu, které jsou charakteristickým znakem Alzheimerovy nemoci. Navzdory nemalému vědeckému úsilí a přes množství dostupné literatury zůstává mechanismus patogeneze a tím pádem také cíle pro potenciální léčbu Alzheimerovy nemoci nejasné. Cílem diplomové práce je aplikovat moderní a vysoce citlivé analytické techniky na principu tandemové hmotnostní spektrometrie ke stanovení širšího spektra proteinových markerů, které souvisejí s aktivitou imunitního systému před nástupem neurodegenerace. Specifickým cílem je vývoj moderní analytické metodiky pro rozlišení peptidů 40/42 u beta-amyloidu a její aplikace na vzorky tkání z buněčného modelového systému (cerebrální organoidy), případně vzorky z klinických studií. Získané poznatky mohou napomoci pochopení mechanismu patogeneze Alzheimerovy nemoci. Nedávny rozvoj v oblasti analytických technologií poskytuje jedinečnou příležitost přinést naléhavě potřebnou novou perspektivu v oblasti výzkumu Alzheimerovy nemoci.

Jazyk závěrečné práce:	čeština
Vedoucí práce:	PharmDr. Zdeněk Spáčil, Ph.D.
Konzultant:	PharmDr. Markéta Nezvedová
Datum zadání práce:	25. 9. 2019
V Brně dne:	29. 10. 2019

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

.....
Bc. Jaromír Stránilk
student

.....
PharmDr. Zdeněk Spáčil, Ph.D.
vedoucí práce

.....
doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc.
zástupce ředitele Ústavu biochemie pro pedagogické záležitosti

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 21. května 2021

.....
Bc. Jaromír Stráník

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat PharmDr. Zdeňku Spáčilovi, Ph.D. a PharmDr. Markétě Nezvedové za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu vypracovávání diplomové práce.

Obsah

Obsah	11
Seznam pojmů a zkratek	15
1 Úvod	17
2 Teoretická část	18
2.1 Alzheimerova nemoc.....	18
2.1.1 Teorie patogeneze.....	18
2.1.2 Studium biomarkerů souvisejících s AN.....	22
2.1.3 Modely pro studium AN.....	23
2.2 Cílená proteomika.....	25
2.2.1 Proteomický protokol.....	26
2.2.2 SRM metody pro cílenou proteomiku.....	28
2.2.3 Studované proteiny.....	29
2.3 Kapalinová chromatografie.....	31
2.3.1 Instrumentace kapalinové chromatografie.....	31
2.3.2 Ultra-účinná kapalinová chromatografie.....	32
2.3.3 Separace na reverzní fázi.....	32
2.4 Hmotnostní spektrometrie.....	33
2.4.1 Ionizace elektrosprejem.....	34
2.4.2 Hmotnostní analyzátoři na bázi kvadrupólu.....	35
3 Materiál a metody	38
3.1 Laboratorní model.....	38
3.2 Chemikálie.....	38
3.3 Příprava vzorků.....	38
3.3.1 Stanovení celkového proteinu pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou.....	38
3.3.2 IPA extrakce pro studium lipidů.....	39

3.3.3	Proteinová extrakce.....	39
3.3.4	Redukce, alkylace, štěpení	39
3.3.5	Přečištění na SPE	40
3.4	Optimalizace proteomického protokolu.....	40
3.5	LC-MS/MS analýza	42
3.5.1	Chromatografická analýza	42
3.5.2	Hmotnostní analýza.....	43
3.5.3	Příprava SRM metody	43
3.5.4	Kalibrační křivky	44
3.5.5	Postup kvantifikace a vyhodnocení dat.....	44
4	Výsledky a diskuse	46
4.1	Kalibrační závislosti, mez detekce a mez kvantifikace	46
4.2	Výsledky optimalizačních kroků.....	50
4.2.1	Test extrakčních činidel a detergentu	50
4.2.2	Výtěžnost SPE a vliv matrice.....	51
4.2.3	Optimalizace doby štěpení.....	52
4.3	Charakterizace cerebrálních organoidů	53
4.3.1	TUBB3	53
4.3.2	NEFM.....	54
4.3.3	NEFL	55
4.3.4	S100B	56
4.3.5	CD44	57
4.3.6	Shrnutí charakterizace organoidů	57
4.4	Koncentrace proteinů souvisejících s patologií Alzheimerovy nemoci	58
4.4.1	APOE.....	58
4.4.2	TTR.....	59
4.4.3	APP	60
4.4.4	Patologie AN u zkoumaných cerebrálních organoidů.....	60

5 Závěr	61
Použité zdroje	62
Seznam obrázků	67
Seznam tabulek	69

Seznam pojmů a zkratk

AF	– amyloidové fibrily
AN	– Alzheimerova nemoc
APOE	– Apolipoprotein E
APP	– amyloidový prekurzorový protein
A β	– amyloid beta
CID	– kolizně indukovaná disociace
CO	– cerebrální organoidy
CSF	– cerebrospinal fluid, Mozkomíšní mok
DTT	– 1,4 dithiothreitol
ESI	– ionizace pomocí elektrospreje
GAPDH	– glyceraldehyd-3- fosfát dehydrogenáza
HEB	– hematoencefalická bariéra
HPLC	– vysoce účinná kapalinová chromatografie
IAA	– jodacetamid
IDE	– inzulin degradující enzym
IPA	– isopropanol
iPSC	– induced pluripotent stem cells, indukované pluri- potentní kmenové buňky
LOD	– mez detekce
LOQ	– mez kvantifikace
MALDI	– ionizační technika pomocí laserového pulsu za asistence matrice
MCI	– mild cognitive impairment, mírná kognitivní poru- cha
MF	– mobilní fáze
MS	– hmotnostní spektrometrie

SEZNAM POJMŮ A ZKRATEK

NEFL	– lehké řetězce neurofilament
NEFM	– střední řetězce neurofilament
NEP	– neprilysinu
NFT	– neurofibrillary tangles, neurofibrilární klubíčka
PSEN 1	– presenilin 1
PSEN2	– presenilin 2
p-tau	– hyperfosforylovaný protein tau
Q	– kvadrupólový hmotnostní analyzátor
QqQ	– Trojitý kvadrupól
RP-LC	– Kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SDC	– deoxycholát sodný
SF	– stacionární fáze
SRM	– selected reaction monitoring, sledování vybraných reakcí
TTR	– transthyretin
UHPLC	– ultra účinná kapalinová chromatografie

1 Úvod

Alzheimerovou nemocí trpí celosvětově více než 50 milionů lidí. Pře-
vážně postihuje starší populaci (věk 65+), ale jsou známy i případy one-
mocnění v dřívějším věku. Přesnou příčinu onemocnění známe jenom
u 5 % případů (familiární Alzheimerova nemoc), kdy je výskyt spojen
s genetickými mutacemi v proteinech spojených s metabolismem amy-
loidového prekurzorového proteinu (APP). U zbylých 95 % (sporadická
forma Alzheimerovy nemoci) příčina vzniku není zcela objasněna. Další
alarmující skutečností je nízká úspěšnost nově zaváděných léků v klinic-
kých studiích, která se pohybuje okolo 0,5 %. To jen zdůrazňuje důleži-
tost výzkumu, vedoucího k hlubšímu pochopení molekulární podstaty
nemoci a hledání nových terapeutických a diagnostických možností.
K tomu by mohly pomoci nové laboratorní modely pro preklinické studie
a nový pohled na biomarkery Alzheimerovy nemoci.

Cílem této práce je pomocí moderních analytických metod kapali-
nové chromatografie a hmotnostní spektrometrie kvantitativně stanovit
některé proteinové markery Alzheimerovy nemoci spolu s markery bu-
něčných populací, které slouží k charakterizaci cerebrálních organoidů.
Konkrétně se jedná o aplikaci hmotnostně spektrometrické techniky
SRM (monitorování vybraných reakcí/selected monitoring reaction) na
vzorky cerebrálních organoidů odvozených z kožních buněk jedince s di-
agnostikovanou Alzheimerovou nemocí (AN cerebrální organoidy),
a zdravého jedince (kontrolní, CTR organoidy), kultivovaných po 48, 76,
95, 110, 135 a 160 dní. Výstupem práce je informace o zastoupení vybra-
ných proteinů v cerebrálních organoidech v jednotlivých časových bo-
dech a porovnání hladin jednotlivých proteinů mezi AN a CTR organoidy.

2 Teoretická část

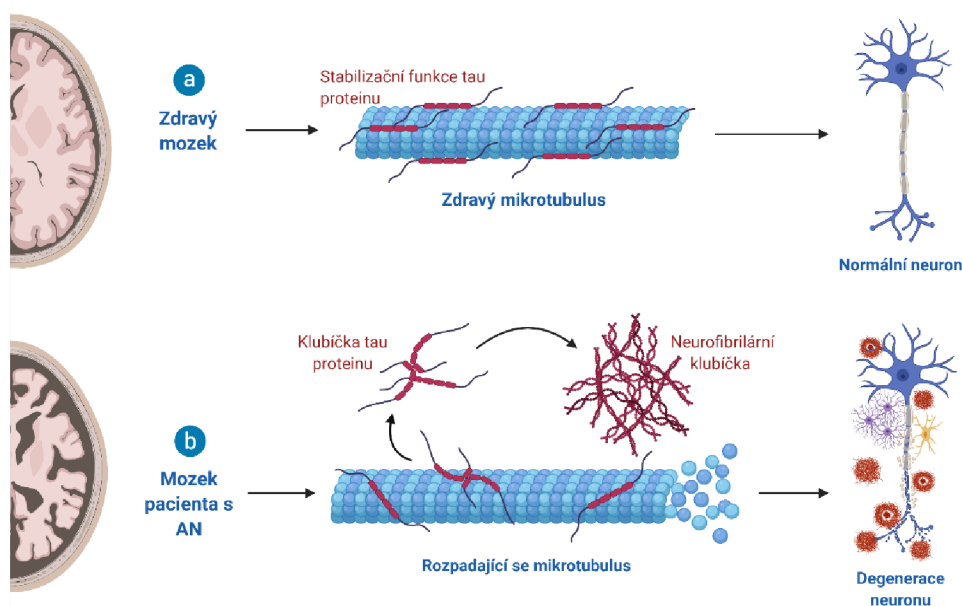
2.1 Alzheimerova nemoc

Alzheimerova nemoc (AN) byla poprvé popsána v roce 1907 německým lékařem Aloisem Alzheimerem. Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění, charakterizované zhoršením kognitivních funkcí a změnou chování. [1] Symptomy jsou způsobeny nevratným poškozením neuronů v různých oblastech mozku, které již nejsou schopny vykonávat svoji běžnou funkci. Neurodegenerace může dosáhnout až takové míry, že pacientovi zamezí vykonávat základní tělesné funkce, jako je chůze nebo polykání. Pacienti jsou v závěrečných stádiích nemoci upoutáni na lůžku, odkázáni na nepřetržitou péči. AN je momentálně nevyléčitelné progresivní onemocnění, které vede až k úmrtí. [2]

Pacientů, postižených demencí, je celosvětově asi 50 milionů a každý rok přibývá více než 10 milionů nových, přičemž 60-70 % případů demence připadá právě na AN. [3] Za posledních 15 let se počet pacientů s demencí více než zdvojnásobil. [4]. Procento lidí s AN se odhaduje na 5-8 % ve věkové skupině 60+ a roste s věkem zkoumané skupiny. Extrémní nárůst počtu pacientů s demencí bude mít výrazné socioekonomické dopady na naši společnost, které by mohla zmírnit včasná diagnostika pacientů a vývoj účinného léku. [2]

2.1.1 Teorie patogeneze

Za hlavní patologické změny v mozku pacientů s AN jsou považovány extracelulárně uložené senilní plaky bohaté na amyloid beta peptidy ($A\beta$) a neurofibrilární klubíčka (neurofibrillary tangles, NFT) uvnitř neuronů, obsahující velké množství hyperfosforylovaného proteinu tau (p-tau). [2] Kromě senilních plaků a NFT byly v mozcích pacientů s AN pozorovány dystrofické axony a dendrity, obklopené aktivovanými gliovými buňkami, které přímo souvisí s úbytkem neuronů a následovanou kognitivní poruchou. [5](Obrázek 1)



Obrázek 1. Přehled základních patologických jevů AN. Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

Hyperfosforylovaný protein tau ztrácí schopnost stabilizovat mikrotubuly, což může vést k destabilizaci axonu, v extracelulárním prostoru se hromadí amyloidové plaky (na obrázku oranžové) a gliové buňky

Rozlišujeme dvě základní formy AN. Familiární forma AN s časným nástupem, která představuje 5 % případů. Sporadická forma AN s pozdějším nástupem, která představuje až 95 % případů. [4] U pacientů s familiární formou AN lze prokázat mutaci alespoň v jednom z genů pro amyloidový prekurzorový protein (APP), proteázu presenilin 1 (PSEN1) nebo presenilin 2 (PSEN2). Pokud je mutace v genu pro PSEN1, pak je u pacienta jistota nástupu AN. Mutace v genu pro PSEN2 představuje asi 95 % pravděpodobnost nástupu AN. U většiny pacientů se projeví symptomy AN již před 65. rokem života [2]

Přes intenzivní a nákladný výzkum není příčina rozvoje sporadické AN známá. Kromě klasické hypotézy amyloidové kaskády se v literatuře můžeme setkat s dalšími hypotézami etiologie a patogeneze AN (např. cholinergní hypotéza, tau hypotéza a hypotéza tvorby zánětu)[6]

Podle hypotézy amyloidové kaskády je neurodegenerace způsobena abnormální akumulací proteinových A β plaků v různých oblastech mozku vedoucí k dysfunkci a buněčné smrti neuronů. [7]

Amyloidové plaky jsou složeny z různě dlouhých peptidů (A β peptidy) vzniklých enzymatickým štěpením APP. Délka A β peptidů se mění na C konci podle štěpných míst na APP. Nejvíce abundantní složkou těchto plaků jsou peptidy A β 40 a A β 42.[7] Přestože se sekvenčně A β 40

a A β 42 liší pouze o isoleucin a alanin na C-konci, má tento rozdíl značný vliv na jejich fyzikální a chemické vlastnosti. U peptidu A β 42 byla prokázána vyšší schopnost agregace a vyšší toxicita ve srovnání s A β 40.[8]

A β peptidy se mohou vyskytovat v různých formách, v závislosti na okolních podmínkách jako monomery, oligomery, protofibrily a amyloidové fibrily (AF). Oligomerní struktury A β jsou pravděpodobně klíčem k pochopení jeho biologické role v AN. AF jsou značně objemné a nerozpustné. Rychlost růstu AF je závislá na koncentraci A β monomerů. [9] Pro strukturu AF je typická paralelní a antiparalelní β -křížová (cross β) struktura .[10]

Řada aktuálních studií se zabývá rozpustnými oligomery A β (10 - 100 kDa)s prokázanou neurotoxicitou, která pravděpodobně souvisí s neurodegenerací při řadě onemocnění (AN, Parkinsonova nemoc a další).[11]

Peptidy A β 40 a A β 42 jsou produktem štěpení APP, který se skládá ze tří domén, velké extracelulární, membránové a malé cytoplazmatické domény. [12] Funkce APP není zcela jasná. Aktuální studie naznačují, že APP hraje roli při buněčné adhezi a při rozvoji synapsí. [12] Studie naznačují, že APP hraje regulační roli při transportu proteinů a interakci s cytoskeletem buňky. [13]

Existují 3 izoformy APP, APP695 je exprimována primárně v neuronech, APP751 a APP770, obsahují inhibiční doménu serinové proteázy Kunitzova typu, převážně exprimované na površích periferních buněk. [10]

K biosyntéze APP dochází v endoplazmatickém retikulu, ze kterého je transportován do Golgiho aparátu, odkud může být dále přenesen pomocí vezikul k cytoplazmatické membráně. [10]

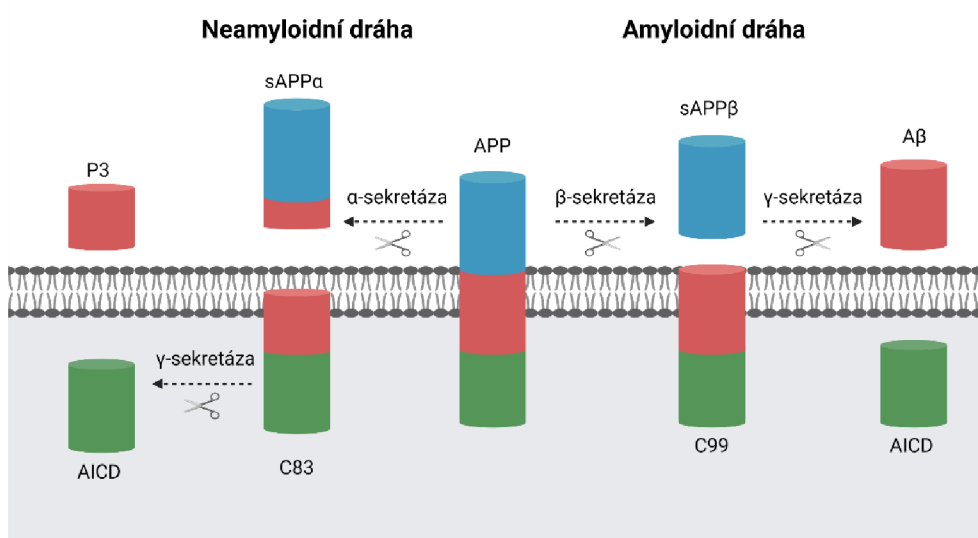
APP může být katabolizováno pomocí odlišných enzymatických drah, tzv. amyloidní a neamyloidní cestou. Při neamyloidní cestě je APP nejdříve štěpen mezi Lys16 a Leu17 pomocí α -sekretázy za vzniku velké rozpustné ektodomény sAPP α a 83 aminokyselin dlouhé C-koncové domény C83, ukotvené v membráně. Poté dochází ke štěpení C83 γ -sekretázou za vzniku peptidu P3 a APP intracelulárního fragmentu (APP intracellular domain, AICD). [13][10]

Při amyloidní cestě je APP štěpen nejdříve pomocí β -sekretázy za vzniku sAPP β a 99 aminokyselin dlouhé membránové domény C99, dále štěpené γ -sekretázou, která není zcela selektivní a vede ke vzniku 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49 nebo 51 aminokyselin dlouhých fragmentů. Nejčastější jsou fragmenty A β 40 a A β 42, které pravděpodobně hrají

důležitou roli při patogenezi AN. [10][9] brázek 2) Při štěpení C99 pomocí kaspáz může vzniknout neurotoxický protein C31.[10]

Peptidy A β 40 a A β 42 mohou být dále degradovány pomocí neprilysinu (NEP) a insulin degradujícího enzymu (IDE). NEP je membránově vázaná metaloproteáza, schopná štěpit řadu extracelulárních proteinů. Metaloproteáza IDE štěpí jak extracelulární, tak intracelulární proteiny. Zajímavostí je, že IDE má asi 20x větší afinitu k insulinu než k A β peptidům, ale insulin štěpí daleko menší rychlostí. Insulin může fungovat jako inhibitor IDE štěpení A β peptidů. Některé studie uvádí, že k degradaci A β peptidů může docházet pomocí lysozomální degradace enzymy např. katepsin B. [9]

Část A β peptidů prochází přes hematoencefalickou bariéru (HEB) do oběhového systému. Přenos rozpustných forem A β z mozku přes HEB může být uskutečněn pomocí proteinu příbuzného LDL-receptoru (Low density lipoprotein receptor-related protein 1) Bylo zjištěno, že obrácený přenos zajišťuje RAGE receptor. Fyziologická funkce zpětného přenosu je neznámá. [9]



Obrázek 2. Schéma odbourávání APP Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

Schéma popisuje amyloidní a neamyloidní cestu štěpení APP. Při amyloidní cestě je APP štěpen β -sekretázou a následně γ -sekretázou. Finálními produkty této kaskády jsou APP intracelulární fragment a A β peptidy, které hrají zásadní roli v patologii AN.

2.1.2 Studium biomarkerů souvisejících s AN

Biomarker je definován jako objektivně měřitelný a hodnotitelný indikátor fyziologických procesů, patogenních procesů nebo reakcí na expozici nebo zásah. [14]

Patofyziologické procesy AN, např. úbytek neuronů, axonů a synapsí, začínají desítky let před manifestací kognitivních symptomů. Prvním symptomem často bývá porucha epizodické paměti. [15] Biologické markery, které včas a spolehlivě odhalí vznik AN a zároveň ji odliší od ostatních typů demenci, by výrazně usnadnily diagnostiku a monitorování léčby. [16]

Biomarker AN by měl splňovat následující kritéria [16]:

- indikovat presymptomatické patofyziologické procesy AN
- představovat vhodný cíl farmakoterapie specifický pro AN (odlišení ostatních neurodegenerativních onemocnění)
- měřitelný prostřednictvím jednoduchého a neinvazivního odběru vzorku a vysoce citlivého, rychlého, ekonomického a reprodukovatelného testu

Mozkomíšňní mok (Cerebrospinal fluid, CSF) je v přímém kontaktu s extracelulárním prostorem mozku, proto obvykle odráží patologické změny v mozku a je optimálním zdrojem biomarkerů AN. Mezi dosud využívané klinické biomarkery v CSF patří celkový tau protein, fosforylovaný tau protein (izoformy p-tau181 and p-tau231) a A β 42. [15]

Fyziologickou funkcí proteinu tau v neuronech je stabilizace mikrotubulů v axonech. [17] Celkový protein tau bývá zvýšen dvakrát až třikrát u pacientů s AN v porovnání s kontrolními skupinami zdravých jedinců. [18] Přesný mechanismus zvýšení hladin proteinu tau v CSF není známý. Možnou příčinou vyšších hladin při neurodegenerativních procesech může být vylučování tau proteinu do extracelulárního prostoru a následný transport do CSF. Problémem celkového tau proteinu jakožto markeru pro AD je jeho nízká specifita, neboť je zvýšen také při fronto-temporální demenci, Creutzfeldt-Jakobově nemoci a akutním poranění mozku. [18] Hladina tau proteinu může být prognostickým markerem pro přechod z mírné kognitivní poruchy (mild cognitive impairment, MCI) na AN, protože vysoká hladina tau CSF byla zjištěna v 90 % případů MCI, u kterých později došlo k rozvoji AN. [16]

A β 42 se jeví jako vhodný biomarker, protože se přímo účastní patologických procesů v mozku (formace plaků). Mnohé studie dokládají, že koncentrace A β 42 v CSF se při AN snižuje, stejně jako u jiných typů onemocnění, např. demence s Lewyho tělísky, amyotrofické laterální

sklerózy nebo Creutzfeld-Jakobovy nemoci.[19] Příčina úbytku A β 42 v CSF není zcela jasná, může být důsledkem omezení přenosu A β 42 z mozku do CSF vlivem akumulace A β 42 v proteinových placích. [16]

A β 42 lze stanovit v krevní plazmě, kde je koncentrace asi 100x nižší než v CSF. [17] Zvýšené hladiny A β 42 v plazmě pozorujeme u pacientů s brzkým nástupem AN. U pacientů se sporadickou AN nejsou výsledky jednoznačné a dochází k významnému překryvu hladin u pacientů s kontrolní skupinou. [18] Podle některých studií vyšší hladiny A β 42 v séru mají pacienti již několik let před propuknutím symptomů. Sérový A β 42 není vhodným markerem pro AN kvůli jeho nízké specifitě a citlivosti stanovení, ale mohl by být užitečným prognostickým markerem rizika AN. [18]

P-tau je dalším perspektivním markerem AN. Řada studií uvádí, že koncentrace p-tau v CSF je vyšší u AN pacientů než u kontrolních skupin. Studie byly provedeny s využitím protilátek specifických pro fosforylované epitopy tau proteinu. Ke zvýšení hladiny dochází již u MCI a v raných stádiích AN. Na rozdíl od celkového proteinu tau je p-tau poměrně specifický. Zvýšené hladiny p-tau odliší AN od frontotemporální demence, demence s Lewyho tělísky, Parkinsonovy nemoci, schizofrenie a jiných, ale mohou být zjištěny u pacientů s Creutzfeldt-Jakobovou nemocí. Kombinované měření celkového tau, p-tau a A β 42 dokáže, odlišit pacienty s AN od zdravých jedinců i dalších onemocnění. [19]

Dalšími studovanými markery jsou proteiny spojené s neurodegenerací (lehké řetězce neurofilament), neurozánětem, lipidovým metabolismem (apolipoprotein e) a odbouráváním neurotoxických proteinů (Transthyretin). Řada těchto proteinů bývá spojována s novými pohledy na příčiny AN. [5]

2.1.3 Modely pro studium AN

Experimentální modely jsou nezbytné pro studium patogeneze AN a preklinické testování nových léků. Nejčastěji používané modely pro studium AN jsou zvířecí modely, 2-D buněčné kultury a nově také 3-D buněčné kultury (cerebrální organoidy). Každý z těchto modelů má své výhody a omezení. [20]

Nejčastěji používaným zvířecím modelem jsou hlodavci (myši a potkani). Přestože APP myši vykazuje z 97 % homologní sekvenci s lidským APP, odchylky mění agregační vlastnosti peptidů A β a tím i mechanismus tvorby proteinových plaků typických pro patologii AN. Proto je

nutné pro studium amyloidových plaků využít transgenních organismů k expresi lidského APP a proteinů spojených s patologií AN. Podobný problém nastává u proteinu tau, který se shoduje s lidským tau protei- nem ještě méně než APP (sekvence 88 %). Navíc se podařilo zjistit, že exprese myšního tau proteinu inhibuje tvorbu NFT lidského tau proteinu. Tvorbu NFT se podařilo navodit pouze využitím mutovaných forem pro- teinu tau, což může ovlivňovat jejich toxicitu a interakce [21].

Řada myších transgenních modelů je schopná exprese jednoho nebo obou patologických znaků AN. Využití těchto modelů při vývoji terapeutik má při následných klinických testech velice malou úspěšnost (0,4 %) a vyvstávají otázky o jejich validitě a funkčnosti. Tento jev by se dal částečně vysvětlit tím, že zvířecí modely pouze vytvářejí specifické patologické jevy, často nefyziologickým způsobem. U některých modelů nedochází ke ztrátě neuronů a rozvoji dalších patologických rysů AN. [21]

Dalším zvířecím modelem pro studium AN mohou být primáti. Výhodou jsou jejich poměrně velké mozky vhodné pro zobrazovací techniky a možnost odběru CSF. U velkých lidoopů (šimpanzové, gorily, orangutani) je sekvence APP shodná ze 100 % s lidskou, v případě tau je shodnost 99,5 % u goril a 100 % u šimpanzů. U těchto primátů byla pozorována fyziologická tvorba amyloidových plaků, které jsou více difuzní a méně časté než plaky v případě lidské AN. Tvorba NFT byla pozorována pouze v jedné studii u šimpanzů. Mezi další využívané primáty patří např. Makak rhesus nebo Kotul (Squirrel monkey), u kterých je 100% homologie APP i tau sekvence s lidskými. Hlavní nevýhodou výše zmíně- ných modelů je jejich dlouhý životní cyklus, etické otázky a cena.

Dalším modelem pro studium AN jsou buněčné kultury. 2-D bu- něčné kultury odvozené z lidských buněk překonávají nedostatky zvíře- cích modelů způsobené genetickými rozdíly. 2-D buněčné kultury mohou být generovány s využitím indukovaných pluripotentních kmenových buněk (induced pluripotent stem cells, iPSC). iPSC mohou být odvozeny z mnoha typů lidských buněk včetně fibroblastů, krevních buněk a dal- ších. Kultivované iPSC od pacientů s AN diferencující v nervovou tkáň a jsou schopné simulovat patologické znaky typické pro AN (zvýšená produkce A β 42 a hyperfosforylovaného proteinu tau v porovnání s kon- trolní skupinou). iPSC buněčné kultury mají řadu omezení. Například existuje riziko, že epigenetické modifikace (methylace DNA) dárcov- ských buněk mohou být částečně zachovány i po konverzi do iPSC. [22] Další limitací je to, že k nástupu AN patologie musejí být nervové buňky kultivovány poměrně dlouhou dobu, což je technicky náročné. Buněčné

modely AN nejsou schopny reprezentovat komplexní prostředí mozku, které zahrnuje interakce mezi jednotlivými neurony nebo přítomnost dalších buněčných populací.[21]

Některé z limitací 2-D buněčných kultur se daří překonávat za použití 3-D buněčných modelů tzv. organoidů. Organoidy jsou definovány jako samoorganizované trojrozměrné struktury, které sdílejí řadu vlastností s komplexními orgány. Cerebrální organoidy (CO) mohou rekapitulovat vývoj mozku ve zkumavce a vytvořit komplexní organizované struktury morfologicky podobných různým částem mozku. V posledních letech byly CO využívány pro studium řady nemocí, jako např. mikrocefalie, autismus nebo infekce Zika virem a v poslední době také ke studiu AN. [20] CO jako modely AN jsou generovány pomocí sofistikovaných metod zahrnujících převedení dárcovských buněk od pacientů s AN na iPSC, následnou kultivaci a charakterizaci CO. [23] U CO byla pozorována tau i A β patologie, společně s neurodegenerací. Limitací CO, jakožto modelu pro AN, může být omezené množství mikroglíí a oligodendrocytů a absence cévního systému. Nedostatek mikroglíí lze vyřešit přidáním externě odvozených mikroglíí do struktury CO, kde gliové buňky plní svoji funkci a reagují na lokální poranění neuronů. Dalším úskalím je, že derivované buňky CO vykazují transkriptomický profil podobný prenatalnímu mozku. Nedostatek vaskularizace v CO brání přirozenému vývoji nervových buněk, což má nepříznivé účinky na tvorbu aktivních synapsí a zhoršuje jejich životaschopnost během delší kultivace. Potenciálním řešením mohou být heterotypické kultury s endotelovými a mezenchymálními kmenovými buňkami nebo chimérické systémy využívající vaskularizačního systému myších mozků. [20]

Často uváděnou nevýhodou CO je vysoká variabilita v buněčném uspořádání a složení mezi jednotlivými organoidy, vznikající během jejich kultivace.[24] V budoucnu by CO mohly sloužit jako kvalitní model pro studium základních mechanismů AN a k prověřování mechanismů nových potenciálních léčiv.

2.2 Cílená proteomika

Proteomika je vědní disciplína zabývající se studiem proteinů a jejich vlastností. Proteomiku můžeme rozdělit na cílenou a necílenou. Necílená proteomika se ve vzorku snaží identifikovat nebo kvantifikovat (často

jen relativně) co největší počet proteinů. To umožňuje poskytovat komplexní pohled na studovaný systém.

Cílená proteomika si klade za cíl sledovat vybrané proteiny s vysokou citlivostí, reprodukovatelností, přesností a správností kvantifikace. [25] Nižší počet analyzovaných proteinů v cílené proteomice umožňuje stanovení málo zastoupených proteinů, např. signální molekuly nebo biomarkery nemocí. [26][27]

Mezi nejrozšířenější přístupy pro kvantifikaci proteinů patří metody na bázi hmotnostní spektrometrie (MS). Ve srovnání s klasickými imunochemickými metodami poskytují mnohem přesnější a selektivnější stanovení desítek zkoumaných proteinů během jediné analýzy.

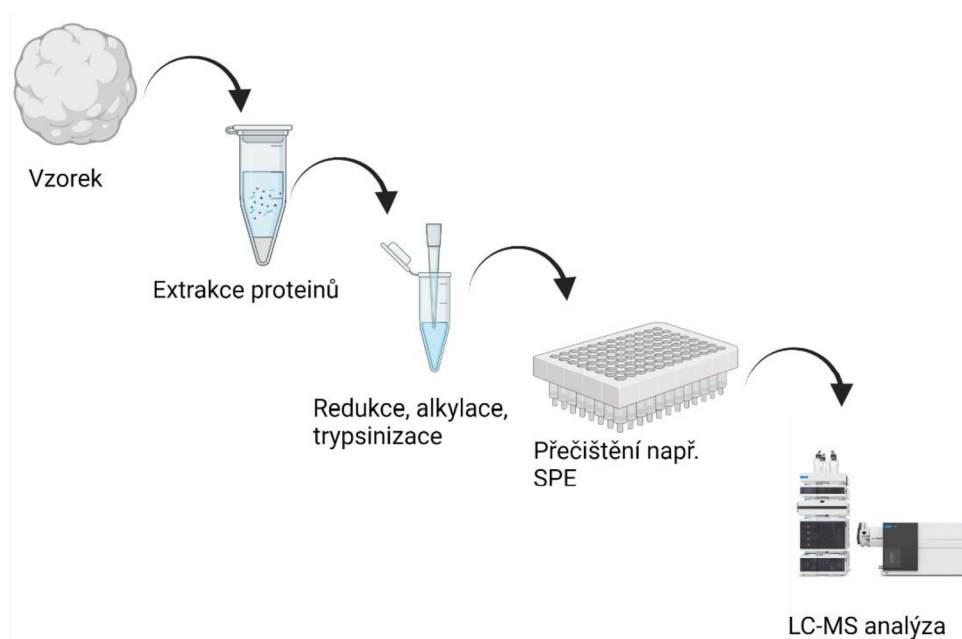
2.2.1 Proteomický protokol

Příprava vzorku v proteomické analýze výrazně ovlivňuje výsledek experimentu. Optimalizace probíhá na základě typu použitého vzorku (matrice), vlastností samotných proteinů a zvolené analytické metody.

Při přípravě vzorku pro hmotnostní analýzu je prvním krokem extrakce proteinů z matrice s využitím extrakčních činidel (močovina, hydrogenuhličitan amonný, guanidiniumchlorid), a fyzikálních (ultrazvuk, homogenizace) a chemických technik (použití detergentů, úprava pH), které mají za cíl narušení buněčných struktur a solubilizaci proteinů. [28] Pro MS analýzu lze využít buď postup tzv. zdola nahoru (bottom-up) anebo shora dolů (top-down). U přístupu top-down jsou po extrakci intaktní proteiny fragmentovány až při MS analýze. Tento způsob analýzy nejčastěji využívá MS analyzátor s vysokým rozlišením (FT-ICR, Orbitrap, Q-ToF [29]

Přístup bottom-up je nejčastější metodou analýzy komplexních biologických vzorků. Při tomto postupu se vzorky podrobí proteolytickému štěpení specifickou proteázou za vzniku různě dlouhých peptidů, které se stávají zprostředkovatelem kvalitativní a kvantitativní informace. [30] Nejčastěji používanou proteázou je trypsin, který specificky štěpí protein od C konce za bazickými aminokyselinami (arginin, lysin), pokud nenásleduje prolin. Vzniklé peptidy vždy obsahují bazickou aminokyselinu, která při ionizaci vede ke snadnému vzniku iontů s kladným nábojem, což umožňuje MS analýzu s vysokou citlivostí. [31] Proteolýze často předchází redukce a alkylace, které mají za cíl narušit komplexní strukturu proteinu (denaturace) a tím zpřístupnit štěpná místa pro proteázu. [32] Výhodou bottom-up přístupu jsou nižší nároky na přístrojové

vybavení a vyšší citlivost v porovnání s top-down přístupem. [29] Při analýze komplexních proteomických vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie se uplatňují separační techniky (UHPLC, SPE, SEC, afinitní chromatografie) pro postupné dávkování peptidů do iontového zdroje z důvodu optimální ionizační účinnosti a citlivosti analýzy. [29]



Obrázek 3. Schéma bottom-up protokolu. Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

V proteomické analýze není často důležité pouze to, zda se dané proteiny ve vzorku nacházejí, ale především v jakém množství. Hlavní úskalí MS kvantifikace je proměnlivá účinnost ionizace jednotlivých složek, kterou lze normalizovat s využitím standardů značených stabilními izotopy (^{13}C , ^{15}N , ^2H). V proteomice lze využít především kvantifikace přidáním stabilních izotopicky značených peptidů nebo bez značení (label-free).

Metody kvantifikace pomocí stabilních izotopů můžeme rozdělit do několika kategorií:

1. Syntetické izotopicky značené peptidy nebo rekombinantní proteiny
2. Enzymatické zavedení značky v průběhu proteolytického štěpení
3. Chemické připojení izotopické značky na peptidy/proteiny
4. Metabolické vnesení stabilních izotopů do proteinů v buňce [33]

Absolutní kvantifikace pomocí interního standardu můžeme dosáhnout pouze přidáním definovaného množství syntetických izotopicky značených analogů peptidů/proteinů před proteolytickým štěpením. Následným vyhodnocením MS signálu izotopicky značeného a nativního peptidu zjistíme koncentraci nativního peptidu ve vzorku. Přístup je využíván především u klinických aplikací. [34]

2.2.2 SRM metody pro cílenou proteomiku

Monitorování vybraných reakcí (Selected reaction monitoring, SRM) je základní metodou tandemové hmotnostní spektrometrie používanou v cílených proteomických experimentech pro kvantifikaci proteinů (princip metody je uvedený v kapitole 2.4.2). Zkoumané proteiny jsou zpracovány na základě bottom-up proteomického protokolu.

Prvním krokem při vytváření SRM metody je výběr 2-5 vhodných proteotypických peptidů pro každý protein. Peptidy by měly být vybrány na základě sekvenční specifiity, použité proteázy, fyzikálních a chemických vlastností, analytické specifiity a parametrů kvantifikace. S výběrem mohou pomoci databáze (SRMATlas, www.srmatlas.org; neXtProt, www.nextprot.org) a specializované programy (Skyline, University of Washington). [30] Informace z databází nebo predikční algoritmy lze s výhodou využít i při výběru SRM přechodů pro proteotypický peptid. Přechod je dvojice prekurzorového a produktového iontu peptidu při MS/MS analýze. Pravděpodobnost, že dva peptidové fragmenty budou mít stejnou hmotnost, budou odvozeny od dvou různých izobarických peptidů a budou mít shodný retenční čas, je velmi nízká. [35]

Jednou z možností pro optimalizaci akviziční metody je využití syntetických izotopicky značených analogů stanovovaných peptidů. Syntetické peptidy se využijí k ověření funkčnosti vybraných SRM přechodů na daném zařízení a také pro další optimalizaci parametrů měření jako např. kolizní energie, čas sběru dat pro jednotlivé přechody (dwell time) a další. Pro tento proces lze s výhodou využít programů jako např. Skyline.

Posledním krokem při přípravě SRM metody je určení kvantitativních parametrů metody jako např. určení kalibračních křivek, citlivosti a meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). LOD a LOQ mohou být stanoveny na základě těchto vztahů:

$$LOD = \frac{3\sigma}{m} \quad 1$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad 2$$

kde σ je směrodatná odchylka plochy nejnižšího bodu kalibrační křivky nad mezí kvantifikace a m je směrnice kalibrační závislosti. [30]

2.2.3 Studované proteiny

V rámci diplomové práce jsem se zabýval proteiny, které jsou zapojené do patogeneze AN(APOE), jako kandidátní markery AN (TTR), a proteiny potřebnými k charakterizaci organoidů (GAPDH, S100B, CD44, TUBB3, NEFL, NEFM).

Glyceraldehyd-3- fosfát dehydrogenáza (GAPDH) je enzym glykolýzy, kde katalyzuje přeměnu glyceraldehyd-3- fosfát na 1,3- bisfosfoglycerát. Jedná se o velmi často používaný protein pro normalizaci (house-keeping) získaných dat. [36]

Protein S100B je Ca^{+2} vázající regulační protein složený ze dvou totožných podjednotek. V nervové soustavě je exprimován v gliových buňkách a v některých subpopulacích neuronů. Zvýšené hladiny S100B v tkáni i CSF byly pozorovány v případě patologických stavů, např. akutní poranění mozku, neurodegenerativní onemocnění (AN, Parkinsonova nemoc, amyotrofni laterální skleróza) nebo psychiatrických onemocnění (schizofrenie). Přes poměrně nízkou specifitu, jako markeru AN, je S100B považován za dobrý marker aktivního nervového úbytku, k monitorování progresu onemocnění. [37]

CD44 je hyaluronanový receptor, zapojený do buněčné adheze a komunikace. Při analýze vyvíjejícího se mozku byl CD44 identifikován jako marker pro prekurzorové buňky omezené na astrocyty (astrocyte-restricted precursor cells), z kterých se později stávají zralé astrocyty. CD44 je exprimováno nejen v astrocytech, ale také v nervových kmenových buňkách a časných stádiích prekurzorových buněk oligodendrocytů. Dále bylo zjištěno, že hladiny CD44 jsou zvýšeny v astrocytech AN

pacientů. [38] Zvýšení hladiny CD44 v mozku je spojováno s fyziologickým stárnutím. [38]

TUBB3 je jedním z mnoha typů β -tubulinů. β -tubuliny jsou společně s α -tubuliny součástí mikrotubulů, jakožto součástí cytoskeletu buněk. Exprese TUBB3 se obvykle omezuje na buňky reprodukčního systému a tkáně odvozené z neurální linie. TUBB3 je často využíván jako obecný marker neuronů.

Lehké řetězce neurofilament (NEFL) a střední řetězce neurofilament (NEFM) patří mezi intermediární filamenta. Neurofilamenta hrají kritickou roli při radiálním růstu a stabilitě axonů. [39] Hladina NFL bývá zvýšena jak v mozkové tkáni, tak i v CSF u patologických stavů, např. AN, frontotemporální demence nebo vaskulární demence, a to již několik let před propuknutím příznaků. [40]

Transthyretin (TTR) je protein syntetizovaný buňkami choroidního plexu mozkové tkáně. Jeho hlavní funkcí je transport retinolu a hormonu thyroxinu (T4) v séru a CSF. Bylo zjištěno jeho zapojení v řadě procesů v nervovém systému např. udržování normálních kognitivních funkcí během stárnutí nebo regulace metabolismu neuropeptidů. TTR je spojován s řadou neurodegenerativních onemocnění. Například familiární amyloidové polyneuropatie, kde se TTR ukládá ve formě plaků v různých tkáních. TTR je spojováno i s řadou dalších neurodegenerativních onemocnění jako např. Parkinsonova nemoc, syndrom Guillain–Barre, frontotemporální demence nebo AN. V souvislosti s AN bylo zjištěno, že TTR interaguje s $A\beta$ a tím inhibuje tvorbu $A\beta$ fibril. TTR štěpí $A\beta$ na několik peptidů, které vykazují menší schopnost agregace než $A\beta$. V CSF pacientů s AN byla naměřena nižší koncentrace TTR než u kontrol, např. u frontotemporální demence jsou hladiny TTR naopak zvýšeny. [41].

Apolipoprotein E (APOE) je protein asociovaný s lipidovým metabolismem, jehož hlavní funkcí je transport lipidů mezi orgány, plazmou a intersticiální tekutinou. APOE je v mozku produkováno astrocyty a do určité míry mikroglie. Neurony jsou schopné exprimovat APOE jako odpověď na excitotoxické poranění. [42] ϵ 4 alela genu pro APOE představuje nejvýznamnější rizikový faktor nástupu AN. Molekulární mechanismus vlivu APOE4 zůstává neznámý, protože APOE moduluje jak odbourávání, tak i agregaci $A\beta$. [43]

2.3 Kapalinová chromatografie

Termín chromatografie zahrnuje širokou škálu preparativních a analytických technik, při kterých se analyty rozdělují mezi stacionární fázi (SF) a mobilní fázi (MF). Rozdílné interakce analytů s těmito dvěma fázemi jsou podstatou chromatografické separace složitých směsí. V případě kapalinové chromatografie (LC) je MF kapalina a SF obvykle pevná látka.

Nejvíce používanou chromatografickou technikou pro studium makromolekul je vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) a ultra-účinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která je typem kolonové chromatografie. Po nástřiku vzorku na kolonu analyty migrují různou rychlostí ve směru toku MF, v závislosti na rozdílné míře interakce se SF. Kolonou první procházejí analyty bez afinity k SF. Čím větší míra interakce se SF, tím pomalejší pohyb kolonou. Míra zadržení závisí na vlastnostech analytu a zároveň charakteru MF a SF určujícím povahu interakce. [44] Výsledkem separace je tzv. chromatogram, závislost signálu detektoru na čase. Bez přítomnosti detekovatelných molekul se signál ustálí na tzv. základní linii. Při průchodu jednotlivých chromatografických zón detektorem dochází k zaznamenání signálu v podobě tzv. píku (Gaussovska funkce/profil). Čas, kdy je daný pík zaznamenán, označujeme jako retenční čas.[45]

2.3.1 Instrumentace kapalinové chromatografie

Instrumentace kapalinové chromatografie prošla od doby svého vzniku masivním vývojem. Od původních skleněných válců, plněných vápencem s gravitací řízenou elucí za atmosférického tlaku, až po dnešním moderní chromatografické systémy dosahující vysoké přesnosti a opakovatelnosti za pracovního tlaku až 1200 bar.

Pumpy musí zajistit stabilní průtok mobilní fáze a odolávat vysokým zpětným tlakům. Využívají se automatické dávkovače, na principu šesti-cestného ventilu a dávkovací smyčky. [45]

Důležitou součástí systému je chromatografická kolona naplněná sférickými částicemi, nesoucími stacionární fázi. Při výběru kolony pro danou aplikaci je nutné vzít v úvahu fyzikálně-chemický charakter kolony a analyzované látky. [36] Analytickou kolonu často chrání tzv. předkolona naplněná identickou stacionární fází, která zachycuje složky vzorku, které by jinak ucpávaly nebo degradovaly analytickou kolonu. Použitím předkolony lze značně prodloužit životnost analytické kolony.

2.3.2 Ultra-účinná kapalinová chromatografie

První komerčně dostupný systém ultra-účinné kapalinové chromatografie byl na trh uveden v roce 2004. [46] UHPLC využívá kratší kolony s menším vnitřním průměrem, plněné částicemi o velikosti $d_p < 2 \mu\text{m}$. Snížením průměru částic roste pracovní tlak ($< 1000 \text{ bar}$) separace. To s sebou nese zvýšené nároky na materiál a technické provedení všech součástí chromatografického systému [46]

UHPLC separace probíhá rychleji, za nižší spotřeby rozpouštědla a vyšší separační účinnosti, ve srovnání s konvenčním HPLC. Při průchodu analytu UHPLC kolonou vzniká třením velké množství tepla, které může ovlivnit kvalitu separace (je nutné udržovat stálou teplotu). [47] Převod metod vyvinutých pro konvenční HPLC na metody kompatibilní s UHPLC systémy je snadný. [45]

2.3.3 Separace na reverzní fázi

Kapalinová chromatografie na reverzní fázi (reversed phase liquid chromatography, RP-LC) je nejčastěji využívanou chromatografickou metodou pro separaci peptidů. RP-LC využívá nepolární SF a polární MF a poskytuje lepší separační účinnosti a kratší časy analýzy než jiné módy separace. RP-LC pracuje na principu hydrofobních interakcí mezi analytem a nepolární stacionární fází. [44]

Při proteomické analýze se jako MF v RP-LC využívá voda s příměsí organického rozpouštědla, např. acetonitril nebo methanol, a organické kyseliny (mravenčí, octová). Hlavním důvodem přidávání kyselin do MF je snížení iontových interakcí mezi nosičem SF a analytem.

Při výběru rozpouštědel a aditiv je třeba myslet na jejich kompatibilitu s MS, např. kyselina trifluoroctová snižuje ionizační účinnost, vytvářením iontových párů s pozitivně nabitými ionty. [48] [49]

Náplňové RP-LC kolony jsou tvořeny nosičem SF s navázanými funkčními skupinami. Silikagelové částice jsou nejběžnějším nosičem SF pro RP-LC. Silikagel má na svém povrchu silanolové (SiOH) skupiny, které jsou vhodným místem pro navázání nepolárních funkčních skupin. Nejběžnější funkční skupinou při separaci peptidů jsou n-octyl (C8), n-octadecyl (C18). Pro snížení vlivu nežádoucích polárních interakcí nosiče SF lze nezreagované volné silanolové skupiny derivatizovat pomocí tzv. endcappingu např. trimethylchlorsilanem nebo dimethyldichlorsilanem. [45]

Dalším možným typem kolon používaným pro separaci proteinů jsou tzv. monolitické kolony, kde na rozdíl od klasických částicemi plněných kolon, celý separační prostor vyplňuje jeden kus materiálu s definovanou velikostí pórů potažený SF.[48] V monolitických kolonách jsou přítomny 2 typy pórů, velké makropóry zajišťující průtok MF kolonou a mesopóry poskytující koloně větší separační povrch. Monolitické kolony vykazují nižší odpor vůči přenosu hmoty a nižší zpětné tlaky než částicemi plněné kolony s podobnou účinností. Oproti náplňovým UHPLC kolonám monolitické kolony pracují při vyšších průtocích mobilní fáze. Limitací monolitických kolon při analýze komplexních biologických vzorků je jejich nižší kapacita.[50]

2.4 Hmotnostní spektrometrie

MS je instrumentální, separační, analytická metoda, schopná určit poměr relativní molekulové, nebo atomové hmotnosti ku nábojovému číslu (m/z) iontu v plynné fázi.

MS patří v současnosti k nepostradatelným nástrojům moderní bioanalýzy. [51] S rozvojem moderních ionizačních technik se otevřela možnost analýzy velkých makromolekul i celých virových částic. [52]

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. V bioanalytice se téměř výhradně využívají ionizační techniky pomocí laserového pulsu za asistence matrice (MALDI) nebo ionizace pomocí elektrospreje (ESI). Důvodem masivní popularity těchto dvou ionizačních technik je schopnost generovat stabilní ionty velkých makromolekul.

Ionty v plynné fázi jsou rozděleny podle poměru m/z v hmotnostním analyzátoru. Rozdělení probíhá na základě fyzikálních principů podle typu daného analyzátoru. Přehled základních běžně používaných hmotnostních analyzátorů je uveden v (Tabulka 1).

Způsob detekce je založen na konverzi na detektor dopadajících iontů na elektrony, měřitelné jako elektrický proud. V praxi se primárně využívají detektory na bázi elektronových násobičů, channeltronu nebo mikrokanálových destiček. Výhodou těchto detektorů je značná amplifikace signálu pro analýzu s vysokou citlivostí. [51]

Speciální typ detekce využívají analyzátorů typu orbitální pasti a iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací, kde

detekce probíhá indukcí proudu na elektrodách, v detekční cele hmotnostním analyzátoru. [51]

Tabulka 1 Přehled hmotnostních analyzátorů

<i>Typ analyzátoru</i>	<i>Zkratka</i>	<i>Princip separace</i>
<i>Elektrický sektor</i>	E/ESA	Kinetická energie
<i>Magnetický sektor</i>	B	Zakřivení dráhy v magnetickém poli
<i>Iontová past</i>	IT	Stabilita oscilace v pasti
<i>Kvadrupólový analyzátor</i>	Q	Stabilita trajektorie při průletu
<i>Analyzátor doby letu</i>	TOF	Doba letu
<i>Orbitální iontová past s Fourierovou transformací</i>	OT	Rezonanční frekvence
<i>Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací</i>	FTICR	Rezonanční frekvence

2.4.1 Ionizace elektrosprejem

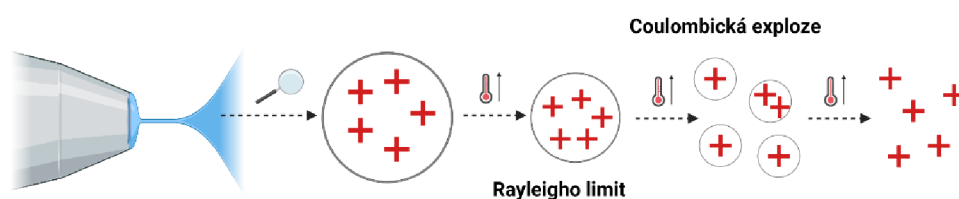
Ionizace elektrosprejem byla poprvé popsána v 80. letech minulého století Johnem Fennem. [53] Technika znamenala zásadní průlom v oblasti hmotnostní spektrometrie makromolekul. ESI umožňuje generovat vícekrát nabitě ionty. [54]

ESI je měkká ionizační technika, nedochází k nežádoucí fragmentaci ve zdroji. Dokonce je možné ionizovat některé molekulové komplexy bez přerušení slabých vazebných interakcí. [55] Výhodou je, že celý proces ESI probíhá za atmosférického tlaku, pro snadné spojení ESI s LC.

Při ESI je analyt nízkým průtokem (1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$) za atmosférického tlaku, společně s rozpouštědlem, přiváděn do kovové kapiláry, na kterou je aplikováno vysoké napětí (3-6 kV), které vytváří silné elektrické pole, schopné dispergovat roztok do aerosolu vysoce nabitých kapiček, které formují tzv. Taylorův kužel [51]. Tvorba aerosolu bývá podporována inertním (nebulizačním) plynem (často N_2), který je do iontového zdroje přiváděn podél vstupní kapiláry. V nabitých kapičkách proti sobě působí dvě síly, povrchové napětí kapiček a odpudivé Coulombické síly mezi stejnými náboji. Vypařováním rozpouštědla dochází ke zmenšování povrchu kapek, přičemž náboj v kapičkách zůstává konstantní. Dochází tedy k růstu odpudivých coulombických sil až do bodu, kdy odpudivé síly

vyrovnají síly povrchového napětí (Rayleighův limit). Při dalším zmenšování povrchu kapek dochází k tzv. coulombické explozi, při které se původní kapka rozpadá na menší kapičky. [54] (Obrázek 4)

Byly publikovány 2 modely vzniku iontů v plynné fázi při ESI. Podle modelu zbytkového náboje (Charge Residue Model) se proces Coulombických explozí opakuje tak dlouho, dokud nedojde ke vzniku kapiček obsahujících pouze jeden iont ($r \approx 1$ nm). [54] Vzniklé ionty jsou pomocí iontové optiky vedeny do hmotnostního analyzátoru.



Obrázek 4. Schematické znázornění coulombické exploze. Obrázek vytvořen pomocí programu Bio-Render.com

V nabitých kapičkách generovaných elektrosprejem proti sobě působí dvě síly, přitažlivé povrchové napětí kapiček a odpuzivé coulombické síly mezi stejnými náboji. Vypařováním rozpouštědla dochází ke zmenšování povrchu kapek, přičemž náboj v kapičkách zůstává konstantní. Dochází tedy k růstu odpuzivých coulombických sil až do bodu, kdy odpuzivé síly vyrovnají síly povrchového napětí (Rayleighův limit). Při dalším zmenšování povrchu kapek dochází k tzv. coulombické explozi, při které se původní kapka rozpadá na menší kapičky. Tento děj se opakuje až dojde k získání iontů v plynné fázi.

2.4.2 Hmotnostní analyzátor na bázi kvadrupólu

Kvadrupólový průletový hmotnostní analyzátor (Q) využívá k separaci iontů, podle jejich m/z , stabilitu trajektorií iontů v elektrickém poli. Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř kovových tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu. Na protilehlý pár tyčí je aplikováno stejnosměrné a střídavé radiofrekvenční napětí. Při dané kombinaci napětí mají stabilní dráhu letu pouze ionty o určitém m/z , zbylé ionty v kvadrupólu kolidují s povrchem tyčí a k výslednému signálu nepřispívají. [51]

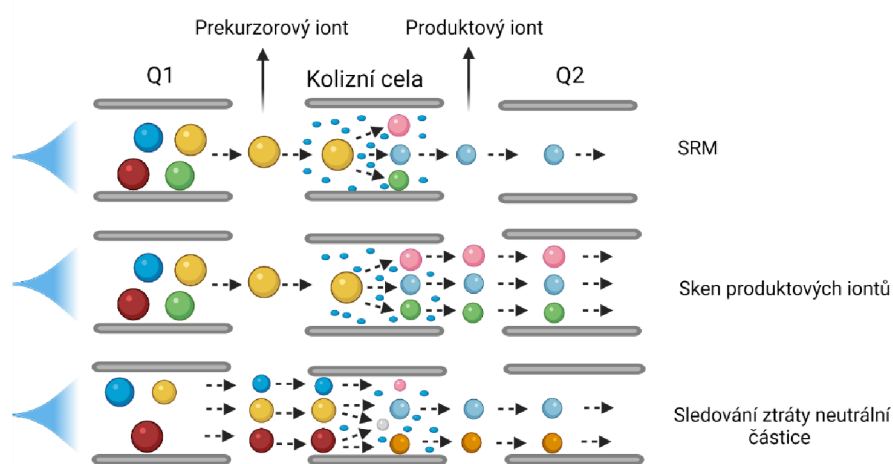
Přes nízké rozlišení se Q hojně využívá v tandemové hmotnostní spektrometrii jako součást hybridních systémů nebo třístupňového kvadrupólu (QqQ).

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) využívá sériové zapojení více hmotnostních analyzátorů v prostoru (sektorové analyzátor, trojitý kvadrupól, hybridní systémy) nebo v čase (iontové pasti).

MS/MS systémy se většinou využívají pro získání strukturních informací o analytu nebo k jeho citlivé detekci.

Instrumentace QqQ zahrnuje dva hmotnostní filtry (Q1 a Q2) a kolizní celu, která je umístěna mezi Q1 a Q2.

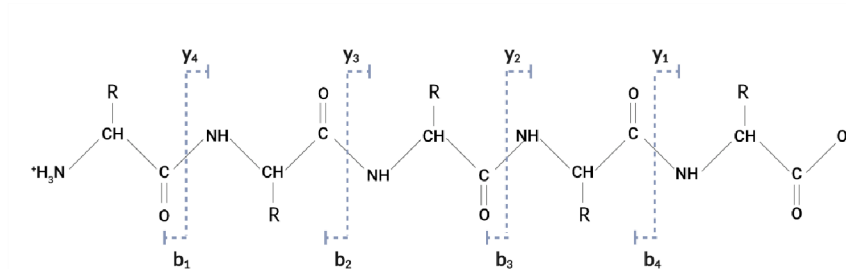
QqQ může operovat v několika módech. Při módu sledování vybrané/vícenásobné reakce (SRM/MRM) je Q1 nastaven jako filtr pro výběr svazku(ů) iontů, v kolizní cele jsou dané ionty fragmentovány, Q2 funguje jako filtr pro m/z vybraných produktových iontů (Obrázek 5). Výhody SRM přístupu jsou vysoká selektivita, rychlý pracovní cyklus (kompatibilita s UHPLC), jednoduché vyhodnocování získaných dat a vysoká citlivost. Další možností analýzy je sken produktových iontů, kde jsou Q1 a kolizní cela nastaveny stejně jako v případě SRM, ale na Q2 probíhá sken všech fragmentů (produktových iontů). [30] V režimu sledování ztráty neutrální částice sledujeme dvojice prekurzorový ion-produktový ion, jejichž rozdíl m/z odpovídá zadané neutrální ztrátě. (Obrázek 5) Toho lze s výhodou využít při studiu fosforylací, kdy dochází k odštěpení fosfátu z prekurzoru. [51]



Obrázek 5 Schéma QqQ módů. Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

Fragmentaci iontů v kolizní cele můžeme zajistit pomocí několika mechanismů: kolizí urychlených iontů s inertním plynem (collision induced dissociation, CID), disociací pomocí elektronového záchytu, disociace pomocí elektronového přenosu nebo povrchově indukovaná disociace. Při CID jsou vybrané ionty podrobeny mnohonásobným srážkám s inertním plynem v kolizní cele, tyto srážky poskytují dostatečnou energii k přerušení kovalentních vazeb. Při CID peptidů se přednostně štěpí peptidové vazby, tím dochází k vytvoření řady homologních

produktových iontů tzv. b a y série. Z rozdílů m/z jednotlivých fragmentů lze určit pozice dané aminokyseliny v sekvenci.[56]



Obrázek 6. Schéma typické y a b série po CID fragmentaci; Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní model

Cerebrální organoidy byly kultivovány na Ústavu histologie a embryologie lékařské fakulty Masarykovy univerzity, podle protokolu publikovaného Lancaster a Knoblich v roce 2014. [57]

Pro experiment bylo použito 48 organoidů rozdělených do šesti skupin podle délky kultivace (48 dní, 76 dní, 95 dní, 110 dní, 135 dní, 160 dní), přičemž 24 organoidů bylo odvozeno z fibroblastů 56leté ženy s familiární AN (PSEN1 mutace) a zbylých 24 kontrolních organoidů z fibroblastů zdravého 8letého muže.

3.2 Chemikálie

$\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ (AmBic, BioUltra, $\geq 99.5\%$ purity), deoxycholát sodný (SDC, BioXtra, $\geq 98.0\%$ purity), jodacetamid (IAA, $\geq 99\%$ purity) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), 1,4-dithiothreitol (DTT, $\geq 99\%$ purity) byl zakoupen od firmy Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany), kyselina mravenčí (pro MS $\sim 98\%$ purity) a isopropanol (IPA, Cat# 34965) byl zakoupen od firmy Honeywell (Charlotte, NC, USA), Trypsin gold, Mass Spec. Grade byl zakoupen u firmy Promega (Madison, WI, USA), izotopicky značené standardy peptidů (Heavy labeled SpikeTides_L crude standards) byly syntetizovány firmou JPT Peptide Technologies Inc. (Acton, MA, USA). Pierce BCA Protein Assay Kit reagentie byly zakoupeny od firmy ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)

3.3 Příprava vzorků

3.3.1 Stanovení celkového proteinu pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou

K lyofilizovaným organoidům bylo přidáno 100 μl vody. Vzorky byly promíchány na třepačce typu vortex (20 s) a poté podrobeny dvěma homogenizačním cyklům (10 s cyklus, 4 m/s, pauza mezi cykly 10 s) a sonifikovány ve vodní lázni (1 min, 80 kHz). Následně vzorky byly promíchány

na vortexu (20 s) a poté centrifugovány (1 min, 12,3 RCF). Ze vzorků bylo odebráno 10 μ l supernatantu pro provedení orientačního stanovení celkového proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny (Pierce BCA Protein Assay Kit od firmy ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA), BCA). Po odebrání byly vzorky vysušeny.

3.3.2 IPA extrakce pro studium lipidů

Ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l 80 % isopropanolu (IPA) směs byla promíchána na vortexu a podrobena dvěma cyklům homogenizace (10s cyklus, 6 m/s, pauza 10 s), ultrazvukové lázni (1 min, 37 kHz) a míchána na třepačce (10 min). Poté byly vzorky centrifugovány (5 minut, 12,3 RCF). Ze vzorku bylo odebráno 85 μ l supernatantu pro analýzu lipidů a následně byla proteinová peleta vysušena.

3.3.3 Proteinová extrakce

Vysušená peleta byla homogenizována (dva cykly po 10 s, 4 m/s, pauza 10 s). Po homogenizaci bylo do vzorků přidáno 32-589 μ l extrakčního pufru (5 mg/ml deoxycholátu sodného (SDC), v 50 mM NH_4HCO_3 (Am-Bic), přidané množství pufru bylo vztaženo na celkové množství proteinu změřeného pomocí BCA v daném vzorku; 1 μ g proteinu/2 μ l pufru), vzorky byly promíchány na vortexu (20 s), poté opět homogenizovány (2x 10 s cyklus, 4 m/s, pauza 10 s). Dále byly vzorky promíchány na vortexu (20 s), následně sonifikovány ve vodní lázni (1 min, 80 kHz), promíchány na vortexu (20 s) a centrifugovány (1 min, 12,3 RCF). Ze vzorků byly odebrány alikvotní podíly po 60 μ l (30 μ g proteinu) supernatantu. U vzorků s nižším objemem byl odebrán celý objem supernatantu. Nižší koncentrace proteinu v těchto vzorcích byla zohledněna v průběhu celé další analýzy.

3.3.4 Redukce, alkylace, štěpení

K supernatantu bylo přidáno 6 μ l DTT (výsledná koncentrace 20mM) jako redukční činidlo. Směs byla zahřívána v termobloku (95 $^{\circ}\text{C}$, po dobu 10 minut). Následně bylo do zchladlých vzorků přidáno 6 μ l IAA (výsledná koncentrace 40 mM) jakožto alkylačního činidla. Vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut na temném místě. Po alkylaci bylo ke vzorkům přidáno 1 μ l trypsinu (0,5 μ g/ μ l;1:60, trypsin:celkový protein). Vzorky byly utěsněny parafilmem a inkubovány v třepačce (17 h, 37 $^{\circ}\text{C}$).

Po inkubaci bylo štěpení zastaveno přidavkem 200 μ l 2% kyseliny mravenčí (kontrola pH <4) a byly přidány izotopicky značené standardy stanovovaných peptidů (výsledná koncentrace ve vzorku 260nM). Vzorky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 12,3 RCF.

3.3.5 Přečištění na SPE

Supernatanty byly převedeny na SPE HLB PRiME 96 jamkovou destičku. Vzorek byl extrahován za sníženého tlaku. K promytí vzorku bylo použito 300 μ l 2% kyseliny mravenčí. Do nové destičky byly peptidy eluovány pomocí 500 μ l 80% acetonitrilu. Po přečištění byl vzorek odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 30 μ l 5% acetonitrilu s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí. Vzorky byly důkladně promíchány na vortexu a analyzovány pomocí LC-MS/MS.

3.4 Optimalizace proteomického protokolu

První experiment byl zaměřen na zjištění optimálního extrakčního činidla vzhledem k vlastnostem sledovaných proteinů. (Tabulka 2) V experimentu byla testována 4 běžně používaná extrakční činidla a to NH_4HCO_3 (Ambic), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), močovina, guanidin hydrochlorid. Každé z těchto činidel solubilizuje proteiny jiným mechanismem. Pro experiment byly použity dva alikvotní podíly ze směsného vzorku (QC, vytvořeného odebráním alikvotního podílu z extraktů CO) pro každé extrakční činidlo. Vzorky byly zpracovány protokolem, popsáním v kapitole (3.3). Vzorky byly podrobeny LC/MS analýze a data byla porovnána mezi sebou.

Dále jsme hodnotili vliv povrchově aktivní látky na rozpuštění proteinů. Testovali jsme deoxycholát sodný (SDC; na rozdíl od dodecylsírany sodného ho lze lépe odstranit před LC/MS analýzou). Pro experiment byly použity 4 alikvotní podíly z QC CO. Jako extrakční pufr pro tento experiment byl zvolen Ambic. Ke dvěma vzorkům bylo přidáno SDC a dva vzorky byly bez přidavku SDC. Vzorky byly zpracovány stejným způsobem jako v případě optimalizace extrakčních činidel.

Cílem další optimalizace bylo zjištění optimální délky štěpení trypsinem. Chtěli jsme ověřit, zda je možné zkrátit čas protelytického štěpení. Pro experiment bylo využito 6 alikvotních podílů z QC CO. Jako extrakční pufr byl zvolen Ambic s SDC. Extrakce, redukce, alkylace byly provedeny

standardním protokolem. Štěpení bylo zastaveno vždy u dvou vzorků po 2 h, 4 h a 16 h. Dále byly vzorky přečištěny na SPE a byla provedena LC/MS analýza.

Byla testována výtěžnost SPE metody pro zjištění, zda v průběhu přečištění vzorků nedochází k významným ztrátám sledovaných peptidů. Návratnost byla testována na čtyřech vzorcích organoidů, kdy k polovině vzorků byly značené standardy přidávány před provedením SPE a druhé polovině vzorků po provedení SPE. Dále byla provedena LC/MS analýza. Data byla vyhodnocena a následně z nich byla vypočítána návratnost (recovery) jednotlivých peptidů.

Matriční efekt byl testován pomocí čtyř vzorků obsahujících rozpuštěné standardy v nepřítomnosti matrice a čtyř QC CO, kde byly standardy přidány po provedení SPE. Dále byla provedena LC/MS analýza. Z takto získaných dat byl vypočítán matriční efekt pro jednotlivé peptidy podle vztahu (3).

$$ME = 100\% - \left(\frac{\bar{A}_1}{\bar{A}_2} \cdot 100\% \right) \quad 3$$

kde ME je matriční efekt, \bar{A}_1 je průměrná odezva peptidů v matrici a \bar{A}_2 je průměrná odezva peptidů v nepřítomnosti matrice

Kvůli malému množství dostupné matrice byla většina měření prováděna pouze ve dvou opakováních. Na optimalizačních měřeních nebyla prováděna statistická analýza, a proto mají pouze orientační charakter.

Tabulka 2 Souhrnná tabulka vlastností proteinů

Protein	Průměrná molekulová hmotnost [DA]	Izoelektrický bod
<i>APOE</i>	36154	5,7
<i>APP</i>	86943	4,7
<i>CD44</i>	81537	5,1
<i>GAPDH</i>	36053	8,6
<i>NEFL</i>	61516	4,6
<i>NEFM</i>	102472	4,9
<i>S100B</i>	10713	4,5
<i>TTR</i>	15887	5,5
<i>TUBB3</i>	50433	4,8

Tabulka 3 Souhrnná tabulka vlastností peptidů

<i>Protein</i>	<i>Peptidová sekvence</i>	<i>Molekulová hmotnost</i>	<i>Izoelektrický bod</i>	<i>Hydrofobní index (FISHER)</i>
APOE	LGPLVEQGR	968	7	20,52
APP	LVFFAEDVGSNK	1325	4,1	31,43
CD44	ALSIGFETCR	1096	6,3	23,93
GAPDH	LISWYDNEFGYSNR	1764	4,1	34,83
NEFL	FTVLTESAAK	1066	6,9	21,59
NEFM	SIELESVR	932	4,3	20,09
S100B	AMVALIDVFNHQYSGR	1707	7,8	44,77
TTR	AADDTWEPFASGK	1394	3,7	24,21
TUBB3	ISVYYNEASSHK	1398	7,7	18,16

3.5 LC-MS/MS analýza

Nastavení LC/MS systému vycházelo z předchozího výzkumu v laboratoři, a proto nebylo optimalizováno v rámci mé diplomové práce.

3.5.1 Chromatografická analýza

Chromatografická separace byla provedena na přístroji 1290 Infinity II systém od firmy Agilent Technologies (CA, USA). Při separaci byla použita kolona ACQUITY UHPLC CSH Peptide C18 (1.7 μm , 100 x 2.1 mm) od firmy Waters Corporation vyhřívaná na 40 °C. Pro analýzu peptidů byla použita lineární gradientová eluce. Jako mobilní fáze bylo použito rozpouštědlo A (miliQ voda s 0,1% FA) a B (acetonitril s 0,1% FA), pomocí kterých byl vytvářen lineární gradient popsany v tabulce níže. (Tabulka 4)

Tabulka 4. Chromatografický gradient

<i>Čas [min]</i>	<i>A [%]</i>	<i>B [%]</i>	<i>Průtok [ml/min]</i>
0	95	5	0,3
25	70	30	0,3
25,5	5	95	0,3
30	5	95	0,3
31	95	5	0,3
35	95	5	0,3

3.5.2 Hmotnostní analýza

Chromatografický systém byl on-line spojený s hmotnostním spektrometrem (Agilent Technologies; model 6495B) s ESI ionizací a třístupňovým kvadrupólem. Použité nastavení hmotnostního spektrometru a použité ionizační podmínky jsou uvedeny v tabulce. (Tabulka 5)

Tabulka 5 Nastavení hmotnostního spektrometru

<i>Napětí na kapiláře</i>	3500 V
<i>Napětí na trysce</i>	500 V
<i>Teplota sušícího plynu</i>	200 °C
<i>Průtok sušícího plynu</i>	16 l/min
<i>Tlak nebulizačního plynu</i>	1,72 bar
<i>Teplota plášťového plynu</i>	400 °C
<i>Průtok plášťového plynu</i>	10 l/min

3.5.3 Příprava SRM metody

Prvním krokem byl výběr vhodných proteotypických peptidů v on-line databázi nextprot.org. Pro každý analyzovaný protein bylo vybráno 2–7 peptidů o délce 7-20 aminokyselin. Pro každý peptid bylo pomocí online databáze SRMATlas.org vybráno 3-5 SRM přechodů na základě jejich MS odezev dostupných v knihovně. Přechody byly nastaveny i pro izotopicky značené standardy. Odezva přechodů byla testována analýzou izotopicky značených standardů stanovovaných peptidů. Přechody s nejvyšší odezvou byly vybrány jako kvantifikační, ostatní přechody slouží k potvrzení identity daného peptidu. (Tabulka 6)

MATERIÁL A METODY

Tabulka 6. Přehled kvantifikačních přechodů

<i>Protein</i>	<i>Peptid</i>	<i>Prekurzor</i>	<i>Produkt</i>	<i>Frag- ment</i>	<i>Retenční čas [min]</i>
<i>TUBB3</i>	ISVYYNEASSHK	466,5614	642,7964	y11	4,28
<i>TUBB3*</i>	ISVYYNEASSHK	469,2328	646,8035	y11	4,28
<i>NEFM</i>	SIELESVR	466,756	732,3886	y6	7,09
<i>NEFM*</i>	SIELESVR	471,7601	742,3969	y6	7,1
<i>NEFL</i>	FTVLTESAAK	533,7926	719,3934	y7	7,8
<i>NEFL*</i>	FTVLTESAAK	537,7997	727,4076	y7	7,8
<i>S100B</i>	AMVALIDVFHQYSGR	569,6276	703,3648	y12	18,95
<i>S100B*</i>	AMVALIDVFHQYSGR	572,9637	708,3689	y12	18,95
<i>CD44</i>	ALSIGFETCR	577,2871	769,3298	y6	11,1
<i>CD44*</i>	ALSIGFETCR	582,2913	779,338	y6	11,1
<i>APOE</i>	LGPLVEQGR	484,7798	588,31	y5	5,9
<i>APOE*</i>	LGPLVEQGR	489,784	598,3183	y5	5,9
<i>TTR</i>	AADDTWEPFASGK	697,8148	606,3246	y6	12,2
<i>TTR*</i>	AADDTWEPFASGK	701,8219	614,3388	y6	12,2
<i>APP</i>	LVFFAEDVGSNK	663,3404	213,1598	b2	14,4
<i>APP*</i>	LVFFAEDVGSNK	667,3475	213,1598	b2	14,4
<i>GAPDH</i>	LISWYDNEFGYSNR	882,4048	1101,46	y9	16,7
<i>GAPDH*</i>	LISWYDNEFGYSNR	887,409	1111,468	y9	16,7

3.5.4 Kalibrační křivky

Pro zjištění parametrů metody byly vytvořeny kalibrační křivky. Do směsných QC vzorků organoidů byly přidány interní standardy v deseti koncentračních bodech v rozmezí 1–1300 nM. Pro první čtyři nejnižší koncentrační body bylo měření provedeno v šesti opakováních, pro ostatní pouze ve čtyřech opakováních. Jako první bod kalibrace byla zvolena nejnižší koncentrace s viditelným signálem a relativní odchylkou mezi opakováními menší než 20 %. Kalibrační křivky byly použity pro výpočet meze detekce (limit of detection, LOD), meze kvantifikace (limit of quantification, LOQ) a citlivosti. Pro výpočet LOD a LOQ byly použity vztahy (1; 2)

3.5.5 Postup kvantifikace a vyhodnocení dat

Kontrola a integrace chromatogramů byla provedena v programu Skyline (verze 20.2.0.343) Plochy píků jednotlivých peptidů byly exportovány do tabulkového procesoru (Microsoft Excel). Výpočet koncentrace byl proveden pomocí vzorce:

$$C_{pep} = \frac{A_{pep}}{A_{IS}} \times C_{IS}$$

4

kde C_{pep} je koncentrace peptidu, A_{pep} je plocha pod eluční křivkou peptidu, A_{IS} je plocha pod eluční křivkou interního standardu.

Za předpokladu, že koncentrace peptidů odpovídá koncentraci proteinu, ze kterého byl tento peptid odštěpen, můžeme pomocí základních vztahů pro látkové množství a molární hmotnost vypočítat hmotnost původního proteinu. Tato hmotnost byla nakonec normalizována na hmotnost GAPDH v daném vzorku.

Vynesení hodnot do grafů a t-testy pro zjištění statisticky významných odchylek byly provedeny v programu GraphPad prism 9 (GraphPad Software).

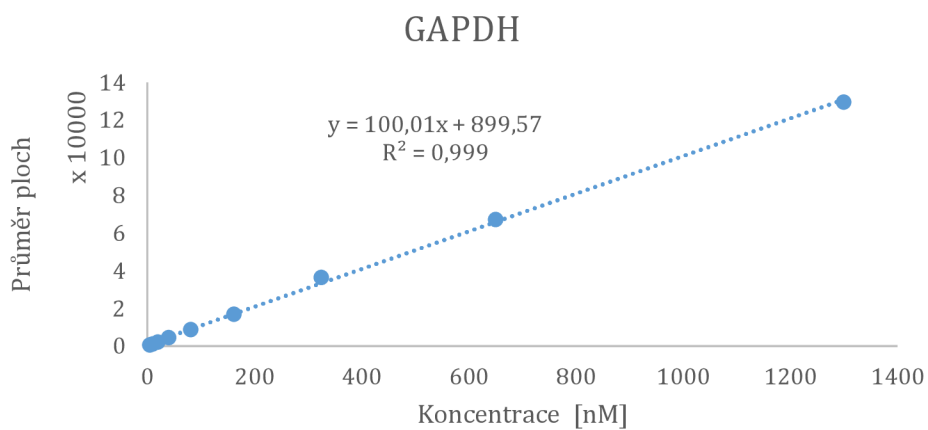
4 Výsledky a diskuse

4.1 Kalibrační závislosti, mez detekce a mez kvantifikace

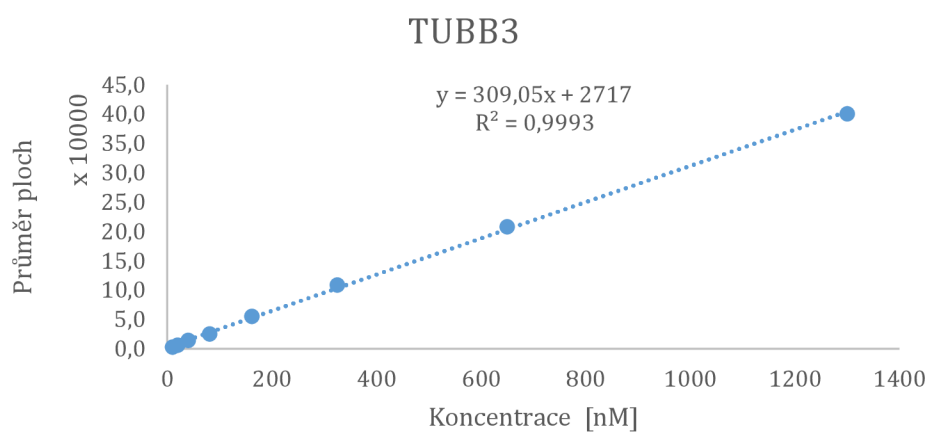
Pro každý kvantifikovaný protein byla změřena kalibrační závislost a vypočten LOD a LOQ.

Tabulka 7. Hodnoty limitů detekce a kvantifikace

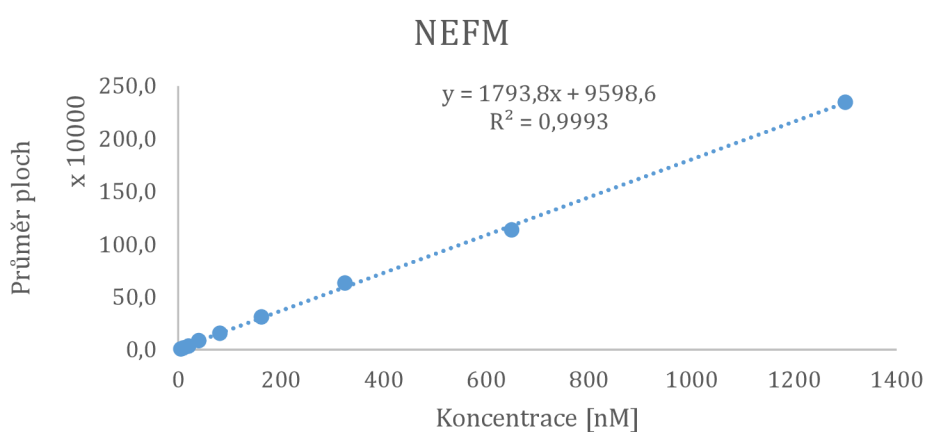
<i>Protein</i>	<i>LOD [nM]</i>	<i>LOQ [nM]</i>
<i>TUBB3</i>	3,11	10,37
<i>NEFL</i>	0,54	1,79
<i>NEFM</i>	1,62	5,41
<i>S100B</i>	0,98	3,26
<i>CD44</i>	0,37	1,22
<i>APOE</i>	2,03	6,76
<i>APP</i>	6,42	21,39
<i>TTR</i>	1,69	5,64
<i>GAPDH</i>	1,40	4,65



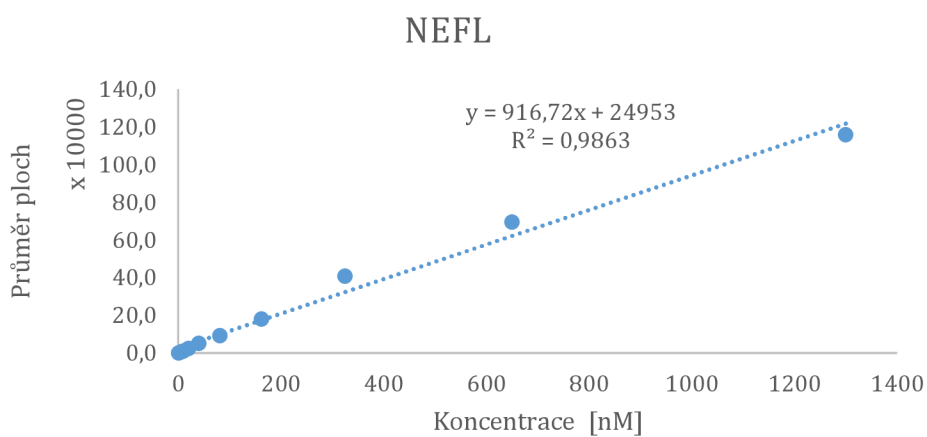
Obrázek 7 Kalibrační závislost GAPDH



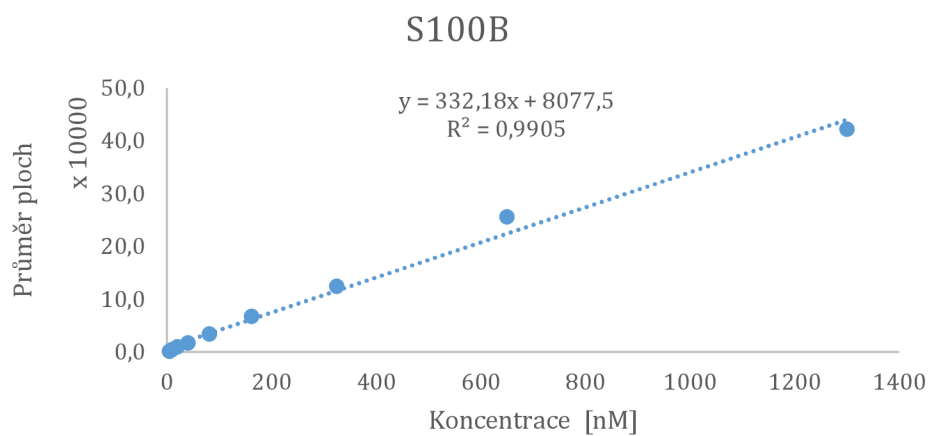
Obrázek 8 Kalibrační závislost TUBB3



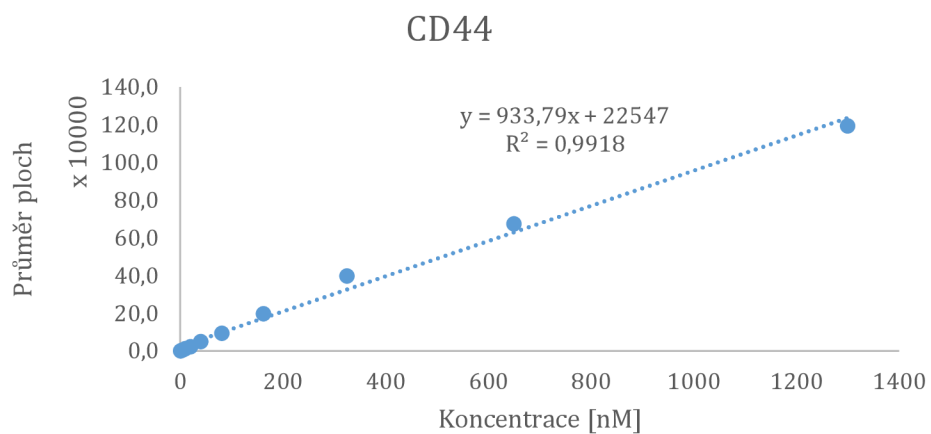
Obrázek 9 Kalibrační závislost NEFM



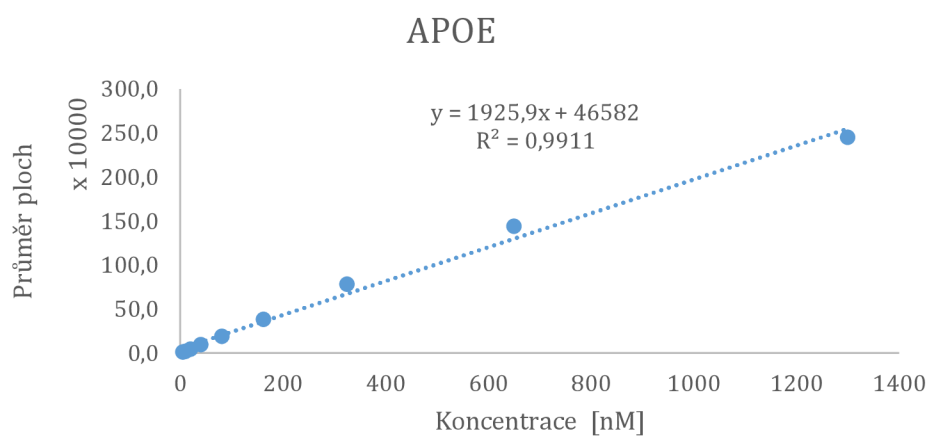
Obrázek 10 Kalibrační závislost NEFL



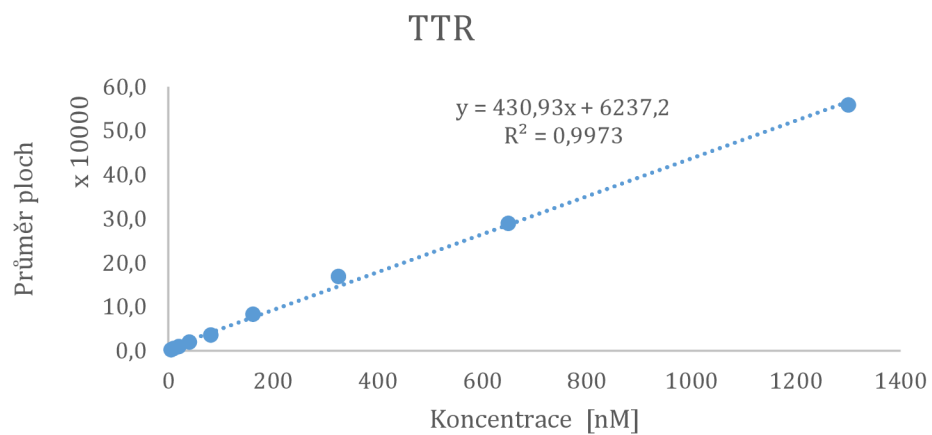
Obrázek 11 Kalibrační závislost S100B



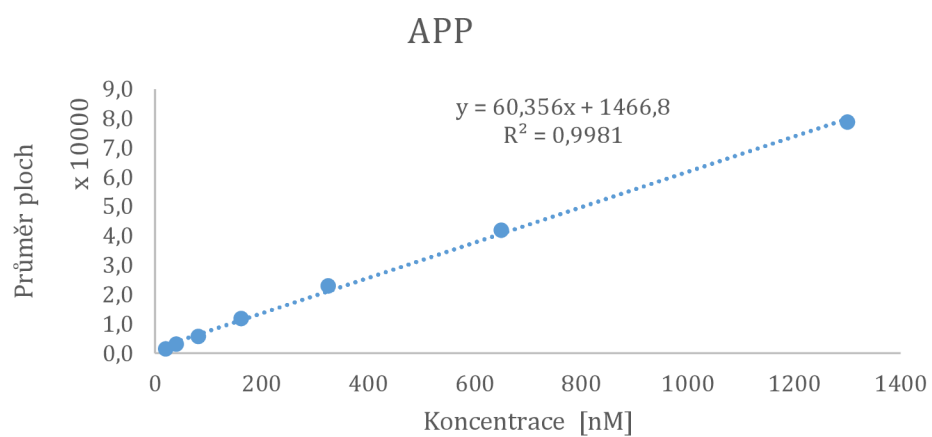
Obrázek 12 Kalibrační závislost CD44



Obrázek 13 Kalibrační závislost APOE



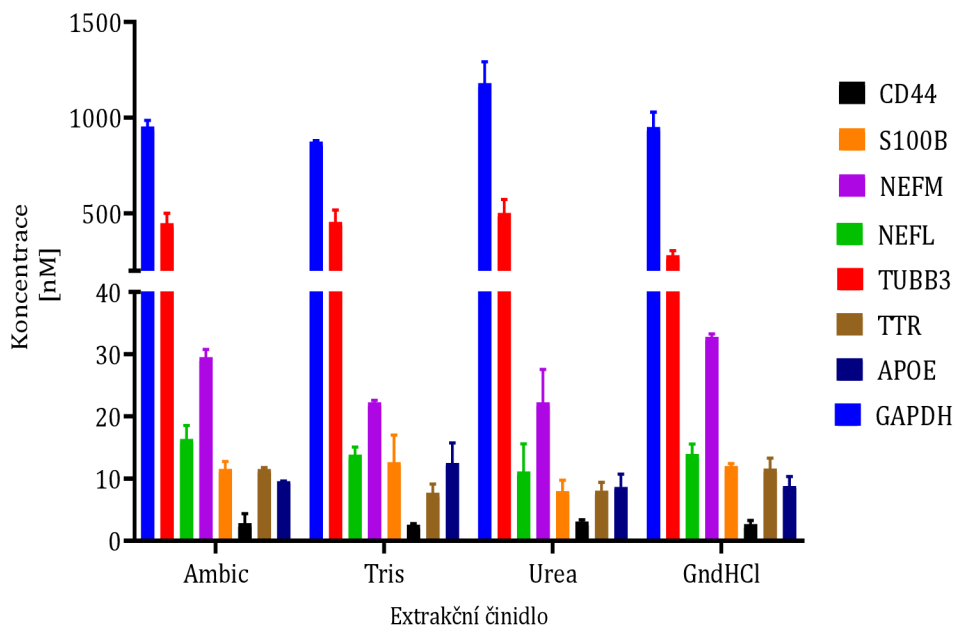
Obrázek 14 Kalibrační závislost TTR



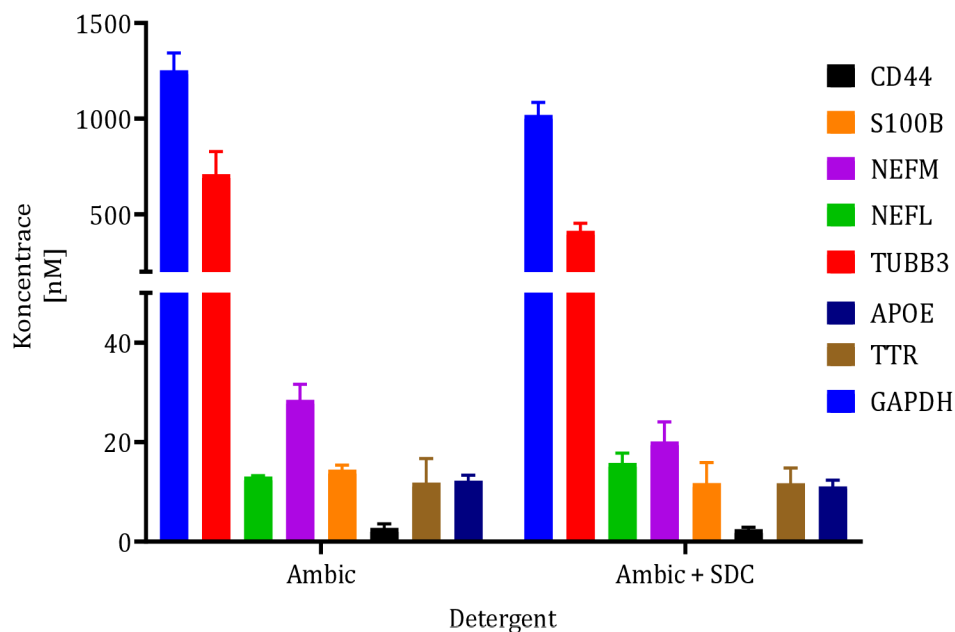
Obrázek 15 Kalibrační závislost APP

4.2 Výsledky optimalizačních kroků

4.2.1 Test extrakčních činidel a detergentů



Obrázek 17 Porovnání extrakčních činidel



Obrázek 16: Test přídavku SDC

Při výběru extrakčního pufru pro finální analýzu bylo důležité sledovat především průměrný výsledek daného extrakčního činidla napříč všemi sledovanými proteiny. Rozdíly v koncentracích zkoumaných proteinů se mezi extrakcemi výrazně neliší. Jedním z možných vysvětlení může být to, že mechanické kroky při provedené extrakci jsou dostatečné pro rozpuštění proteinové pelety. Pro finální analýzu byl nakonec použit jako extrakční pufr Ambic. Hlavní výhodou Ambicu byla jeho kompatibilita s bottom-up proteomickým přístupem, při vyšších koncentracích močoviny a guanidin hydrochloridu může doházet k negativnímu ovlivnění trypsinizace. [58]

Přídavek SDC neměl na vybrané proteiny téměř žádný vliv, ale při optimalizaci toho protokolu byla plánována i analýza dalších např. membránových proteinů u kterých by SDC mohl zlepšit jejich extrakci. Proto jsme se rozhodli ve finálním protokolu SDC použít.

4.2.2 Výtěžnost SPE a vliv matrice

Matriční efekt pozorujeme jako zvýšení nebo snížení odezvy analytů ve vzorcích v přítomnosti matrice oproti odezvě analytů bez přítomnosti matrice. Matriční efekty mohou být způsobeny změnou ionizační účinnosti cílových analytů v přítomnosti společně eluujících sloučenin. Hodnoty matričního efektu byly vypočítány podle vztahu (3)

Tabulka 8. Přehled výtěžností SPE a matričních efektů

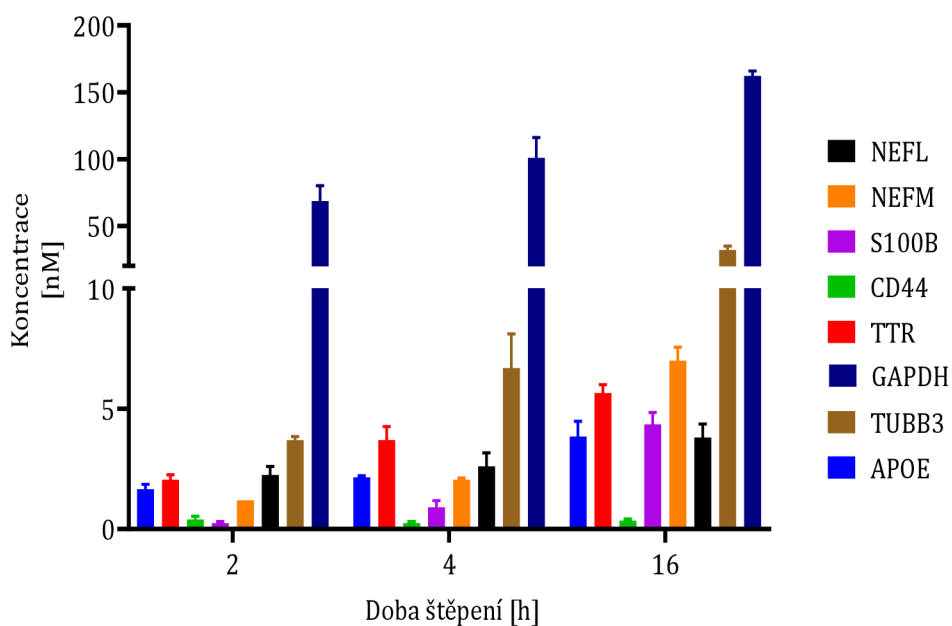
<i>Protein</i>	<i>Matriční efekt [%]</i>	<i>Výtěžnost SPE [%]</i>
<i>TUBB3</i>	21,2	91,5
<i>NEFL</i>	30,6	91,2
<i>NEFM</i>	22,9	83,0
<i>S100B</i>	83,4	90,7
<i>CD44</i>	17,2	89,3
<i>APOE</i>	17,2	74,0
<i>TTR</i>	17,4	90,8
<i>GAPDH</i>	15,3	86,6

Matriční efekty se pohybovaly okolo 20 %. Pouze u peptidů pro NEFL a S100B byl matriční efekt vyšší. Řešením tohoto problému by mohlo být

naředění matrice, ale došlo by k nežádoucímu snížení signálu ostatních proteinů.

Výtěžnost SPE metody se pohybovala v rozmezí 74 – 91,5 %. Při použití SPE nedocházelo k významným ztrátám stanovovaných peptidů.

4.2.3 Optimalizace doby štěpení



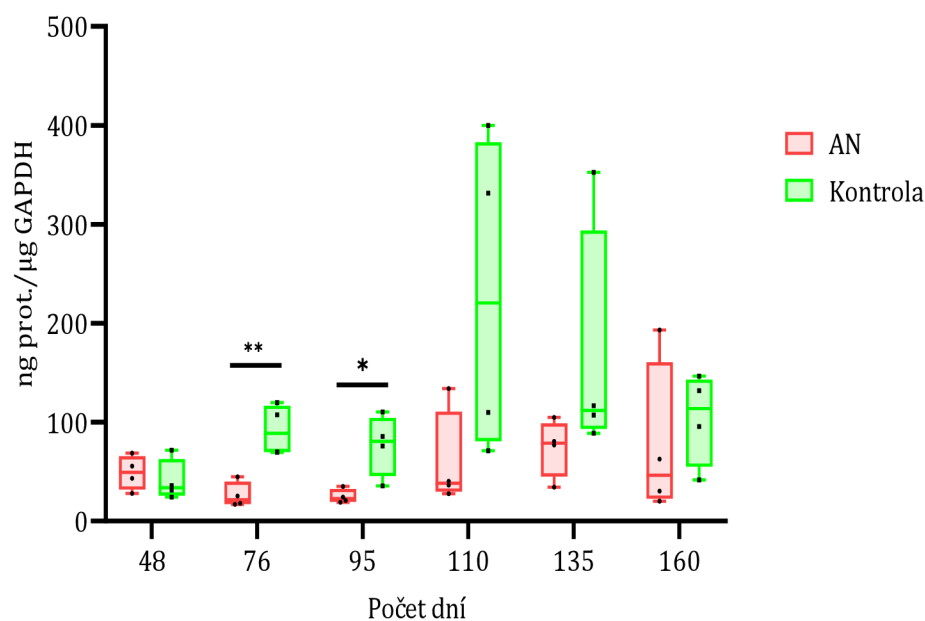
Obrázek 18 Optimalizace doby štěpení trypsinem

Nejvyšší odezvy peptidů téměř u všech proteinů byly po 16 h štěpení trypsinem, proto byl tento čas zvolen pro stanovení proteinů. Výsledky by bylo vhodné potvrdit na větším počtu opakování s využitím statistické analýzy.

4.3 Charakterizace cerebrálních organoidů

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat cerebrální organoidy co se týče jejich vývoje a zastoupení jednotlivých buněčných populací. Proces vývoje nervové tkáně v CO by měl simulovat průběh vývoje lidského mozku. Neuronů i astrocytů vznikají ze stejného typu prekursoru, a to radiálních glií. V ranných fázích kultivace CO by mělo docházet převážně k diferenciaci neuronů, diferenciace astrocytů by měla být lehce opožděna.[59][60]

4.3.1 TUBB3

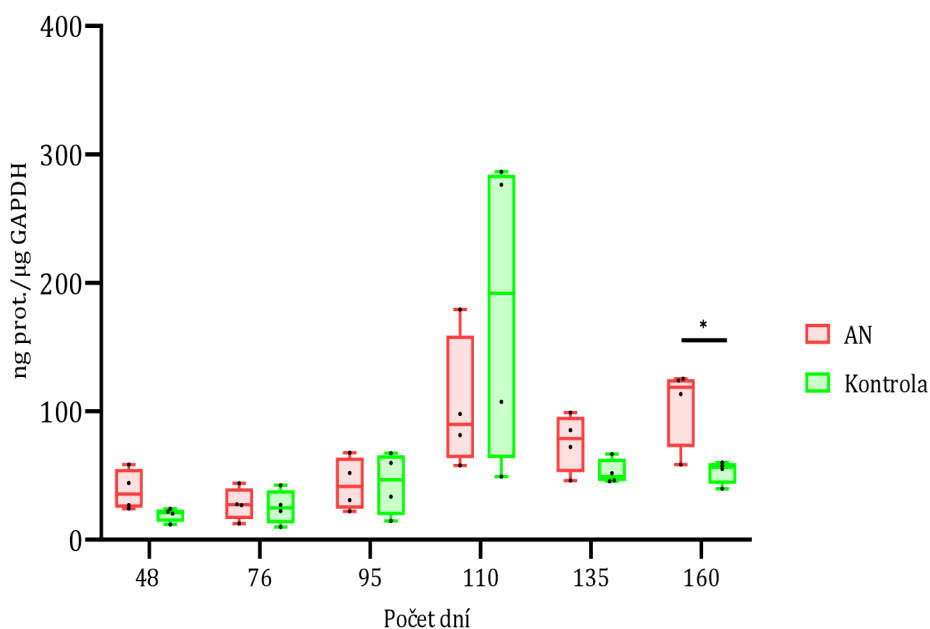


Obrázek 19 Porovnání koncentrací TUBB3 mezi kontrolními a AN organoidy

Koncentrace proteinu TUBB3 byla statisticky významně vyšší u 76 dní ($p=0,01$) a 95 dní ($p=0,05$) kultivovaných kontrolních organoidů. Přestože ve skupinách 110, 135 a 160 dní kultivovaných organoidů statistická analýza nepotvrdila statisticky významné zvýšení koncentrace TUBB3, můžeme sledovat obdobný trend jako u skupiny 76 a 95 dní kultivovaných organoidů.

TUBB3 je považován za buněčný marker neuronů. Z našich výsledků lze usuzovat na to, že dochází k dřívější diferenciaci nervových buněk u kontrolní skupiny v průběhu kultivace cerebrálních organoidů.

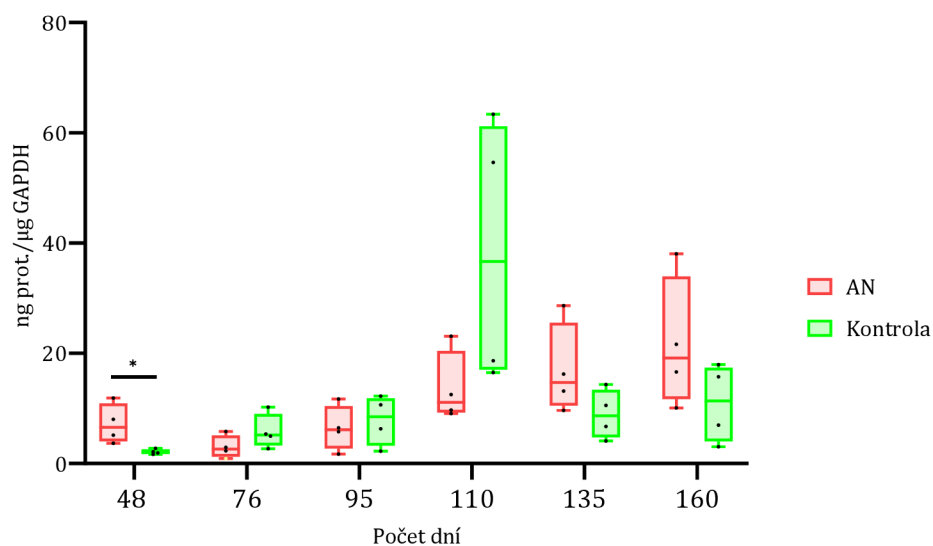
4.3.2 NEFM



Obrázek 20. Porovnání koncentrací NEFM mezi kontrolními a AN organoidy

Statisticky významný rozdíl v koncentracích NEFM mezi kontrolní skupinou organoidů a skupinou organoidů odvozenou z fibroblastů pacienta s AN byl pozorován u 160 dní kultivovaných organoidů, a to na hladině významnosti ($p=0,05$).

4.3.3 NEFL

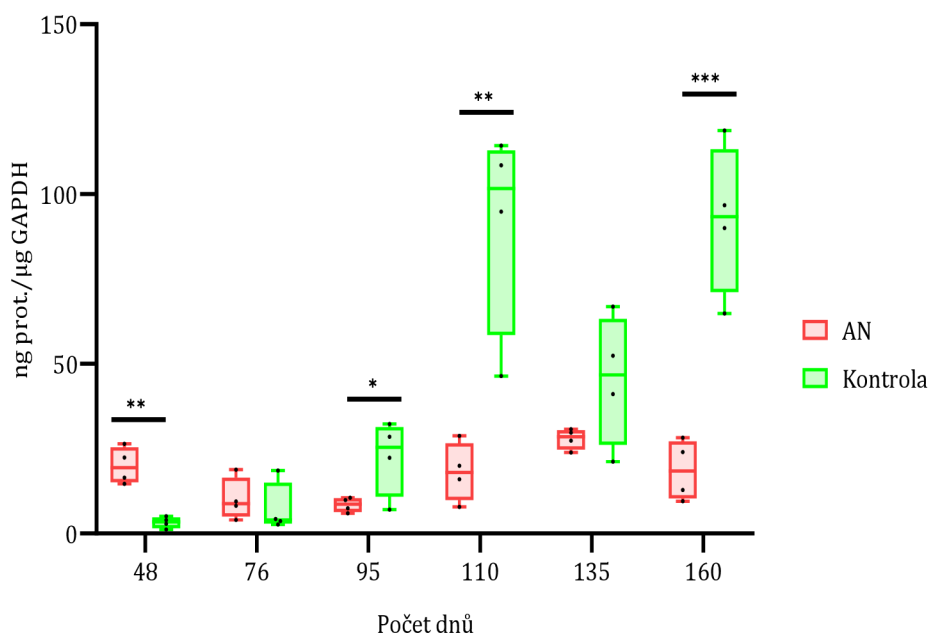


Obrázek 21 Porovnání koncentrací NEFL mezi kontrolními a AN organoidy

U 48 dní kultivovaných AN organoidů byla pozorována statisticky významně zvýšená koncentrace ($p=0.05$) NEFL oproti kontrolní skupině.

Koncentrace proteinu NEFL koreluje s koncentracemi NEFM, oba tyto proteiny jsou podjednotkou neurofilament, které jsou hlavní součástí cytoskeletu neuronů. V literatuře se uvádí, že koncentrace NEFL bývá při AN v mozkové tkáni zvýšena, což se ve zkoumaných organoidech nepodařilo potvrdit. [39]

4.3.4 S100B

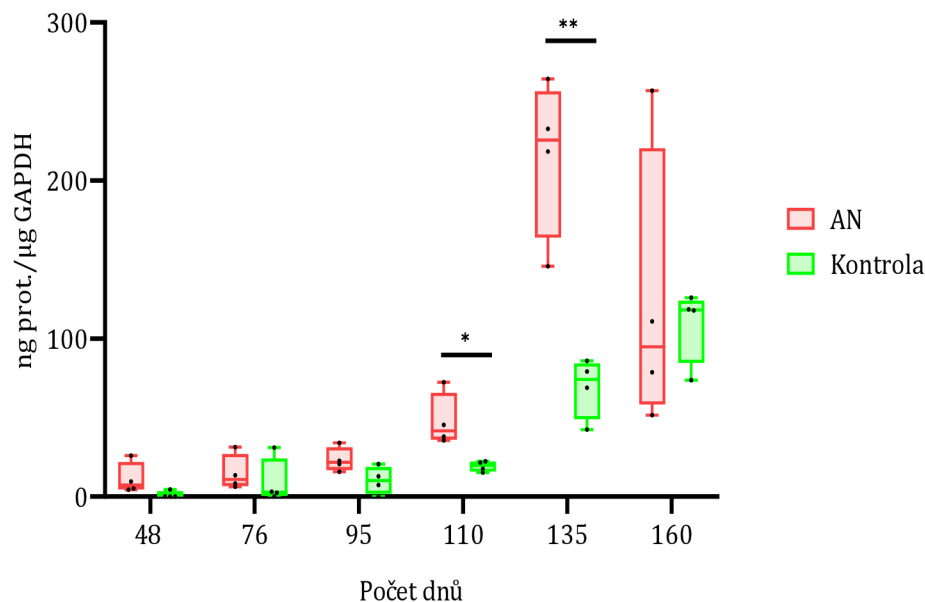


Obrázek 22. Porovnání koncentrací S100B mezi kontrolními a AN organoidy

Bylo pozorováno statisticky významné zvýšení ($p=0,01$) koncentrace S100B u 48 dní kultivovaných AN organoidů oproti kontrolní skupině. V kontrastu s tím u 95, 110 a 160 dní kultivovaných AN organoidů byl naopak pozorován úbytek S100B oproti kontrolním organoidům. Tento rozdíl byl statisticky významný na hladinách významnosti ($p=0,05$) pro 95 dní kultivované organoidy, ($p=0,01$) pro 110 dní kultivované organoidy a ($p=0,001$) pro 160 dní kultivované organoidy.

Z literatury vyplývá, že by exprese proteinu S100B v mozkové tkáni pacientů s AN měla být zvýšena oproti kontrolám, což se nám na organoidech nepodařilo potvrdit. [37]

4.3.5 CD44



Obrázek 23. Porovnání koncentrací CD44 mezi kontrolními a AN organoidy

Koncentrace CD44 byla vyšší u 110 a 135 dní kultivovaných AN organoidů oproti kontrolám. Tyto rozdíly byly statisticky významné na hladinách významnosti ($p=0,05$) pro 110 dní kultivované organoidy a ($p=0,01$) pro 135 dní kultivované organoidy.

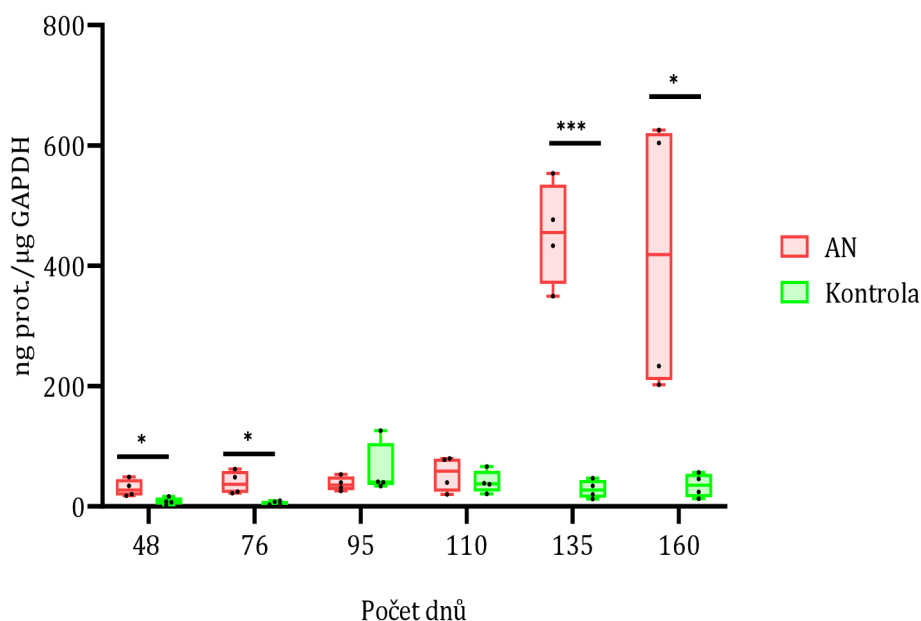
Naše zjištění o zvýšení koncentrace CD44 v AN organoidech je v souladu s literaturou, která uvádí, že dochází ke zvýšení exprese CD44 v astrocytech pacientů s AN. [38]

4.3.6 Shrnutí charakterizace organoidů

Ačkoli byly pozorovány jisté rozdíly mezi AN a kontrolními organoidy v hladinách jednotlivých buněčných markerů, vývojové trendy ukazují, že nejvyšší hladiny buněčných markerů neuronů (TUBB3, NEFL, NEFM) bylo dosaženo ve 110. dni kultivace. Oproti tomu nejvyšší hladiny buněčných markerů astrocytů byly sledovány u 135-160 dní kultivovaných organoidů. Toto zjištění je v souladu s dostupnou literaturou a ukazuje na správnou kultivaci a vývoj zkoumaných CTR a AN organoidů.

4.4 Koncentrace proteinů souvisejících s patologií Alzheimerovy nemoci

4.4.1 APOE

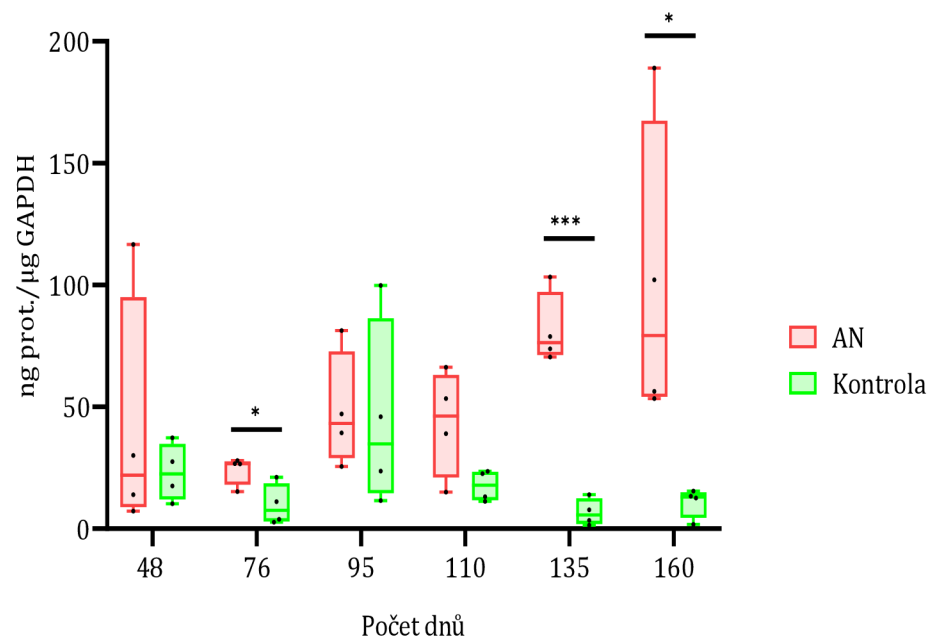


Obrázek 24 Porovnání koncentrací APOE mezi kontrolními a AN organoidy

Bylo pozorováno statisticky významné zvýšení koncentrace APOE u 48, 76, 135 a 160 dní kultivovaných AN organoidů oproti kontrolním skupinám. Rozdíly byly statisticky významné na hladinách významností ($p=0,05$) pro skupiny 48, 76 a 160 dní kultivovaných organoidů a ($p=0,001$) pro 135 dní kultivované organoidy.

APOE je v mozku syntetizováno převážně astrocyty a v omezené míře mikroglie. [42] Zvýšené hladiny APOE v pozdějších fázích kultivace AN organoidů korelují se zvýšenými koncentracemi CD44 (buněčný marker astrocytů) u AN organoidů.

4.4.2 TTR

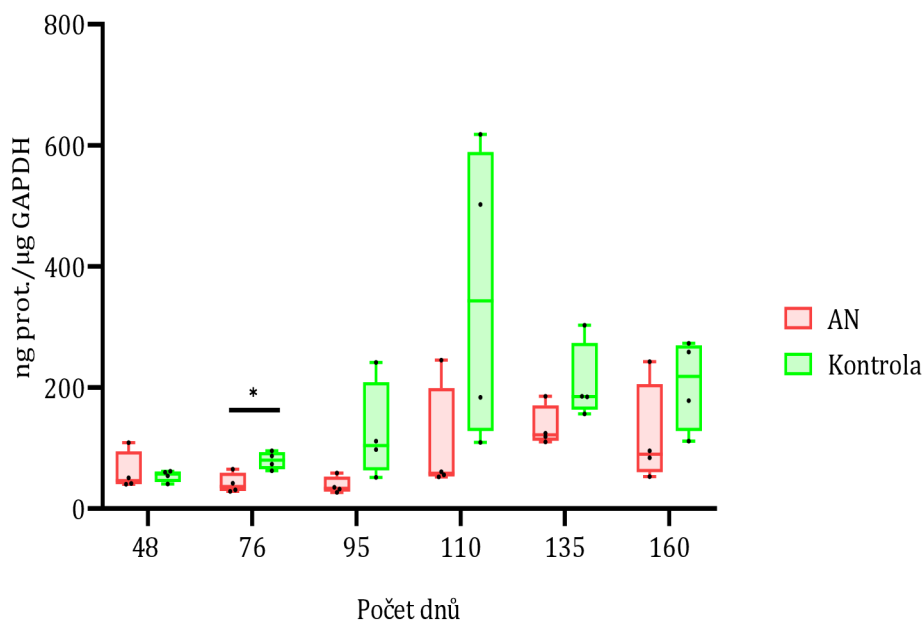


Obrázek 25 Porovnání koncentrací TTR mezi kontrolními a AN organoidy

Koncentrace TTR byla vyšší u skupin AN organoidů 76, 135 a 160 dní kultivovaných oproti kontrolám. Tento rozdíl byl statisticky významný na hladinách významnosti ($p=0,05$) pro skupiny 76 a 160 dní kultivovaných a ($p=0,001$) pro 135 kultivované organoidy.

Naše výsledky naznačují zvýšenou expresi TTR v AN organoidech, toto zjištění koreluje s literaturou, která uvádí, že dochází ke zvýšené expresi proteinu TTR v hipokampálních a kortikálních neuronech z lidských AN a modelových AN myších mozků.[61]

4.4.3 APP



Obrázek 26 Porovnání koncentrací APP mezi kontrolními a AN organoidy

Koncentrace APP byla statisticky významně vyšší ($p=0,05$) u 76 dní kultivovaných kontrol než u AN organoidů.

Peptid LVFFAEDVGSNK je společný jak pro APP, tak i pro A β 40 a A β 42. Na základě této analýzy nejsme schopni určit, zda se jedná o peptid z APP nebo A β peptidů. Peptidy specifické pro A β 40 a A β 42 se nám v CO nepodařilo detekovat. To může být způsobeno velmi nízkou koncentrací.

4.4.4 Patologie AN u zkoumaných cerebrálních organoidů

Při porovnání koncentrací některých, buněčných markerů a některých proteinů souvisejících s AN, mezi skupinou kontrolních organoidů a skupinou AN organoidů bylo možné pozorovat určité rozdíly konzistentní s literaturou. To by mohlo ukazovat na rozvoj patologie AN nebo alespoň na pozměněný rozvoj tkáně u organoidů odvozených z fibroblastů pacienta s familiární AN. Na naše výsledky může mít vliv pohlaví a věk dárců tkání pro kultivaci organoidů, protože i hladiny některých proteinů se mohou s těmito parametry měnit. Naše zjištění je nutné potvrdit na vzorcích organoidů odvozených z buněk dárců stejného věku a pohlaví.

5 Závěr

V teoretické části této diplomové práce se snažíme přiblížit patogenezi, studijní modely a biomarkery Alzheimerovy nemoci. Dále popisujeme obecný proteomický protokol a přípravu SRM metody pro proteomickou analýzu. V poslední části teoretické části se zabýváme popisem využitých analytických metod (UHPLC a MS/MS). V experimentální části se věnujeme popisu a optimalizaci přípravy vzorků, popisu metod pro kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii a v neposlední řadě interpretaci naměřených dat.

V rámci této diplomové práce se nám podařilo kvantifikovat vybrané proteinové markery a porovnat jejich hladiny mezi skupinami organoidů s rozdílnou dobou kultivace, odvozených z buněk jak zdravého jedince, tak i z buněk pacienta s Alzheimerovou nemocí.

Z našich výsledků je možné usuzovat na správný vývoj a organizaci tkání ve zkoumaných CO. Dále také bylo zjištěno, že koncentrace některých buněčných markerů, ale i proteinů souvisejících s AN se mezi zkoumanými skupinami organoidů liší.

Naše preliminární data je nutné potvrdit na vzorcích organoidů odvozených z buněk dárců ve stejném věku a shodného pohlaví, protože hladiny některých proteinů mohou být právě na věku a pohlaví závislé.

Použité zdroje

- [1] C. Reitz, "Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis: A Critical Review," *Int. J. Alzheimers. Dis.*, vol. 2012, pp. 1–11, 2012.
- [2] J. Gaugler, B. James, T. Johnson, K. Scholz, and J. Weuve, "2016 Alzheimer's disease facts and figures," *Alzheimer's Dement.*, vol. 12, no. 4, pp. 459–509, 2016.
- [3] Cathy Greenblat, "Dementia," 2020. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>. [Accessed: 27-Dec-2020].
- [4] C. Reitz and R. Mayeux, "Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 88, no. 4, pp. 640–651, 2014.
- [5] S. A. Park, S. M. Han, and C. E. Kim, "New fluid biomarkers tracking non-amyloid- β and non-tau pathology in Alzheimer's disease," *Exp. Mol. Med.*, vol. 52, no. 4, pp. 556–568, 2020.
- [6] X. Du, X. Wang, and M. Geng, "Alzheimer's disease hypothesis and related therapies," *Transl. Neurodegener.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–7, 2018.
- [7] S. H. Barage and K. D. Sonawane, "Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease," *Neuropeptides*, vol. 52, pp. 1–18, 2015.
- [8] T. Qiu, Q. Liu, Y. X. Chen, Y. F. Zhao, and Y. M. Li, "A β 42 and A β 40: similarities and differences," *J. Pept. Sci.*, vol. 21, no. 7, pp. 522–529, 2015.
- [9] M. P. Murphy and H. L. Iii, "Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide M.," vol. 19, no. 1, pp. 1–17, 2010.
- [10] G. Chen *et al.*, "Amyloid beta : structure , biology and structure-based therapeutic development," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 38, no. 9, pp. 1205–1235, 2017.
- [11] M. Sakono and T. Zako, "Amyloid oligomers: Formation and toxicity of A β oligomers," *FEBS J.*, vol. 277, no. 6, pp. 1348–1358, 2010.
- [12] S. He, C. Reinhard, and B. De Strooper, "The amyloid- b precursor protein : integrating structure with biological function," vol. 24, no. 23, pp. 3996–4006, 2005.
- [13] Y. Zhang, R. Thompson, H. Zhang, and H. Xu, "APP processing in Alzheimer ' s disease," *Mol. Brain*, vol. 4, no. 1, p. 3, 2011.
- [14] R. M. Califf, "Biomarker definitions and their applications," *Exp. Biol. Med.*, vol. 243, no. 3, pp. 213–221, 2018.

- [15] L. C. de Souza, M. Sarazin, A. L. Teixeira-Junior, P. Caramelli, A. E. dos Santos, and B. Dubois, "Biomarcadores da doença de Alzheimer," *Arq. Neuropsiquiatr.*, vol. 72, no. 3, pp. 227–231, 2014.
- [16] C. Humpel, "Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease," *Trends Biotechnol.*, vol. 29, no. 1, pp. 26–32, 2011.
- [17] P. D. Mehta and T. Pirttilä, "Biological markers of Alzheimer's disease," *Drug Dev. Res.*, vol. 56, no. 2, pp. 74–84, 2002.
- [18] P. Bailey, "Biological Markers in Alzheimer's Disease," *Can. J. Neurol. Sci. / J. Can. des Sci. Neurol.*, vol. 34, no. S1, pp. S72–S76, 2007.
- [19] H. M. Schipper, "Biological markers and Alzheimer disease: A Canadian perspective," *Int. J. Alzheimers. Dis.*, vol. 2010, no. i, 2010.
- [20] Y. Gerakis and C. Hetz, "Brain organoids : a next step for humanized Alzheimer ' s disease models ?," *Mol. Psychiatry*, pp. 474–478, 2019.
- [21] E. Drummond and T. Wisniewski, "Alzheimer's disease: experimental models and reality," *Acta Neuropathol.*, vol. 133, no. 2, pp. 155–175, 2017.
- [22] K. Kim *et al.*, "Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells performed CHARM and guided analysis of methylation HHS Public Access," *Nature*, vol. 467, no. 7313, pp. 285–290, 2010.
- [23] C. Gonzalez, E. Armijo, J. Bravo-alegria, and A. Becerra-calixto, "Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids," vol. 23, no. 12, pp. 2363–2374, 2019.
- [24] Y. Shi, Q. Wu, and X. Wang, "Modeling brain development and diseases with human cerebral organoids," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 66, pp. 103–115, 2021.
- [25] A. Doerr, "Mass spectrometry-based targeted proteomics," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 1, p. 23, 2013.
- [26] T. Shi *et al.*, "Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research," *Proteomics*, vol. 16, no. 15–16, pp. 2160–2182, 2016.
- [27] Y. J. Kim, S. Gallien, J. van Oostrum, and B. Domon, "Targeted proteomics strategy applied to biomarker evaluation," *Proteomics - Clin. Appl.*, vol. 7, no. 11–12, pp. 739–747, 2013.
- [28] B. Aslam, M. Basit, M. A. Nisar, M. Khurshid, and M. H. Rasool, "Proteomics: Technologies and their applications," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 55, no. 2, pp. 182–196, 2017.
- [29] J. R. Yates, C. I. Ruse, and A. Nakorchevsky, "Proteomics by mass

- spectrometry: Approaches, advances, and applications," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 11, pp. 49–79, 2009.
- [30] V. Vidova and Z. Spacil, "A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition," *Anal. Chim. Acta*, vol. 964, pp. 7–23, 2017.
- [31] M. S. Lowenthal, Y. Liang, K. W. Phinney, and S. E. Stein, "Quantitative bottom-up proteomics depends on digestion conditions," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 1, pp. 551–558, 2014.
- [32] T. Müller and D. Winter, "Systematic evaluation of protein reduction and alkylation reveals massive unspecific side effects by iodine-containing reagents," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 16, no. 7, pp. 1173–1187, 2017.
- [33] S. E. Ong and M. Mann, "Mass Spectrometry–Based Proteomics Turns Quantitative," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 1, no. 5, pp. 252–262, 2005.
- [34] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, and B. Kuster, "Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 389, no. 4, pp. 1017–1031, 2007.
- [35] E. Borràs and E. Sabidó, "What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry," *Proteomics*, vol. 17, no. 17–18, 2017.
- [36] C. Tristan, "the diverse functions of GAPDH," vol. 23, no. 2, pp. 317–323, 2012.
- [37] F. Michetti *et al.*, "The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury," *J. Neurochem.*, vol. 148, no. 2, pp. 168–187, 2019.
- [38] J. Dzwonek and G. M. Wilczyński, "CD44: Molecular interactions, signaling and functions in the nervous system," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, no. MAY, pp. 1–9, 2015.
- [39] M. Khalil *et al.*, "Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 14, no. 10, pp. 577–589, 2018.
- [40] Y. L. Xiong, T. Meng, J. Luo, and H. Zhang, "The Potential of Neurofilament Light as a Biomarker in Alzheimer's Disease," *Eur. Neurol.*, vol. 400016, no. 1, pp. 6–15, 2021.
- [41] C. E. Fleming, A. F. Nunes, and M. M. Sousa, "Transthyretin: More than meets the eye," *Prog. Neurobiol.*, vol. 89, no. 3, pp. 266–276, 2009.
- [42] F. Liao, H. Yoon, and J. Kim, "Apolipoprotein e metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 28, no. 1, pp. 60–67, 2017.
- [43] J. Kim, J. M. Basak, and D. M. Holtzman, "The Role of

- Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease," vol. 63, no. 3, pp. 287–303, 2011.
- [44] P. K. S. Vipin Bansal, Rishabha Malviya, Om Prakash Pal, "Journal of Global Pharma Technology REVIEW ON TRADITIONAL," *J. Glob. Pharma Technol.*, vol. 2, no. May, pp. 18–27, 2010.
- [45] F. Ramos, *Liquid chromatography: Principles, technology and applications*, +. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc, 2013.
- [46] M. W. Dong, "UHPLC, Part I: Perspectives and Instrumental Features," *LCGC North Am.*, vol. 35, no. 6, pp. 374–381, 2017.
- [47] J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, A. Jelińska, and P. Garbacki, "UHPLC: The greening face of liquid chromatography," *Chromatographia*, vol. 76, no. 21–22, pp. 1429–1437, 2013.
- [48] Y. Shi, R. Xiang, C. Horváth, and J. A. Wilkins, "The role of liquid chromatography in proteomics," *J. Chromatogr. A*, vol. 1053, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 27–36, 2004.
- [49] W. Z. Shou and W. Naidong, "Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography-electrospray tandem mass spectrometric (HILIC-ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 825, no. 2, pp. 186–192, 2005.
- [50] G. Mitulović, "New HPLC techniques for proteomics analysis: A short overview of latest developments," *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 38, no. 3, pp. 390–403, 2015.
- [51] C. Mirodatos, *Mass Spectrometry: Principles and Applications in Catalysis*, 3rd ed. Chichester : John Wiley & Sons, 2007, 1994.
- [52] S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, J. J. Thomas, C. Brugidou, B. Bothner, and G. Siuzdak, "Mass spectrometry of an intact virus," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 40, no. 3, pp. 541–544, 2001.
- [53] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, and S. F. Wong, "Electrospray ionization-principles and practice," pp. 37–70, 1990.
- [54] S. Banerjee and S. Mazumdar, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte," *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2012, pp. 1–40, 2012.
- [55] J. A. Loo, "STUDYING NONCOVALENT PROTEIN COMPLEXES BY ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY."
- [56] J. J. Coon, J. E. P. Syka, J. Shabanowitz, and D. F. Hunt, "Tandem mass spectrometry for peptide and protein sequence analysis," *Biotechniques*, vol. 38, no. 4, pp. 519–523, 2005.
- [57] M. A. Lancaster and J. A. Knoblich, "Organogenesis in a dish:

POUŽITÉ ZDROJE

- Modeling development and disease using organoid technologies,” *Science (80-.)*, vol. 345, no. 6194, 2014.
- [58] I. Dapic, L. Baljeu-Neuman, N. Uwugiaren, J. Kers, D. R. Goodlett, and G. L. Corthals, “Proteome analysis of tissues by mass spectrometry,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 38, no. 4–5, pp. 403–441, 2019.
- [59] A. M. Pasca *et al.*, “Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture,” *Nat. Methods*, vol. 12, no. 7, pp. 671–678, 2015.
- [60] J. S. Byun *et al.*, “Rapid differentiation of astrocytes from human embryonic stem cells,” *Neurosci. Lett.*, vol. 716, no. December 2019, p. 134681, 2020.
- [61] X. Li and J. N. Buxbaum, “Transthyretin and the brain re-visited: Is neuronal synthesis of transthyretin protective in Alzheimer’s disease?,” *Mol. Neurodegener.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–17, 2011.

Seznam obrázků

Obrázek 1. Přehled základních patologických jevů AN. Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com	19
Obrázek 2. Schéma odbourávání APP Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com.....	21
Obrázek 3. Schéma bottom-up protokolu. Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com	27
Obrázek 4. Schématické znázornění coulombické exploze, Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com	35
Obrázek 5 Schéma QqQ módů. Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com.....	36
Obrázek 6. Schéma typické y a b série po CID fragmentaci; Obrázek vytvořen pomocí programu BioRender.com	37
Obrázek 7 Kalibrační závislost GAPDH.....	46
Obrázek 8 Kalibrační závislost TUBB3	47
Obrázek 9 Kalibrační závislost NEFM	47
Obrázek 10 Kalibrační závislost NEFL	47
Obrázek 11 Kalibrační závislost S100B	48
Obrázek 12 Kalibrační závislost CD44.....	48
Obrázek 13 Kalibrační závislost APOE.....	48
Obrázek 14 Kalibrační závislost TTR	49
Obrázek 15 Kalibrační závislost APP	49
Obrázek 17: Test přídavku SDC	50
Obrázek 16 Porovnání extrakčních činidel	50
Obrázek 18 Optimalizace doby štěpení trypsinem	52
Obrázek 19 Porovnání koncentrací TUBB3 mezi kontrolními a AN organoidy	53
Obrázek 20. Porovnání koncentrací NEFM mezi kontrolními a AN organoidy	54
Obrázek 21 Porovnání koncentrací NEFL mezi kontrolními a AN organoidy	55
Obrázek 22. Porovnání koncentrací S100B mezi kontrolními a AN organoidy	56
Obrázek 23. Porovnání koncentrací CD44 mezi kontrolními a AN organoidy	57
Obrázek 24 Porovnání koncentrací APOE mezi kontrolními a AN organoidy	58
Obrázek 25 Porovnání koncentrací TTR mezi kontrolními a AN organoidy	59

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 26 Porovnání koncentrací APP mezi kontrolními a AN organoidy	60
---	----

Seznam tabulek

Tabulka 1 Přehled hmotnostních analyzátorů	34
Tabulka 2 Souhrnná tabulka vlastností proteinů	41
Tabulka 3 Souhrnná tabulka vlastností peptidů.....	42
Tabulka 4. Chromatografický gradient	42
Tabulka 5 Nastavení hmotnostního spektrometru	43
Tabulka 6. Přehled kvantifikačních přechodů.....	44
Tabulka 7. Hodnoty limitů detekce a kvantifikace	46
Tabulka 8. Přehled výtěžností SPE a matričních efektů	51